

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

AVALIAÇÃO FÍSICA, EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR
DA INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM
PASSERIFORMES

Deuvânia Carvalho da Silva

Bióloga

ARAÇATUBA – SP

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

AVALIAÇÃO FÍSICA, EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR
DA INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM
PASSERIFORMES

Aluna: Deuvânia Carvalho da Silva

Orientador: Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – UNESP, Curso de Medicina Veterinária, *Campus* de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2009

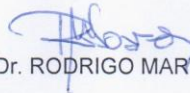
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Avaliação física, epidemiológica e molecular da infecção por
Cryptosporidium spp. em passeriformes.

AUTOR: DEUVÂNIA CARVALHO DA SILVA

ORIENTADOR: Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.



Dr. RODRIGO MARTINS SOARES



Dr.ª VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA



Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

DATA DA REALIZAÇÃO: 18 de dezembro de 2009.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DEUVÂNIA CARVALHO DA SILVA - nascida em 27 de junho de 1968, em Magda, SP. É formada em Ciências Biológicas pela Faculdade Educacional de Votuporanga em dezembro de 1993. Trabalha na rede Pública, na área da Educação, na Escola Estadual Manoel Bento da Cruz, Município de Araçatuba-SP, onde ocupa o cargo de Professora de Educação Básica II, Titular de Cargo Efetivo da disciplina de Biologia.

Dedico...

*A Deus, pela constante presença em
todos os momentos de minha vida.
Ao meu pai (in memoriam) e à
minha Mãe, nas suas orações, pela
compreensão e pelo seu grande amor.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Araçatuba, pela viabilidade da realização do mestrado.

Ao Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, UNESP – Araçatuba, por ter me orientado e auxiliado em todos os momentos necessários. Pela determinação, respeito e paciência, e principalmente pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

À minha mãe, Nair e meus irmãos Dulci, Cláudia, Marta e Joel, e cunhados, e o namorado Antônio, pelo incentivo e apoio.

Às professoras Valéria Marçal Félix de Lima, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, UNESP – Araçatuba e Cárís Maroni Nunes e Luzia Helena Queiroz, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP – Araçatuba, pelas orientações e sugestões para esse trabalho.

À Profa. Kátia Denise Saraiva Bresciani, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP – Araçatuba, pela atenção, carinho e confiança.

À Profa. Sílvia Helena Venturoli Perri, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP – Araçatuba, por colaborar na realização das análises estatísticas e sugestões.

Aos proprietários dos criatórios das aves: Marcos Antonio, Vanderlei, Roberto, Orlando e Gilberto pela receptividade, respeito e confiança, permitindo que o experimento fosse realizado com seus animais.

À Diretora Sueli Dobri Fornageiro e toda a equipe da Escola Estadual Manoel Bento da Cruz, pela compreensão e generosidade.

Aos colegas: Alex, Valéria, Camila, Fernando e Weslen, pela colaboração, amizade e momentos de descontração, durante o experimento.

Às colegas: Analy, Camille, Jaqueline e Fernanda, por participarem de vários momentos, com uma convivência amigável e sincera.

A todos os estagiários que participaram do experimento, com dedicação nas tarefas do laboratório.

Aos funcionários da Biblioteca do curso de Medicina Veterinária da FOA-UNESP, pela ajuda em pesquisas e na normalização deste trabalho.

Ao técnico de laboratório Almir Aparecido Lemos, pelo auxílio no preparo de reagentes e materiais utilizados neste experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para realização deste projeto de pesquisa (processo nº 2007/54312-2).

E a todos aqueles que contribuíram e fizeram parte deste projeto. Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais.....	11
1.1 Ordem Passeriformes.....	11
1.2 Histórico de <i>Cryptosporidium</i>	12
1.2.1 Agente etiológico.....	13
1.2.2 Ciclo biológico.....	16
1.3 Especificidade por Hospedeiros.....	19
1.4 Ocorrência em Aves.....	21
1.4.1 Ocorrência em aves no Brasil.....	22
1.5 Patogenia, Sinais Clínicos e Lesões Macroscópicas e Microscópicas.....	23
1.6 Infecção em Galinha Doméstica.....	25
1.7 Infecção em Perus.....	27
1.8 Infecção em Codornas.....	28
1.9 Infecção em Avestruzes.....	29
1.10 Infecção em Aves Selvagens	30
1.10.1 Anseriformes.....	30
1.10.2 Psitaciformes.....	30
1.10.3 Galliformes.....	31
1.10.4 Falconiformes.....	32
1.10.5 Charadriiformes.....	32
1.10.6 Criptosporidiose Aviária em Saúde Pública.....	32
1.11 Diagnóstico.....	35
1.11.1 Visualização de Oocistos e Outros Estágios Evolutivos por Métodos de Concentração e Coloração.....	35
1.11.2 Métodos Imunológicos e Moleculares.....	36

1.12 Objetivos	38
Referências.....	38
CAPÍTULO 2 - Avaliação física, epidemiológica e molecular da infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. em Passeriformes.....	69
Resumo.....	69
Abstract.....	70
Introdução.....	71
Materiais e Métodos.....	73
Resultados.....	76
Discussão.....	81
Referências.....	83

AVALIAÇÃO FÍSICA, EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM PASSERIFORMES

RESUMO – Devido à carência de informações relacionadas à epidemiologia da infecção por *Cryptosporidium* spp. em passeriformes, neste trabalho objetivou-se determinar a periodicidade da eliminação fecal de oocistos de *Cryptosporidium*, os sinais clínicos, a presença de mortalidade, e a caracterização molecular desse coccídio. Foram colhidas 480 amostras de fezes, provenientes de 40 aves, sendo 372 amostras de 31 aves adultas e 108 amostras de nove filhotes até 12 semanas de vida, com periodicidade mensal, no período de setembro de 2007 a setembro de 2008, com exceção do mês de abril. As aves estavam alojadas em cinco criatórios, com criação de bicudo (*Oryzoborus maximiliani*), curió (*Oryzoborus angolensis*), azulão (*Passerina brissonii*) e coleira do brejo (*Sporophila collaris*). As amostras foram conservadas em bicromato de potássio 2,5%, a 4°C, até o processamento. Os oocistos foram purificados por centrífugo-flutuação em solução de Sheather, seguindo-se a extração do DNA genômico dos oocistos e a classificação molecular, por meio da reação em cadeia de polimerase-*nested*, para amplificação de fragmentos da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico. Eliminação fecal intermitente de *Cryptosporidium* spp. foi observada em 91 (24,5%) amostras de aves adultas, com maior ocorrência nos períodos que se aproximam dos períodos de muda de penas e de reprodução das aves e em 14 amostras (13%) de aves jovens. O sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados possibilitou a identificação de somente *Cryptosporidium galli*. Embora em todos os criatórios houvesse aves positivas para *C. galli*, a presença de morbidade ou mortalidade foi observada em aves de somente um criatório, e estava associada à infecção concomitante com *Escherichia coli* e *Isospora* spp.. Este é o primeiro relato de infecção por *C. galli* em *P. brissonii*, *O. maximiliani* e *S. collaris*.

Palavras-Chave: *Cryptosporidium* spp., Passeriformes, epidemiologia.

PHYSICAL, EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR EVALUATION OF THE INFECTION BY *Cryptosporidium* spp. IN PASSERIFORMES

SUMMARY – Due to the lack of information related to the epidemiology of *Cryptosporidium* infection in passerine birds, this study aimed to determine the frequency of fecal shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts, after natural infection, the clinical signs and the presence of mortality, and accomplish its molecular characterization. Four hundred and eighty fecal samples were collected from 40 birds, 372 samples from 31 adult birds and 108 samples from young birds (up to 12 months old), housed in five herds, monthly, from September 2007 to September 2008, with the exception of the April. The birds were originated from flocks where the following species were herded: great-billed seed-finch (*Oryzoborus maximilianii*), lesser seed-finch (*Oryzoborus angolensis*), ultramarine grosbeak (*Passerina brissonii*) and rusty-collared seedeater (*Sporophila collaris*). The samples were preserved in 2.5% potassium dichromate 2.5% at 4°C, until processing. The oocysts were purified by centrifugal flotation in Sheather solution, followed by genomic DNA extraction from oocysts and molecular characterization using the nested polymerase chain reaction for amplification of fragments of the 18S subunit ribosomal RNA gene. Intermittent fecal shedding of *Cryptosporidium* spp. was observed in 91 (24.5%) samples from adult birds, with more frequent in periods approaching the periods of moulting and reproduction of birds and 14 samples (13%) of young birds. The sequencing of the amplified fragments allowed the identification of *Cryptosporidium galli*. Although all the aviaries had birds positive for *C. galli*, morbidity or mortality was observed in birds from only one aviary, and was associated to concomitant infection with *Escherichia coli* and *Isospora* sp. This is the first report of infection by *C. galli* in *Oryzoborus maximilianii*, *Passerina brissonii*, and *Sporophila collaris*.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., Passeriformes, epidemiology.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Ordem Passeriformes

A ordem Passeriformes é constituída por aproximadamente seis mil espécies, representando o maior número de espécies da Classe Aves. Entre as ordens de aves submetidas à análise genética, a ordem Passeriformes é a que possui o maior número de espécie cariotipadas, com aproximadamente 220 espécies (CARVALHO, 1989). Novos trabalhos sobre a citogenética desses pássaros foram publicados (LEDESMA et al., 2006; MERILES et al., 2003), aumentando o conhecimento, o estudo da similaridade entre as espécies e possíveis análises de rearranjos presentes em sua evolução das espécies.

Várias espécies de Passeriformes são criadas em cativeiro no Brasil, como animais de estimação, em zoológicos ou em criatórios comerciais. Há um aumento significativo nesse tipo de criação, com maior demanda por profissionais que trabalham direta ou indiretamente com esses animais, como biólogos ou veterinários, que são requisitados para fornecer informações ou resolver problemas relacionados ao manejo e às enfermidades dessas aves. No entanto, são escassas as informações sobre vários aspectos da criação de aves em cativeiro, inclusive de Passeriformes. Até o mês de novembro de 2006 havia, no território Brasileiro, aproximadamente 200.000 criadores de passeriformes da fauna silvestre brasileira, registrados no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (COBRAP, 2006). A estimativa do número total de Passeriformes, em criatórios registrados até esta data, é de dois milhões de aves.

A criação e manutenção de animais silvestres em cativeiro, para fins científicos, comerciais, educacionais e conservacionistas é regulada por meio de instrumentos legais que visam à normatização das atividades em consonância com as leis de proteção à fauna nativa, prevista na instrução

normativa nº 1/2003, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Das espécies criadas em cativeiro no Brasil, o curió (*Oryzoborus angolensis*), o bicudo (*Oryzoborus maximiliani*) e o canário do reino (*Serinus canaria*) estão entre os mais populares. Algumas espécies, como curiós e bicudos, podem apresentar valor comercial extremamente alto, encontrando-se entre os pássaros canoros mais valiosos do país, além de serem apreciados pela excelente qualidade do canto, associada à sua elegância e conhecimentos já adquiridos de manejo em cativeiro. Atualmente, o curió e o bicudo, assim como muitos outros pássaros brasileiros, encontram-se ameaçados de extinção, em decorrência da caça predatória, gananciosa e da destruição de seus ambientes naturais. Entre os criadores, observam-se esforços visando à preservação dessas espécies, bem como existe legislação que proíbe a captura e transporte desses animais em estado selvagem.

Há poucos relatos de infecção clínica por *Cryptosporidium* spp. em passeriformes. Clubb (1997) e Lindsay et al. (1991) relataram, em tentilhões, a presença de infecção por *Cryptosporidium* sp. no epitélio da mucosa dos ductos e das glândulas do proventrículo de aves que apresentavam diarreia aguda, emagrecimento, apatia. Antunes et al. (2008) sugerem que *C. galli* pode ser responsável por proventriculite crônica em aves, predispondo-as às infecções secundárias por outros patógenos. No entanto, são necessárias mais informações sobre o potencial patogênico de *Cryptosporidium* spp. em aves.

1.2 Histórico de *Cryptosporidium*

O primeiro relato de infecção por *Cryptosporidium* foi descrito por Tyzzer, no ano de 1907, que descreveu o parasito em glândulas gástricas de camundongo de laboratório, denominando-o como *Cryptosporidium muris*. O mesmo autor, em 1912, observou um protozoário semelhante a *C. muris*, no

intestino delgado de camundongos e, após infecção experimental com o parasito, estabeleceu infecções isoladas no estômago e no intestino com essa nova espécie, que foi denominada *Cryptosporidium parvum*.

Em 1929, foi relatado o primeiro caso de infecção por *Cryptosporidium* em aves, também por Tyzzer (1929), no epitélio cecal de pintos. Nessa ocasião, o parasito foi descrito como morfológicamente idêntico a *C. parvum*. Em 1955, Slavin descreveu *Cryptosporidium* causando mortalidade em perus jovens e classificou essa espécie como *Cryptosporidium meleagridis*. Posteriormente, (CURRENT et al. 1986) descreveram o ciclo de vida de *Cryptosporidium baileyi*, em frangos.

Criptosporidiose em aves se manifesta com sinais clínicos de infecções respiratórias, gastrintestinais e na bursa de Fabricius, afetando aves domésticas e selvagens (SRÉTER; VARGA, 2000).

Após seu reconhecimento como agente primário de doença clínica no homem e nos animais foi que alguns tópicos relacionados a essa enfermidade, como sua epidemiologia, patogenia e características clínico-laboratoriais começaram a ser elucidados.

1.2.1 Agente etiológico

Cryptosporidium é um coccídio pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Coccidea, Ordem Eucoccidiorida e Família Cryptosporidiidae (FAYER, 2008).

Esses coccídios são monoxênicos e se distinguem de outros coccídios por apresentarem características próprias, como oocistos sem esporocistos e presença de quatro esporozoítos, além de ocorrência de auto-infecção (excitação de oocistos de parede fina) e oocistos (parede espessa), que são eliminados no ambiente, e a presença de um vacúolo parasitóforo (localização intracelular, porém extracitoplasmática), na superfície das microvilosidades de células epiteliais, principalmente do intestino de vertebrados (BOROWSKI et al. 2008; WANG; WARD, 2001).

Carreno et al. (1999), Barta e Thompson, (2006) e Kuo et al. (2008), identificaram, por meio de análise filogenética, que o gênero *Cryptosporidium*, em relação à sua taxionomia, está mais próximo da Classe Gregarinia do que da Classe Coccidea. Portanto, reforçando a teoria de Hijjawi et al. (2002, 2004) e (ROSALES et al., 2005), sobre a existência de estágios extracelulares no ciclo biológico de *Cryptosporidium andersoni*, e sua multiplicação em meio de cultura livre de células. Além disso, (BULL et al., 1998) citaram reatividade cruzada de anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium*, com esporocistos do gênero *Monocystis*, em reação de imunofluorescência direta.

Em diversos, estudos realizados por vários grupos de pesquisadores, aproximadamente 22 espécies e vários genótipos de *Cryptosporidium* já foram identificados acometendo aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo o homem (FAYER et al., 2000; FAYER; SANTÍN, 2009; RYAN, 2009; SMITH et al., 2007; XIAO et al., 2004; XIAO; FAYER, 2008) (Quadro 1).

Segundo Xiao et al. (2002), alguns genótipos, apesar de apresentarem características morfológicas semelhantes, diferem em sua composição genética, em relação à espécie já classificadas, pela ausência de dados relacionados às suas características biológicas. Há mais de 33 novos genótipos descritos entre os mamíferos (FAYER, 2008; SMITH et al., 2007; XIAO; XIAO; FENG, 2008).

Há diferentes genótipos que infectam aves, como os genótipos I, II, III e IV, em várias espécies de aves (MEIRELES et al., 2006 ; NG et al., 2006), cinco genótipos de gansos (JELLISON et al., 2004; XIAO et al., 2004; ZHOU et al., 2004) e os genótipos de pato negro e de galinhola (MORGAN et al., 2001).

Quadro1- Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas.

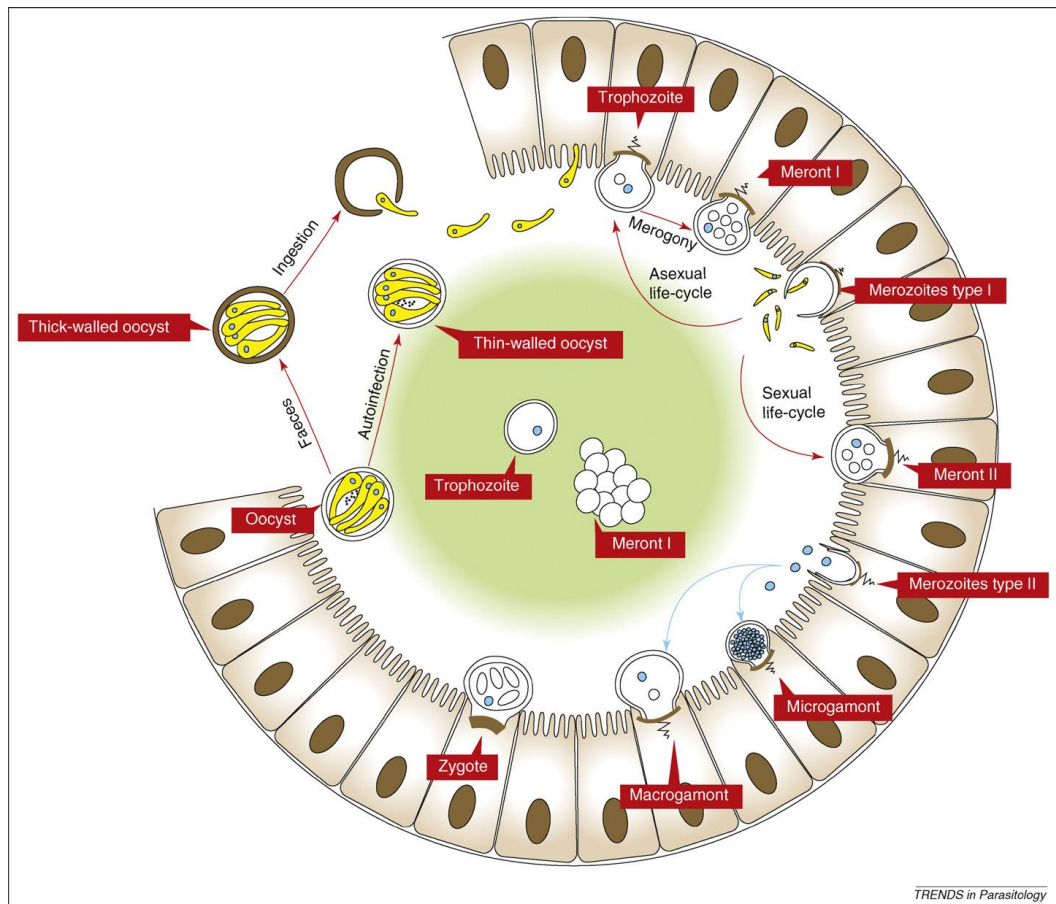
Espécies de <i>Cryptosporidium</i>		
Espécie	Hospedeiro	Bibliografia
<i>C. andersoni</i>	Bovinos (A)	Lindsay et al. (2000)
<i>C. baileyi</i>	Aves (B, C, TR)	Current et al. (1986)
<i>C. bovis</i>	Bovinos (ID)	Fayer et al. (2005)
<i>C. canis</i>	Caninos (ID)	Fayer et al. (2001)
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>)	Ryan et al. (2008)
<i>C. felis</i>	Felinos (ID)	Iseki (1979)
<i>C. fragile</i>	Anfíbio (<i>Duttaphrynus melanostictus</i>) (E)	Jirků et al. (2008)
<i>C. galli</i>	Várias espécies de aves (P)	Pavlásek (1999; 2001); Ryan et al. (2003 ; 2009); Antunes et al. (2008) e Nakamura et al. (2009)
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>)	Power e Ryan (2008)
<i>C. meleagridis</i>	Várias espécies de aves, homem (ID)	Slavin (1955)
<i>C. molnari</i>	Peixes (E)	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla (2002)
<i>C. muris</i>	Roedores (E)	Tyzzler (1910)
<i>C. parvum</i>	Camundongo, bovinos, homem (ID)	Tyzzler (1912)
<i>C. saurophilum</i>	Lagarto (E, ID)	Koudela e Modrý (1998)
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpentes (E)	Brownstein et al. (1977); Levine (1980); Tilley et al. (1990)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixe (E, ID)	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>C. suis</i>	Suínos (ID, IG)	Ryan et al. (2004)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos (D)	Fayer et al. (2008)
<i>C. varanii*</i>	Lagarto (<i>Varanus prasinus</i>)	Pavlásek et al. (1995); Pavlásek e Ryan (2008)
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al. (1971)
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos (ID)	Fayer e Santín (2009)

Fonte: Adaptado de Smith et al., 2007; Xiao e Fayer, 2008; Ryan, 2009; Fayer e Santín, 2009. Principais sítios de infecção do parasita no hospedeiro: A-abomaso; B-bursa de Fabricius; C-cloaca; E-estômago; ID-intestino delgado; IG-intestino grosso; P-proventrículo; TR-trato respiratório; *D-Desconhecido. * Em substituição a *C. saurophilum*.

1.2.2 Ciclo biológico

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* possui seis estágios de desenvolvimento no hospedeiro e é muito semelhante ao de outros coccídios pertencentes à subordem Eimeriorina. O processo de infecção ocorre por meio da excitação dos oocistos, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede dos oocistos e esporogonia (ROSE; SMITH, 1998).

O ciclo biológico de *Cryptosporidium* (Figura 1) inicia-se com a eliminação de oocistos esporulados, por um hospedeiro infectado, geralmente em fezes ou em secreções respiratórias. O hospedeiro susceptível se infecta pela ingestão de oocistos, presentes na água, alimentos e, em menor escala, pela inalação de oocistos em suspensão (CURRENT et al., 1986; SMITH et al., 2007; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; XIAO; FAYER, 2008).



Fonte: Barta e Thompson (2006).

FIGURA 1- Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.

Após ingestão de oocistos, ocorre sua excitação, com liberação de quatro esporozoítos, por meio de dissolução da sutura, e sua adesão à superfície de células epiteliais, onde serão englobados pelas microvilosidades, com formação de um vacúolo parasitóforo, aonde irão se diferenciar em trofozoítos e iniciar um processo de reprodução assexuada (merogonia ou esquizogonia). Na reprodução assexuada, serão formados os esquizontes de primeira geração, com oito merozoítos, que podem sofrer desenvolvimento cíclico, dando origem a esquizontes de primeira geração ou então prosseguem no ciclo, com formação de esquizontes de segunda geração, contendo quatro merozoítos (CURRENT et al., 1986; SMITH et al., 2007; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; XIAO; FAYER, 2008).

Em relação ao ciclo de vida de *C. baileyi*, os merontes tipo I passam por desenvolvimento cíclico (autoinfecção), originando novamente os trofozoítos ou então resultando em merontes tipo II que, liberando suas formas invasivas, se desenvolvem em merontes tipo III, e assim possibilitam a formação dos estágios sexuais, representados por microgametócitos e macrogametócitos (CURRENT et al., 1986).

Assim que ocorre a fertilização, há formação do zigoto e, posteriormente, diferenciação em dois tipos de oocistos: os de parede fina (20%) e os de parede espessa (80%). Ambos possuem capacidade de esporulação, dentro do hospedeiro, e contêm quatro esporozoítos livres. Oocistos de parede fina sofrem excitação, na região do trato gastrintestinal ou do trato respiratório, e iniciam auto-infecção, enquanto que os oocistos de parede espessa são eliminados em fezes, na forma infectante, e são altamente resistentes em condições ambientais (CURRENT et al., 1986; SMITH et al., 2007; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; XIAO; FAYER, 2008).

Para que ocorra excitação dos oocistos de *Cryptosporidium*, ao contrário do que ocorre em outros coccídios, não é necessária a presença de enzimas digestivas, condições redutoras ou sais biliares, o que permite a ocorrência de infecções respiratórias e em outros sítios extra-intestinais (FAYER; LEEK, 1984), embora a presença de sais biliares e de tripsina

amente a percentagem de excitação (HIJJAWI et al., 2004; SUNDERMANN et al., 1987).

Os estágios extracelulares (esporozoítos e merozoítos) possuem um complexo apical composto por organelas secretoras (roptrias, micronemas e grânulos densos) que liberam proteínas que facilitam a adesão e invasão da célula hospedeira, como a P23 (ENRIQUEZ et al., 1998), TRAP-C1 (KAPPE et al., 1999), CP47 (NESTERENKO et al., 1999), CP15 (SAGODIRA et al., 1999), GP900 e GP15/40 (CEVALLOS et al., 2000) e CSL-*Circunsporozoite-like* (LANGER et al., 2001).

O gênero *Cryptosporidium* apresenta localização intracelular, todavia, extracitoplasmática, dentro de uma estrutura denominada “vacúolo parasitóforo”, que é formada por uma membrana derivada das microvilosidades da célula epitelial, o que possibilita sua proteção contra a resposta imune do hospedeiro. Além disso, a formação da “organela de alimentação”, resultante da fusão da parede do parasito com a membrana celular do hospedeiro, proporciona a captação de nutrientes do citoplasma da célula do hospedeiro (BOROWSKI et al., 2008).

Harris e Petry (1999) e Petry (2004) relataram que a parede dos oocistos é composta por três camadas, uma camada externa, de 5nm, formada por glicoproteínas ácidas, uma camada interna, de 10nm, composta por lipídeos complexos (glicolipídeos e lipoproteínas) e uma camada interna, de 20 nm, provavelmente composta por glicoproteínas ácidas.

Oocistos de *Cryptosporidium* apresentam morfologia subesférica a ovóide e diâmetros polar e equatorial de 6.2 x 4.6 μm , 8.2 x 6.3 μm e 5.2 x 4.6 μm , respectivamente para *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* (CURRENT et al., 1986; LINDSAY et al., 1989; RYAN et al., 2003; 2009).

C. baileyi apresenta período pré-patente de dois a sete dias e período patente de quatro a 32 dias; *C. meleagridis* apresenta período pré-patente e patente de três a cinco dias e seis a 18 dias, respectivamente (CURRENT et al., 1986; MEIRELES et al., 1998a; SRÉTER; VARGA, 2000; TUMOVÁ et al., 2002). O ciclo biológico de *C. galli* ainda não foi determinado. No entanto,

Antunes et al. (2008) relataram eliminação crônica com eliminação fecal de pequena quantidade de oocistos, dessa espécie, em canários, curiós e calopsita.

Segundo Goodwin (1989), *C. baileyi* infecta o epitélio do trato respiratório, bursa de Fabricius, cloaca e rins, enquanto *C. meleagridis* parasita o epitélio do intestino delgado (SLAVIN, 1955) e *C. galli* infecta o proventrículo (RYAN et al., 2003). Raramente, *Cryptosporidium* sp. é encontrado em ductos biliares e pancreáticos, conjuntiva, glândulas salivares e esofagianas e em rins das aves (SRÉTER; VARGA, 2000).

1.3 Especificidade por Hospedeiros

Foram descritas 22 espécies do gênero *Cryptosporidium* e vários genótipos classificados de acordo com o hospedeiro e análises genéticas. Normalmente, esses genótipos relacionam-se geneticamente a outros genótipos ou espécies já classificadas. São exemplos do que acontece, em canídeos, com *C. canis* e os genótipos de coiotes e de raposas e, também, com *C. bovis* e o genótipo cervídeo, em ruminantes. A inter-relação genética existente entre genótipos e espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros poderia significar uma co-evolução hospedeiro-parasito (XIAO et al., 2002).

Há exceções, pois *C. parvum* infecta mamíferos, particularmente ruminantes e o homem, e está geneticamente mais relacionado ao genótipo de camundongos, que possui origem genética distinta de ruminantes, e *C. meleagridis*, que infecta preferencialmente aves e também o homem, e está geneticamente mais próximo a *C. parvum* e às outras espécies ou genótipos de mamíferos (XIAO et al., 2002).

Em algumas situações, a barreira entre espécies de hospedeiros pode ser superada, como na presença de imunossupressão ou em inoculações experimentais. Ditrich et al. (1991) descreveram o primeiro caso de infecção por *C. baileyi* em um paciente humano imunodeficiente. No entanto, nesse

relato, não foi realizada classificação molecular do parasito. Posteriormente, Ditrich et al. (1993) relatam que, apesar desse mesmo isolado ser infectante para aves, seu padrão antigênico era diferente do padrão antigênico de *C. baileyi*.

Lindsay et al. (1987) e Palkovic e Marousek (1989), por meio de inoculação intratraqueal de *C. parvum*, em galinha doméstica, promoveram infecção respiratória, com desenvolvimento de sinais clínicos. O único relato de infecção natural por *C. parvum* em aves (*Burhinus oedicephalus*) foi feito recentemente por Zylan et al. (2008), na Arábia Saudita.

Infecção natural por *C. baileyi* já foi relatada em ampla variedade de espécies de aves, enquanto que *C. meleagridis* apresenta um número mais restrito de hospedeiros aviários (SRÉTER; VARGA, 2000).

Infecções experimentais, com isolados de mamíferos e de aves, em répteis e anfíbios, não resultaram em desenvolvimento de infecção (BEKÉSI et al., 1998). Pesquisas, utilizando infecção experimental, demonstraram que oocistos de *C. meleagridis* são infectantes para camundongos, ratos, coelhos e bovinos (DARABUS, 1997; DARABUS; OLARIU, 2003; SRÉTER et al., 2000).

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 às de *C. parvum*.

Cryptosporidium meleagridis pode ser encontrado infectando o ser humano (ALVES et al., 2003; CAMA et al., 2003; GATEI et al., 2003; GUYOT et al., 2001; MORGAN et al., 2000a; PEDRAZA-DIAS et al., 2000; TIANGTIP; JONGWUTIWES, 2002), em alguns países com frequência semelhante ou superior a infecções por *C. parvum* (CAMA et al., 2003; XIAO et al., 2001). Essa espécie é considerada primariamente um parasito de células epiteliais do intestino de várias espécies de aves, particularmente de perus (SLAVIN, 1955; SRÉTER; VARGA, 2000).

Meireles et al. (2006) descreveram um isolado de avestruzes, com tropismo pelo epitélio cloacal que, quando inoculado experimentalmente em galinhas, não produziu infecção; NG et al. (2006) encontraram esse mesmo

parasito em algumas espécies de psitacídeos, mas não em avestruzes, e o classificaram como genótipo II de aves.

Infecção por *C. galli* já foi relatada por Antunes et al. (2008), Ng et al. (2006), Ryan et al. (2003) e Nakamura et al. (2009), em várias espécies de aves, entre elas: calau (*Buceros rhinoceros*), canário (*Serinus canaria*), calopsita (*Nymphicus hollandicus*), curió (*Oryzoborus angolensis*), flamingo cubano (*Phoenicopterus ruber ruber*), galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*), galo de campina (*Paroaria dominicana*), hazel hen (*Tetrastes bonasia rupestris*), periquito turquesa (*Neophema pulchella*), pintarroxo de bico roxo (*Pinicola enucleator*), tetraz (*Tetrao urogallus*) e várias espécies de tentilhões (Spermestidae e Fringillidae).

1.4 Ocorrência em Aves

Na literatura científica é evidente a carência de informações relacionada à ocorrência de infecção por *Cryptosporidium*, em espécies aviárias. Esse parasito normalmente não está relacionado aos agentes causadores de enfermidades em aves. Porém, é necessário explorar as técnicas para diagnóstico de criptosporidiose em laboratórios de ornitopatologia.

A criptosporidiose ocorre naturalmente em aves domésticas e selvagens, sendo uma das infecções parasitárias mais prevalentes (O'DONOGHUE et al. 1987; SRÉTER; VARGA, 2000).

Em estudo realizado por Tzipori e Campbel (1981) foi observada presença de anticorpos anti-*Cryptosporidium* em 22 de 25 (88%) galinhas domésticas, por meio do teste de imunofluorescência indireta.

Gardiner e Imes (1984) observaram, em tentilhões, 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. Nessa mesma espécie de aves, Blagburn et al. (1990) descreveram infecção no epitélio da mucosa dos ductos e das glândulas do

proventrículo, com presença de diarreia aguda.

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. Já, Goodwin e Brown, (1988) relataram positividade em 6,4% (64/1065) dos frangos de corte, analisados por meio de histopatologia.

Ley et al. (1988) descreveram a ocorrência de *Cryptosporidium* em várias espécies de aves, pela coloração de esfregaços de fezes com a técnica da auramina O. Foi observada positividade de 13,7% (27/197) em frangos de corte, 3,55% (4/113) em matrizes de corte, 1,3% (1/75) em poedeiras comerciais, 50% (1/2) em pavões, 18,2% (6/33) em psitacídeos e 50% (1/2) em anseriformes.

Em estudo realizado por Ng et al. (2006), com diversas espécies de aves, na Austrália, foi observada positividade de 6,25% para *Cryptosporidium*, em um total de 430 amostras fecais, analisadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR).

Na Espanha, Pagés-Manté et al. (2007) relataram infecção por *C. meleagridis*, por meio da PCR, em perdiz vermelha (*Alectoris rufa*), num lote que apresentava morbidade entre 60-70% e mortalidade superior a 50%.

1.4.1 Ocorrência em aves no Brasil

No Brasil, há poucos relatos de infecção por *Cryptosporidium*, principalmente em aves. Meireles e Figueiredo (1992) citaram o primeiro isolamento e identificação de *C. baileyi* em aves, no Brasil. Posteriormente, Meireles et al. (1998a; 1998b e 1999), utilizando infecção experimental com esse isolado, observaram os aspectos zootécnicos, a patogenia e a interação desse parasito com *Escherichia coli*, no trato respiratório de frangos de corte.

De acordo com Riera et al. (2003), no estado de São Paulo foram encontradas avestruzes apresentando prolapso de cloaca, associado à mortalidade. Essas aves apresentaram infecção nos epitélios do reto, cloaca e

bursa de Fabricius e oocistos com morfologia e morfometria semelhantes às de *C. baileyi*, em fezes. Posteriormente, Meireles et al. (2006) e Santos et al. (2005) classificaram esse isolado como um novo genótipo de avestruzes.

Em outro estudo, houve descrição de infecção por *Cryptosporidium*, em intestino, bursa de Fabricius e traquéia de frangos, porém, sem classificação da espécie (JACOBSEN et al., 2006).

Em dois estudos já realizados no Brasil, Antunes et al. (2008) observaram infecção crônica por *C. galli* em curiós, calopsita e canário e Nakamura et al. (2009) obtiveram positividade para *Cryptosporidium* em 4,86% (47/966) amostras provenientes de várias espécies de aves. As espécies encontradas foram *C. baileyi* em canário (*Sicalis flaveola*), galinha doméstica (*G. g. domesticus*) e urubu de cabeça preta (*Coragyps atratus*); *C. meleagridis* em galinha doméstica; *C. parvum* em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e *C. galli* em calopsita, canário (*Serinus canaria*) e curiós (*Oryzoborus angolensis*).

1.5 Patogenia, Sinais Clínicos e Lesões Macroscópicas e Microscópicas

A criptosporidiose apresenta três formas clínicas em aves: respiratória, gastrintestinal e eventualmente renal. Relatos de infecção por *Cryptosporidium* nos tratos gastrintestinal, respiratório e na bursa de Fabricius, ocasionalmente estão relacionados a perdas econômicas e mortalidade (RYAN, 2009; SRÉTER; VARGA, 2000).

Infecção no intestino por *C. meleagridis* resulta em doença clínica e aumento de mortalidade em perus (SLAVIN, 1955) e codornas (HOERR et al., 1986).

Há evidências de que infecções multifatoriais, com *C. baileyi* e outros agentes infecciosos, interferem negativamente no sistema imunológico das aves, como relatado por Naciri e Mazzela, (1988) e Naciri et al. (1989) com o vírus vacinal ou patogênico da doença de Marek e Levy et al. (1988) com o vírus da doença de Gumboro, Guy et al. (1988) com *Reovirus* e Rhee et al.

(1998) com o vírus vacinal da doença de Newcastle. No entanto, Meireles et al. (1998b,1999) relataram que a infecção na bursa de Fabricius não interfere na resposta imunológica das aves, apesar da presença de exsudato caseoso na luz desse órgão, hipertrofia e hiperplasia de células epiteliais, perda de vilosidades do epitélio e leve atrofia linfóide.

A patogenia da criptosporidiose, em relação ao trato intestinal, está associada à 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).

De acordo com Argenzio et al. (1993), as alterações digestivas e de transporte de nutrientes podem estar associadas com aumento na secreção de cloro, induzido por um componente secretório, que produz sinais clínicos como diarreia, dores abdominais, apatia e anorexia.

Em relação à lesão epitelial, Okhuysen e Chappell (2002) sugerem que ela pode ser resultante de ação direta do parasito ou indiretamente, pela ação de moléculas derivadas do parasito, que atraem células inflamatórias e estimulam a produção de citocinas, na região da infecção, o que pode influenciar o surgimento de quadros diarreicos.

Infecção por *C. baileyi* é considerada como parte do complexo respiratório das aves, particularmente da galinha doméstica, de forma primária ou secundária (BLAGBURN et al., 1987; GOODWIN et al., 1996; SRÉTER; VARGA, 2000).

Cryptosporidium baileyi pode infectar o trato respiratório superior e lesionar os seios nasais, nasofaringe e laringe, ou o trato respiratório inferior, com desenvolvimento de lesões em traquéia, brônquios, sacos aéreos e pulmões, presença de mortalidade e sinais clínicos de letargia, anorexia, tosse, espirros, murmúrios, dispnéia e conjuntivite (SRÉTER; VARGA, 2000). Nesses locais, há destruição de cílios das células epiteliais, observada em experimentos que mostraram que *C. baileyi*, ao induzir falha completa ou parcial do aparato mucociliar, por deslocamento físico ou destruição dos cílios

e\ou metaplasia escamosa do epitélio, prejudica a remoção normal de secreções e materiais inalados e, desse modo, predispõe à instalação de outros agentes patogênicos, principalmente *E. coli* (GOODWIN et al., 1988a; MEIRELES et al., 1999)

A infecção por *C. galli* ocorre somente no proventrículo de aves, e pode ser responsável por diarreia (RYAN et al., 2003) associada a sinais clínicos e mortalidade (BLAGBURN et al., 1990; MORGAN et al., 2001; PAVLÁSEK, 1999; PAVLÁSEK, 2001). Há uma descrição de infecção crônica por essa espécie, relacionada a infecções por outros agentes etiológicos (ANTUNES et al., 2008).

1.6 Infecção em Galinha Doméstica

O primeiro relato de infecção por *Cryptosporidium*, em galinha doméstica (FLETCHER et al., 1975) detectaram em bursa de Fabricius, em três lotes de frangos de corte com seis, sete e 17 semanas de idade. As aves, com sete e 17 semanas, apresentaram associação com a doença de Marek. O epitélio da bursa de Fabricius encontrava-se com intensa hiperplasia e infiltração de heterófilos.

Entre as espécies de *Cryptosporidium* que acometem a galinha doméstica, as mais comuns são: *C. baileyi*, na bursa de Fabricius, reto, cloaca e trato respiratório e, com menor frequência, *C. meleagridis*, no intestino delgado (SRÉTER; VARGA, 2000).

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

Em relato de infecção intestinal em frangos de corte (GOODWIN; BROWN, 1989) observaram, por meio da análise de cortes histológicos, que as vilosidades parasitadas apresentavam-se atrofiadas, com hipertrofia de criptas

e infiltração de heterófilos, linfócitos, macrófagos e plasmócitos, em lâmina própria. Mesmo que as aves infectadas apresentassem sinais clínicos, somente metade dos casos estava associada à doença gastrointestinal.

Dhillon et al. (1981) relataram, pela primeira vez, infecção respiratória em frangos de corte, com sete semanas de vida, provenientes de um lote de 16.000 animais. Na região da traquéia, havia presença de exsudato, além de petéquias no seio nasal. *Cryptosporidium* sp. foi descrito como numerosos organismos ácido periódico de Schiff (PAS) positivos, de 2 a 3,5 μm de diâmetro, aderidos à borda ciliada do epitélio e na superfície luminal das glândulas mucosas. *Adenovirus* foi isolado da traquéia, no entanto, seu efeito no curso da infecção não pôde ser determinado.

Gorham et al. (1987) encontraram *C. baileyi*, em bursa de Fabricius de frangos de corte, em dois entre oito lotes pesquisados, em associação com aerossaculite. Ainda correlacionaram a infecção por *C. baileyi* com o índice de mortalidade, encontrando maiores índices nos dois lotes infectados.

Correlação semelhante foi efetuada por Snyder et al. (1988) que, pesquisando *C. baileyi* em 18 lotes de frangos de corte, relataram uma média de 24% de aves positivas por lote. Os animais com sorologia negativa apresentavam relação, coincidente ou não, com melhor desempenho zootécnico que, segundo os autores, 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) pesquisaram a correlação entre traqueíte em frangos de corte com infecção por *C. baileyi* e o desenvolvimento ponderal e a condenação de carcaças em abatedouros. Esses autores detectaram infecção por essa espécie em 10-60% dos lotes infectados. Nesse experimento foi observada correlação positiva entre o grau de traqueíte por *C. baileyi* com o percentual de queda de ganho de peso, a presença de aerossaculite e a porcentagem de condenação de carcaças.

Meireles et al. (1998a) relataram a influência da infecção por *C. baileyi*, após inoculação via oral ou intratraqueal, nos parâmetros zootécnicos de

frangos de corte, alojados em gaiolas. Foi observada redução transitória do ganho de peso das aves infectadas, no período de maior eliminação de oocistos nas fezes.

Em outro experimento, (MEIRELES et al., 1999) constataram que *C. baileyi*, além de ser agente primário de enfermidade respiratória severa nas aves, aumenta sua susceptibilidade à infecção secundária por *E. coli*.

A interação de *C. baileyi* com outros agentes (*E. coli* e vírus da bronquite infecciosa das aves) também foi relatada por Blagburn et al. (1991), no trato respiratório de frangos de corte; foi observado sinergismo entre os agentes, no que se refere ao aumento de severidade no grau de inflamação, em pulmão e sacos aéreos.

Egyed et al. (2002) relataram, após infecção experimental via intratraqueal com *C. baileyi*, em galinhas, a presença de sinais clínicos respiratórios, como dispnéia e espirros e diminuição 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 na cloaca e bursa de Fabricius.

1.7 Infecção em Perus

Hoerr et al. (1978) descreveram o primeiro relato de *Cryptosporidium* sp., em epitélio dos seios nasais, traquéia e brônquios de perus, que apresentavam sintomas respiratórios e alto índice de mortalidade. Havia broncopneumonia caracterizada por necrose, envolvendo os parabrônquios, átrios e capilares aéreos, além de hemorragia, infiltração por heterófilos, células gigantes e colônias bacterianas.

Infecção por *Cryptosporidium* sp., no trato respiratório, também foi observada 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 fluido viscoso, claro e espumoso. Lesões semelhantes foram relatadas 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.

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

A infecção por *C. meleagridis*, em perus, apresenta característica subclínica (BERMUDEZ et al., 1988; WOODMANSEE et al., 1988) ou manifestação clínica de enterite (SLAVIN, 1955; GOODWIN et al., 1988b;), em alguns casos relacionada a outros patógenos (WAGES; FICKEN, 1989).

Gharagozlu et al. (2006) registraram, no Irã, ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* sp., em 17 (35,3%), de um total de 60 perus, de uma a sete semanas de idade, que apresentavam perda de tecido muscular, diarreia, letargia e redução no ganho de peso; os oocistos foram visualizados nas criptas do epitélio intestinal, principalmente jejuno e íleo.

1.8 Infecção em Codornas

Embora os isolados de *Cryptosporidium*, que acometem codornas, não tenham sido classificados, em nível de espécie, a infecção por *Cryptosporidium* nessas aves provavelmente é causada por *C. meleagridis* e *C. baileyi*, que infectam, respectivamente, o intestino e o trato respiratório.

Tham et al. (1982) relataram o primeiro caso de criptosporidiose em codornas, num lote de 1.000 aves, de quatro semanas de idade. Foram descritos sinais clínicos caracterizados por apatia, espirros e dificuldade respiratória, com morbidade de 50% e mortalidade de 10%.

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

as aves apresentavam diarreia. Macroscopicamente, o intestino delgado revelou-se com fluido claro e aquoso e o ceco distendido com fluido marrom e espumoso. As lesões microscópicas foram caracterizadas por atrofia das vilosidades intestinais e presença de enterócitos descamados da superfície, além de colonização epitelial por *Cryptosporidium* sp.. Ritter et al. (1986) descreveram lesões semelhantes em codornas que apresentavam diarreia e alto índice de mortalidade, com infecção concomitante com *Reovirus*.

Em codornas infectadas por *Cryptosporidium* sp. e *Mycoplasma gallisepticum*, Murakami et al. (2002) detectaram presença de conjuntivite, sinusite e traqueíte, com morbidade de 48% (36.000/75.000) e mortalidade de 5,7% por dia.

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

1.9 Infecção em Avestruzes

Em avestruzes, há relatos de infecção subclínica (GAJADHAR, 1993), prolapso de phallus e cloaca (ALLWRIGHT; WESSELS, 1993; BEZUIDENHOUT et al., 1993; PENRITH; BURGER, 1993; PENRITH et al., 1994) e necrose pancreática (JARDINE; VERWOERD, 1997).

No estado de São Paulo, foram encontrados avestruzes, apresentando prolapso de cloaca, relacionado à presença de mortalidade. Essas aves apresentavam infecção nos epitélios do reto, cloaca e bursa de Fabricius e oocistos com características morfológicas e moleculares semelhantes às de *C. baileyi* (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), e que posteriormente foi classificada como genótipo II de aves (NG et al., 2006).

1.10 Infecção em aves selvagens

1.10.1 Anseriformes

Infecção por *Cryptosporidium* sp., foi relatada no intestino grosso de cinco gansos de 14 dias de idade, com a presença de esquizontes e macrogametas aderidos à superfície epitelial, que apresentava perda ou encurtamento das microvilosidades no ponto de adesão do parasito e em áreas adjacentes (PROCTOR; KEMP, 1974).

Mason (1986) observou, em patos, criptosporidiose associada à conjuntivite e O'Donoghue et al. (1987) relataram sintomas respiratórios, com presença de excesso de muco na traquéia, cavidade nasal e seios infra-orbitais.

Em aves de vida livre, Graczyk et al. (1998) descreveram que gansos (*Branta canadensis*) podem representar uma fonte de contaminação ambiental, por meio de eliminação de oocistos de *C. parvum* nas fezes.

Em estudo realizado por Zhou et al. (2004), 23,4% (49/209) das amostras de fezes de gansos (*B. canadensis*) analisadas eram positivas para *Cryptosporidium*. Entre as espécies e genótipos identificados, havia os genótipos I e II de gansos, genótipo de pato, *C. parvum* e *C. hominis*.

A presença de *Cryptosporidium* em gansos foi estudada também por Jellison et al. (2004), que identificaram mais cinco novos genótipos de *Cryptosporidium*, e por Kassa et al. (2004) que, em dois períodos de colheita, encontraram, utilizando a técnica de ELISA direta, prevalência de *Cryptosporidium* sp. em 81,8%(9/11) e 90% (9/10).

1.10.2 Psitaciformes

Infecção por *Cryptosporidium* sp. em periquitos e araras foi detectada, pela primeira vez, por Ley et al. (1988), utilizando a técnica de Auramina O, em

esfregaços de fezes de várias espécies aviárias.

Morgan et al. (2000b) observaram infecção por *C. meleagridis* em epitélio das vilosidades do intestino delgado em um “Ring-neck” (*Psittacula krameri*).

Mediante utilização de microscopia ótica e eletrônica, Doster e Mahafey (1979) descreveram estágios evolutivos de *Cryptosporidium* sp. na cloaca de papagaios diadema (*Amazona autumnalis*).

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

1.10.3 Galliformes

Em relação à Ordem Galliformes, (MASON; HARTLEY, 1980) relataram a criptosporidiose, no trato respiratório, em um pavão azul de duas semanas de idade, que apresentava tosse espirros e corrimento óculo-nasal.

Em faisões, foi observada infecção por *Cryptosporidium* sp. relacionada a problemas respiratórios e conjuntivite (RANDALL, 1986); em ambos os casos não foram isolados outros agentes patogênicos.

Mais recentemente, Pagès-Manté et al. (2007) descreveram o primeiro relato de infecção por *C. meleagridis* em perdizes (*Alectoris rufa*), com presença de enterite em um lote com 60 casais de aves reprodutoras, de 4-25 dias de idade, com morbidade de 60-70% e mortalidade de 70%. Nessa mesma propriedade, em um surto posterior, foi descrita mortalidade de 89% em um lote de 450 aves. Havia presença de estágios evolutivos de *Cryptosporidium* no trato respiratório e no intestino. Como a caracterização molecular foi realizada somente em conteúdo intestinal, com identificação de *C. meleagridis*, os autores sugerem que a infecção respiratória poderia ser causada por *C. meleagridis*, em localização não usual, ou haveria co-infecção por *C. baileyi*.

1.10.4 Falconiformes

Van Zeeland et al. (2008) descreveram infecção por *C. baileyi* no trato respiratório superior, de três falcões (*Falco rusticolus* X *Falco cherrug*) que apresentavam dispnéia e vieram a óbito após algumas semanas.

1.10.5 Charadriiformes

Na Arábia saudita, Zylan et al. (2008) registraram o primeiro caso de enterite em aves, causada por *C. parvum*, em um alcaravão (*Burhinus oedicephalus*).

1.10.6 Criptosporidiose Aviária em Saúde Pública

Infecção por *Cryptosporidium*, em humanos, normalmente é causada por duas espécies, *C. hominis* ou *C. parvum*, caracterizando uma infecção zoonótica, com vários casos relatados na literatura (FAYER et al., 2000; MILLARD et al., 1994; SULAIMAN et al., 1998; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002; PREISER et al., 2003).

Diversos surtos de criptosporidiose têm sido descritos em populações humanas, e algumas das possíveis explicações seriam: 1) grande quantidade de oocistos que são excretados por hospedeiros infectados; 2) dose pequena de oocistos requerida para infecção (menos de 10 oocistos); 3) baixa especificidade por hospedeiros mamíferos (particularmente *C. parvum*); 4) pequeno tamanho dos oocistos; 5) o fato de os oocistos serem resistentes à inativação, em condições ambientais, e à ação do cloro utilizado no tratamento de água; 6) baixa velocidade de sedimentação na água; 7) o fato de os oocistos já serem eliminados esporulados nas fezes e, conseqüentemente, na forma infectante (OKHUYSEN, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000; SMITH et al., 2007). De acordo com Dillinghama et al., (2002) 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 e em pessoas que têm contato direto com animais.

A contaminação da água potável provém de várias fontes, como esgoto, rios, lagos (FAYER et al., 2000) e fezes de animais, como bovinos (PENG et al., 1997). Graczyk et al. (1996a; 1997a; 1997b; 1998) observaram eliminação de oocistos de *C. parvum* e *C. hominis* em fezes de gansos (*B. canadensis*) e sugerem a possível participação desses animais na epidemiologia da criptosporidiose humana.

Da mesma maneira, Jellison et al. (2007) e Ziegler et al. (2007) sugerem que aves podem ser fonte de *Cryptosporidium* spp. em casos de contaminação de reservatórios de água.

Além de contaminação de água, surtos de criptosporidiose podem se originar após ingestão de alimentos contaminados, como mexilhões, ostras e leite (FAYER et al., 1999; GELLETLIE et al., 1997; GRACZYK et al., 1999), 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., 1997) e alimentos industrializados, como bebidas (MILLARD et al., 1994).

Por meio de técnicas moleculares, várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* já foram descritos em humanos, entre os quais: *C. canis* (CAMA et al., 2003; PEDRAZA-DIAS et al., 2001; PIENIAZEK et al., 1999; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG 2008), *C. felis* (CAMA et al., 2003; PEDRAZA-DIAS et al., 2001; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008), *C. meleagridis* (CAMA et al., 2003; MCLAUCHLIN et al., 2000; PEDRAZA-DIAS et al., 2000; SMITH et al., 2007; XIAO et al., 2001; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) *C. muris* (GUYOT et al., 2001; SMITH et al., 2007; TIANGTIP; JONGWUTIWES, 2002; XIAO; FAYER, 2008), *C. suis* (SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008), genótipo suíno II (CAMA et al., 2003; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008), genótipo cervídeo (ONG et al., 2002; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) e

genótipo de macaco (SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008).

Portanto, animais domésticos ou silvestres, sejam mamíferos ou aves, podem atuar como fontes de infecção desses parasitos para outros animais e para o ser humano, pela contaminação de fontes de água ou de alimentos (OLSON et al., 2004; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

Estudos epidemiológicos indicam que a prevalência da espécie que infecta o homem varia de acordo com a região. Em Portugal, de 29 amostras humanas examinadas, 16 eram *C. parvum* e sete, *C. hominis* (ALVES et al., 2003). No Reino Unido, Suíça e França, *C. parvum* também é responsável pela maioria das infecções humanas (ALVES et al., 2000; GUYOT et al., 2001; MCLAUHLIN et al., 2000; MORGAN et al., 2000a). Já nos Estados Unidos, Austrália, Kenya, Tailândia e África do Sul, *C. hominis* é a espécie mais prevalente em infecções humanas (LEAV et al., 2002; MORGAN et al., 2000a; TIANGTIP; JONGWUTIWES, 2002). Na república Tcheca, de 11 isolados humanos, um era *C. meleagridis*, um *C. hominis* e nove *C. parvum* (HAJDUSEK et al., 2004). Na América do Sul, Xiao et al. (2001) encontraram, em 132 amostras de fezes de crianças, no Peru, infecção por *C. hominis* (67), *C. parvum* (8), *C. meleagridis* (7), *C. canis* (2) e *C. felis* (1).

No Brasil, Araújo et al. (2008) relataram *C. hominis* (8/14), *C. parvum* (4/14) e *C. meleagridis* (2/14), em amostras de crianças e de pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), no estado de São Paulo. Brantley et al. (2003) e Gatei et al. (2003); Bushen et al. (2006) e Gonçalves et al. (2006) descreveram mais quatro relatos de classificação molecular de *Cryptosporidium* no Brasil, com identificação de *C. hominis* e *C. parvum*.

No Peru Cama et al. (2008) observaram que, em crianças, infecções por *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* e *C. parvum* apresentam quadro clínico com menor gravidade do que infecções por *C. hominis*. Embora haja várias descrições de infecções por *C. meleagridis* no homem, ainda não há definição

sobre a participação de aves na cadeia epidemiológica de infecções humanas por esse parasita.

1.11 Diagnóstico

É necessária experiência para o diagnóstico de criptosporidiose, já que os oocistos e outros estágios evolutivos do gênero *Cryptosporidium* são menores que os de outros coccídios que infectam aves e ainda, são muito semelhantes às leveduras, o que pode resultar em diagnóstico falso-positivo (FAYER et al., 2000; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004).

De acordo com Egyed et al. (2002), para identificação de *Cryptosporidium* é necessária uma abordagem polifásica, utilizando-se técnicas moleculares, análise morfológica de oocistos e características biológicas, como especificidade por hospedeiro, patogenicidade, períodos pré-patente e patente e intensidade de excreção de oocistos.

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 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 (FALL et al., 2003; FAYER et al., 2000;). Além disso, os antígenos presentes na parede de oocistos são conservados para todo o gênero, não sendo possível a diferenciação entre espécies, por testes imunológicos (FAYER et al., 2000).

1.11.1 Visualização de Oocistos e Outros Estágios Evolutivos por Métodos de Concentração e/ou Coloração

O método de centrífugo-flutuação em solução de Sheather é o mais comumente utilizado para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* a partir de

amostras fecais, por apresentar custo mais baixo. Os oocistos são visualizados como estruturas brilhantes, contendo grânulos negros, em microscopia de contraste de fase, ou como estruturas translúcidas, com coloração levemente rósea e com grânulos em seu interior, em microscopia óptica de campo claro (SRÉTER; VARGA, 2000).

Há ainda, outras técnicas que podem ser empregadas na detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, como a coloração negativa com verde malaquita, na qual os oocistos são observados como estruturas brilhantes, envoltas por um fundo verde (ELLIOT et al., 1999), e a técnica de Kinyoun (álcool ácido resistente), em que os oocistos refletem coloração rósea a vermelha, contra um fundo verde (MA; SOAVE, 1983).

A visualização de *Cryptosporidium* em tecidos é realizada por meio de esfregaços de mucosas corados com a técnica de coloração de Kinyoun, que permite excelente visualização de estágios evolutivos de *Cryptosporidium* (LATIMER et al., 1988). A técnica mais utilizada para coloração de cortes histológicos é a hematoxilina-eosina (HE), na qual os estágios evolutivos são observados como corpos esféricos basófilos, de 2,0 - 7,5 µm, na superfície das células epiteliais. Em cortes histológicos, são empregadas são as colorações à base de prata, ácido periódico de Schiff e microscopia eletrônica, de transmissão ou de varredura, para visualização da morfologia ultra-estrutural desse parasito (PETRY, 2004; VALIGUROVÁ et al., 2008).

1.11.2 Métodos Imunológicos e Moleculares

Entre os métodos imunológicos mais utilizados para diagnóstico de criptosporidiose, encontram-se o ensaio imunoenzimático (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008; SILVA et al., 2003) e a reação de imunofluorescência direta (BIALEK et al., 2002; FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008), ambos baseados em princípios imunológicos. Os testes imunológicos têm substituído a análise microscópica em fezes, para pesquisa de oocistos ou de antígenos solúveis (KHEL et al., 1995). Essas técnicas apresentam melhor sensibilidade e

especificidade que as técnicas tradicionais de coloração e reduzem o tempo e trabalho para detecção de oocistos (ARROWOOD; STERLING, 1989; JOHNSTON et al., 2003).

As técnicas moleculares, como a PCR, se caracterizam por alta sensibilidade e especificidade (BALATBAT et al., 1996; MORGAN; THOMPSON, 1998; JEX et al., 2008). Porém, seu custo elevado, quando comparado ao custo de outros métodos de detecção de *Cryptosporidium*, em amostras fecais, faz com que a detecção e caracterização molecular não sejam utilizadas 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 (DNA), gerados por enzimas de restrição (RFLP) e/ou sequenciamento automático de ácidos nucleicos, são o único método de diferenciação confiável entre as diferentes espécies de *Cryptosporidium* (SARGENT et al., 1998; MORGAN et al., 1999a; SRÉTER; VARGA, 2000; JEX et al., 2008).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* geralmente é realizada por meio da PCR e suas variantes, seguida da RFLP ou de sequenciamento dos fragmentos amplificados. O *locus* mais utilizado é o gene da subunidade 18S do RNA ribossômico (18S rRNA). Esse *locus* apresenta cinco cópias por genoma e, pelo fato de caracterizar evolução mais lenta e menor polimorfismo, sendo também, o *locus* de escolha para amostras de animais que possam estar infectados por espécies ou genótipos ainda não classificados (MORGAN et al., 2000a; SPANO et al., 1998; XIAO et al., 1999a; 1999b; 2000b; 2004).

Existem outros *loci* que podem ser utilizados, quando se observa maior polimorfismo, como os genes da actina (SULAIMAN et al., 2002), da proteína do choque térmico-HSP-70 (MORGAN et al., 1999b) e da proteína da parede de oocistos-COWP (XIAO et al., 2000a). Esses *loci* apresentam alto polimorfismo interespecies e, portanto, são muito importantes na análise

genética de espécies ou genótipos geneticamente similares, como *C. baileyi* e *Cryptosporidium* sp. de avestruzes (XIAO et al., 2004).

Em relação à PCR, devido às variações do método de extração de DNA, do gene utilizado e do protocolo da reação, e à presença de inibidores da PCR, extraído de amostras fecais (CAREY et al., 2004), há relatos de resultados superiores (MORGAN et al., 1998b), similares (BIALEK, et al., 2002) ou inferiores (MAGI et al., 2006), quando essa técnica é comparada com métodos imunológicos ou de coloração.

1.12 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram determinar a periodicidade de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium*, por um período de 13 meses, e sua associação com sinais clínicos e com a taxa de mortalidade, e realizar a caracterização molecular desse coccídio, em passeriformes mantidos em cativeiro.

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.

ALLWRIGHT, D.M.; WESSELS, J. *Cryptosporidium* species in ostriches. **The Veterinary Record**, v. 133, p. 24, 1993.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus*

aurata L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1007-1021, 2002.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M. I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M. J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁSQUEZ, S.; NIETO, J. M. *Cryptosporidium scopthalmi* 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.; MATOS, O.; SPANO, F.; ANTUNES, F. PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected patients in Lisbon, Portugal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 94, p. 291-297, 2000.

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.

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**, v. 52, p. 702-705, 2008.

ARAÚJO, A.J.; KANAMURA, H.Y.; ALMEIDA, M.E.; GOMES, A.H.; PINTO, T.H.; SILVA, A.J. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 139-143, 2008.

ARGENZIO, R. A.; LECCE, J.; POWELL, D. W. Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. **Gastroenterology**, v. 104, p. 440-447, 1993.

ARROWOOD, M. J.; STERLING, C. R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1490-1495, 1989.

BALATBAT, A. B.; JORDAN, G. W.; TANG, Y. J.; SILVA JÚNIOR, J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1769-1772, 1996.

BARTA, J. R.; THOMPSON, A.R.C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 463-468, 2006.

BEKÉSI, L.; SRÉTER, T.; DOBOS-KOVÁCS, M.; VARGA, I. Attempts to transmit *Cryptosporidium baileyi*, *C. muris* and *C. parvum* to aquatic lower vertebrates. **Folia Parasitologica**, v. 45, p. 175-176, 1998.

BELTON, D. J.; POWEL, I. B. Cryptosporidiosis in love birds (*Agapornis* sp.). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 35, p. 15, 1987.

BERMUDEZ, A.J.; LEY, D.H.; LEVY, M.G.; FICKEN, M.D.; GUY, J.S.; GERIG, T.M. Intestinal and bursal cryptosporidiosis in turkeys following inoculation with *Cryptosporidium* sp. isolated from commercial poults. **Avian Diseases**, v. 32, p. 445-450, 1988.

BEZUIDENHOUT, A.J.; PENRITH, M.L.; BURGER, W.P. Prolapse of the phallus and sewer in the ostrich (*Struthio camelus*). **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 64, p. 156-168, 1993.

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 (*Staganoplura bella*: passeriformes, estrilgidae). **Avian Diseases**, v. 34, p. 1027-1030, 1990.

BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S.; HOERR, F.J.; DAVIS, J.F.; GIAMBRONE, J.J. Pathobiology of cryptosporidiosis (*C. baileyi*) in broiler chickens. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 25S-28S, 1991.

BOROWSKI, H.; CLODE, P.L.; THOMPSON, R.C.A. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 509-516, 2008.

BRANTLEY, R.K.; WILLIAMS, K.R.; SILVA, T.M.J.; SISTROM, M.; THIELMAN, N.M.; WARD, H.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. AIDS-associated diarrhoea 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.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. IBAMA. Estrutura regimental do IBAMA, e, em cumprimento ao disposto no artigo 2º, inciso III da lei nº 6.938, de 21 de agosto de 1981, nos artigos 16, 17 e 21 da lei nº 5.197, de 03 de

janeiro de 1967. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 6 jan. 2003. Seção 1, p. 311.

BROWNSTEIN, D. G.; STRANDBERG, J.D.; MONTALI, R.J.; BUSH, M.; FORTNER, J. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 606-617, 1977.

BULL, S.; CHALMERS, R.; STURDEE, A.P.; CURRY, A.; KENNAUGH, J. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p.195-197, 1998.

BUSHEN, O.Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R.C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; FAYER, R.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 378-384, 2006.

CAMA, V.A.; BERN, C.; ROBERTS, J.; CABRERA, L.; STERLING, C.R.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R.H.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1567-1574, 2008.

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: Cryptosporidiidae) 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.

CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v. 85, p. 899-904, 1999.

CARVALHO, M. V. P. **Estudos Citogenéticos na Família Fringillidae (Passeriformes-Aves)**. 1989. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

CEVALLOS, A.M.; ZHANG, X.; WALDOR, M.K.; JAISON, S.; ZHOU, X.; TZIPORI, S.; NEUTRA, M.R.; WARD, H.D. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4108-4116, 2000.

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

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

COBRAP. **Minutas para Instruções Normativas para a Criação Amadorista e Comercial de Passeriformes**. Referimo-nos ao ofício n.301/2006-DIFAP, de 13 de julho de 2006. Disponível em:<http://www.cobrap.org.br/site/artigos_vis.php?id=498> . Acesso em 29 jan. 2010.

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* end *Cryptosporidium meleagridis*. **Revista Romana de Medicina Veterinária**, 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.

DHILLON, A.S.; THACKER, H.L.; DIETZEL, A.V.; WINTERFIELD, R.W. Respiratory cryptosporidiosis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 256, 747-751, 1981.

DILLINGHAMA, R. A.; LIMAB, A. A.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**. v. 4, p. 1059-1066, 2002.

DITRICH, O.; KOPÁČEK, P.; KUCEROVÁ, Z. Antigenic characterization of human isolates of cryptosporidia. **Folia Parasitologica**, v. 40, p. 301-305, 1993.

DITRICH, 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-lored parrots (*Amazona autumnalis*). **Avian Diseases**, v. 23, p. 654-661, 1979.

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 of 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.

ENRIQUEZ, F.J.; RIGGS, M.W. Role of immunoglobulin A monoclonal antibodies against P23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4469-4473, 1998.

FALL, A.; THOMPSON, R.C.A.; HOBBS, R.P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**, v. 59, p. 399-402, 2003.

FAYER, R. General biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**, Boca Raton: CRC Press, p. 1-42, 2008.

FAYER, R.; LEEK, R.G. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on *in vitro* excystation of *Cryptosporidium*. **Journal of Protozoology**, v. 31, p. 567-569, 1984.

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 192-200, 2009.

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.; 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.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v. 156, p.191-198, 2008.

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, p. 1415-1422, 2001.

FLETCHER, O.J.; MUNNELL, J.F.; PAGE, R.K. Cryptosporidiosis of the bursa of Fabricius of chickens. **Avian Diseases**, v. 19, p. 630-639, 1975.

GAJADHAR, A.A. *Cryptosporidium* species in imported ostriches and consideration of possible implications for birds in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 115-116, 1993.

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.; RAHBARI, S.; BOKAIE, S.; JAHANZAD, I.; RAZAVI, A.N.E. Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 53, p. 282–285, 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.

GONÇALVES, E.M.N.; DA SILVA, A.J.; EDUARDO, M.B.P.; UEMURA, I.H.; MOURA, I.S.; CASTILHO, V.L.P.; CORBETT, C.E.P. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, p. 119-126, 2006.

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

GOODWIN, M. A. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Avian Pathology**, v. 18, p. 365-384, 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. Intestinal cryptosporidiosis in chickens. **Avian Diseases**, v. 33, p. 770-777, 1989.

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.

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.; STEFFENS, W.L.; RUSSEL, I.D.; BROWN, J. Diarrhea associated with intestinal cryptosporidiosis in turkeys. **Avian Diseases**, v.32, p. 63-67, 1988b.

GOODWIN, M.A.; LATIMER, K.S.; BROWN, J.; STEFFENS, W.L.; MARTIN, P.W.; RESSURRECION, R.S.; SMELTZER, M.A.; DICKSON, T.G. Respiratory cryptosporidiosis in chickens. **Poultry Science**, v. 67, p. 1684-1693, 1988a.

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.; 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.; 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.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R.; ANDERSON, M.S. Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3234-3237, 1996a.

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.; 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.

GUY, J.S.; LEVY, M.G; LEY, D.H.; BARNES, H.J.; GERIG, T.M. Interactions of reovirus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. **Avian Diseases**, v. 32, p. 381-390, 1988.

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.

HAJDUSEK, O.; DITRICH, O.; SLAPETA, J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 183-192, 2004.

HARRIS, J.R.; PETRY, F. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 839-849, 1999.

HIJJAWI, N.S.; MELONI, B.P.; MORGAN, U.M.; OLSON, M.E.; THOMPSON, R.C.A. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni* with evidence for the existence of novel extracellular stages in the *Cryptosporidium* life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1719-1726, 2002.

HIJJAWI, N.S.; MELONI, B.P.; NG'ANZO, M.; RYAN, U.M.; OLSON, M.E.; COX, P.T.; MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C.A. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 769–777, 2004.

HOERR, F.J.; RANCK, F.M.; HASTINGS, T.F. Respiratory cryptosporidiosis in turkeys. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, p. 1591-1593, 1978.

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

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 28, p. 13-35, 1979.

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.

JARDINE, J.E.; VERWOERD, D.J. Pancreatic cryptosporidiosis in ostriches. **Avian Pathology**, v. 26, p. 665-670, 1997.

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

JELLISON, K. L.; DISTEL, D. L.; HEMOND, H. F.; SCHAUER, D. B. Phylogenetic analysis implicates birds as a source of *Cryptosporidium* spp. oocysts in agricultural watersheds. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 3620-3625, 2007.

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**, v. 26, p. 304-317, 2008.

JIRKŮ, M.; VALIGUROVÁ, A.; KOUDELA B.; KŘÍŽEK J.; MODRÝ D.; ŠLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitologica**, v. 55, p. 81-94, 2008.

JOHNSTON, S.P.; BALLARD, M.M.; BEACH, M.J.; CAUSER, L.; WILKINS, P.P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 623-626, 2003.

KAPPE, S.; BRUDERER, T.; GANTT, S.; FUJIOKA, H.; NUSSENZWEIG, V.; MENARD, R. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in apicomplexan parasites. **Journal of Cellular Biology**, v. 147, p. 937-943, 1999.

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.

KHEL, K.S.C.; CICIRELLO, H.; HAVENS, P.L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 416-418, 1995.

KOUDELA, B.; MODRÝ, D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. **Folia Parasitologica**, v. 45, p. 93-100, 1998.

KUO, C.H.; WARES, J.P.; KISSINGER, J.C. The apicomplexan whole genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 2689-2698, 2008.

LANGER, R.C.; SCHAEFER, D.A.; RIGGS, M.W. Characterization of an intestinal epithelial cell receptor recognized by the *Cryptosporidium parvum* sporozoite ligand CSL. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1661-1670, 2001.

LATIMER, K.S.; GOODWIN, M.A.; DAVIS, M.K. Rapid cytologic diagnosis of respiratory cryptosporidiosis in chickens. **Avian Diseases**, v. 32, p. 826-830, 1988.

LEAV, B.A.; MACKAY, M.R.; ANYANWU, A.; O'CONNOR, R.M.; CEVALLOS, A.M.; KINDRA, G.; ROLLIN, N.C.; BENNISH, M.L.; NELSON, R.G.; WARD, H.D. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3881-3890, 2002.

LEDESMA, M. A.; MARTINEZ, P. A.; CALDERON, P. S.; BOERISE, J. M.;

MERILES, J. M. Descrição do Cariótipo e Padrões de Bandas C e NOR em *Pheucticus aureoventris* (Emberizidae, Cardinalinae. **Revista Brasileira de Ornitologia**, São Paulo, v. 14, p. 59-62, 2006.

LEVINE, N. D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Parasitology**, v. 66, p. 830-834, 1980.

LEVY, M.G.; LEY, D.H.; BARNES, H.J. Experimental cryptosporidiosis and infectious bursal disease virus infection on specific-pathogen-free chickens. **Avian Diseases**, v. 32, p. 803-811, 1988.

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.; ERNEST, J.A. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in chickens. **Journal of Parasitology**, v. 73, p. 242-244, 1987.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, M.; MEAD, J.R.; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos Taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 91-95, 2000.

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**, v. 147, p. 824-828, 1983.

MAGI, B.; CANOCCHI, V.; TORDINI, G.; CELLSEI, C.; BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**, v. 98, p. 150-152, 2006.

MASON, R. W. Conjunctival 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.; FIGUEIREDO, P. C. Isolamento e identificação de *Cryptosporidium baileyi*, (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em frangos de corte. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1,2, p. 125-130, 1992.

MEIRELES, M. V.; SOARES, M. R.; SANTOS, M. M. A. B.; 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.

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.; 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.; PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; COSTA, A. J.; LUVIZOTTO, M. C. R.; DORETTO JUNIOR, L.; 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.

MERILES, J. M.; LEDESMA, M. A.; GUNSKI, R. J. Análisis Cariotípico em una Población de *Zonotrichia capensis* (Aves: Passeriformes) del Valle de San Salvador de Jujuy. In: JORNADAS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICO TECNOLÓGICAS, Pousadas Misiones. **Anales...** Pousadas Misiones: Editora, p.168, 2003.

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

MORGAN, U.M.; MONIS, P.T.; FAYER, R.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R.C.A. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 1126-1133, 1999b.

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, 1999a.

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, p. 995-998, 1998b.

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, 2000b.

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, 2000a.

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.

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.

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

NACIRI, M. ; MAZZELLA, O. ; COUDERT, F. Interactions cryptosporidies-virus sauvage ou vaccinal de la maladie de Marek chez le poulet. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 165, p. 383-387, 1989.

NAKAMURA, A.A; SIMÕES, C.D; ANTUNES, G.R; SILVA, C.D; MEIRELES, M.V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.166, p. 47-51, 2009.

NESTERENKO, M.V.; WOODS, K.M.; UPTON, S.J. Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1454, p. 165-173, 1999.

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

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

OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L. *Cryptosporidium* virulence determinants – are we there yet? **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 517-525, 2002.

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.; ROXAS, C.R.; GILMAN, R.H.; MILLER, N.J.; CABRERA, L.; TAQUIRI, C.; STERLING, C.R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region of Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 683-686, 1997.

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, p. 275-278, 2007.

PALKOVIC, L.; MAROUSEK, V. The pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912 and *C. baileyi* Current, Upton et Haynes, 1986 for chickens. **Folia Parasitologica**, v. 36, p. 209-217, 1989.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Remedia - Klinicka Mikrobiologie**, v. 3, p. 290-301, 1999.

PAVLÁSEK, I. Findings of Cryptosporidia in the stomach of chickens and of exotic and wild birds. **Veterinarstvi**, v. 51, p. 103-108, 2001.

PAVLÁSEK, I.; RYAN, U. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. **Experimental Parasitology**, v. 188, p. 434-437, 2008.

PAVLÁSEK, I.; LÁVICKOVÁ, M.; HORÁK, P.; KRÁL, J.; KRÁL, B. *Cryptosporidium varanii* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald

monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. **Gazella**, v. 22, p. 99-108, 1995.

PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; IVERSEN, A. M.; STANLEY, P. J.; MCLAUHLIN, 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.

PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; MCLAUHLIN, 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.

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.

PENRITH, M.L.; BURGER, W.P. A *Cryptosporidium* sp. in an ostrich. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 64, p. 60-61, 1993.

PENRITH, M.L.; BEZUIDENHOUT, A.J.; BURGER, W.P.; PUTTERILL, J.F. Evidence of cryptosporidial infection as a cause of prolapse of the phallus and cloaca in ostrich chicks (*Struthio camelus*). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 283-289, 1994.

PETRY, F. Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, p. 586-601, 2004.

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.

POWER, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium macropodum* n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern gray kangaroos *Macropus giganteus*. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1114-1117, 2008.

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.

RANDALL, C. J. Conjunctivitis in pheasants associated with cryptosporidial infection. **The Veterinary Record**, v. 118, p. 211, 1986.

RHEE, J.K.; KIM, H.C.; LEE, S.B.; YOON, S.Y. Immunosuppressive effect of *Cryptosporidium baileyi* on vaccination against Newcastle disease in chickens. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, p. 121-125, 1998.

RIERA, R. F.; SANTOS, M. M. A. B.; ROBERTO, L. O.; MEIRELES, M. V. Detecção de *Cryptosporidium* sp. em avestruzes (*Struthio camelus*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 30., 2003. Manaus. anais... Manaus: CONBRAVET, 2003.1 CD Rom.

RITTER, G.D.; LEY, D.H.; LEVY, M.G.; GUY, J.S.; BARNES, H.J. Intestinal cryptosporidiosis and reovirus isolation from Bobwhite quail (*Colinus*

virginianus) with enteritis. **Avian Diseases**, v. 30, p. 603-608, 1986.

ROSALES, M.J.; PERÉZ CORDÓN, G.; SÁNCHEZ, M. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. **Acta Tropica**, v. 95, p. 74–78, 2005.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 113-120, 2009.

RYAN, U.M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 22–26, 2008.

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.

SAGODIRA, S.; BUZONI-GATEL, D.; IOCHMANN, S.; NACIRI, M.; BOUT, D. Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. **Vaccine**, v. 17, p. 2346-2355, 1999.

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, 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.

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.

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.

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.

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, p. 3255-3259, 1998.

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

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.

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.

SUNDERMANN, C.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. In vitro excystation of *Cryptosporidium baileyi* from chickens. **Journal of Protozoology**, v. 34, p. 28-30, 1987.

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, 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.

TILLEY, M.; UPTON, S.J.; FREED, P. S. A comparative study of the biology of *Cryptosporidium serpentis* and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 21, p. 463–467, 1990.

TUMOVÁ, T.; SKRIVAN, M.; MAROUNEK, M.; PAVLÁSEK, I.; LEDVINKA, Z. Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. **Avian Diseases**, v. 46, p. 203–207, 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.

TYZZER, E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v. 23, p. 487-509, 1910.

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

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

VALIGUROVÁ, A.; JIRKŮ, M.; KOUDELA, B.; GELNAR, M.; MODRÝ, D.; SLAPETA, J. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 913-922, 2008.

VAN ZEELAND Y.R.A.; SCHOEMAKER, N.J.; KIK, M.J.L.; VAN DER GIESSEN, W.B. Upper respiratory tract infection caused by *Cryptosporidium baileyi* in three mixed-bred falcons (*Falco rusticolus* X *Falco cherrug*). **Avian Diseases**, v. 52, p. 357-363, 2008.

VETTERLING, J.M.; JERVIS, H.R.; MERRILL, T.G.; SPRINZ, H. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the Guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. **Journal of Protozoology**, v. 18, p. 243-247, 1971.

WAGES, D.P.; FICKEN, M.D. Cryptosporidiosis and turkey viral hepatitis in turkeys. **Avian Diseases**, v. 33, p. 191-194, 1989.

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.

WOODMANSEE, D.B.; PAVLÁSEK, I.; POHLENZ, J.F.L.; MOON, H.W. Subclinical cryptosporidiosis of turkeys in Iowa. **Journal of Parasitology**, v. 74, 898-900, 1988.

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

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

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

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

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.; 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, p. 5499- 5502, 2000a.

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, p. 1578-1583, 1999a.

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

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, p. 4211-4215, 2004.

ZIEGLER, P.E.; WADE, S.E.; SCHAAF, S.L.; STERN, D.A.; NADARESKI, C.A.; MOHAMMED, H.O. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 176–184, 2007.

ZYLAN, K.; BAILEY, T.; SMITH, H.V.; SILVANOSE, C.; KINNE, J.; SCHUSTER, R.K.; HYLAND, K. An outbreak of cryptosporidiosis in a collection of stone curlews (*Burhinus oedicnemus*) in Dubai. **Avian Pathology**, v. 37, p. 521-526, 2008.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO FÍSICA, EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM PASSERIFORMES

Deuvânia Carvalho da Silva, Marcelo Vasconcelos Meireles

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual, São Paulo, Rua Clóvis Pestana, 793, CEP 16050-680, Bairro Dona Amélia, Araçatuba, SP. deuvania-carvalho@hotmail.com

RESUMO - Devido à carência de informações relacionadas à epidemiologia da infecção por *Cryptosporidium* spp. em passeriformes, neste trabalho objetivou-se determinar a periodicidade da eliminação fecal de oocistos de *Cryptosporidium* spp, após infecção natural, os sinais clínicos, a presença de mortalidade, e a caracterização molecular desse coccídio. Foram colhidas 480 amostras de fezes, provenientes de 40 aves, sendo 372 amostras de 31 aves adultas e 108 amostras de nove filhotes até 12 semanas de vida, com periodicidade mensal, no período de setembro de 2007 a setembro de 2008, com exceção do mês de abril. As aves estavam alojadas em cinco criatórios, com criação de bicudo (*Oryzoborus maximiliani*), curió (*Oryzoborus angolensis*), azulão (*Passerina brissonii*) e coleira do brejo (*Sporophila collaris*). As amostras foram conservadas em bicromato de potássio 2,5%, a 4°C, até o processamento. Os oocistos foram purificados por centrífugo-flutuação em solução de Sheather, seguindo-se a extração do DNA genômico dos oocistos e a classificação molecular, por meio da reação em cadeia de polimerase-*nested*, para amplificação de fragmentos da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico. A eliminação fecal intermitente de oocistos de *Cryptosporidium* foi observada, por meio de positividade para DNA desse parasito, em 91 (24,5%)

amostras de aves adultas e 14 (13%) de aves jovens. O sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados possibilitou a identificação de somente *Cryptosporidium galli*. Embora todos os criatórios tivessem aves positivas para *C. galli*, a presença de morbidade ou mortalidade foi observada em aves de somente um criatório, e estava associada à infecção concomitante com *Escherichia coli* e *Isospora* sp. Este é o primeiro relato de infecção por *C. galli* em *P. brissonii*, *O. maximiliani* e *S. collaris*.

Palavras-Chave: *Cryptosporidium* spp., Passeriformes, caracterização molecular, caracterização clínica, epidemiologia.

ABSTRACT - Due to the lack of information related to the epidemiology of *Cryptosporidium* infection in passerine birds, this study aimed to determine the frequency of fecal shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts, after natural infection, the clinical signs and the presence of mortality, and accomplish its molecular characterization. Four hundred and eighty fecal samples were collected from 40 birds, 372 samples from 31 adult birds and 108 samples from young birds (up to 12 months old), housed in five herds, monthly, from September 2007 to September 2008, with the exception of the April. The birds were originated from flocks were the following species were herd: great-billed seed-finch (*Oryzoborus maximilian*), lesser seed-finch (*Oryzoborus angolensis*), ultramarine grosbeak (*Passerina brissonii*) and rusty-collared seedeater (*Sporophila collaris*). The samples were preserved in 2.5% potassium dichromate 2.5% at 4°C, until processing. The oocysts were purified by centrifugal flotation in Sheather solution, followed by genomic DNA extraction from oocysts and molecular characterization using the nested polymerase chain reaction for amplification of fragments of the 18S subunit ribosomal RNA gene. Intermittent shedding oocysts was observed by positive amplification for *Cryptosporidium* spp. in 91 (24.5%) samples of adult birds and 14 (13%) of young birds. The sequencing of the amplified fragments allowed the

identification of *Cryptosporidium galli*. Although all the aviaries had birds positive for *C. galli*, morbidity or mortality was observed in birds from only one aviary, and was associated to concomitant infection with *Escherichia coli* and *Isospora* sp. This is the first report of infection by *C. galli* in *Oryzoborus maximiliani*, *Passerina brissonii*, and *Sporophila collaris*.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., Passeriformes, molecular characterization, clinical characterization, epidemiology.

Introdução

A ordem Passeriformes pertence à classe Aves e totaliza por volta de 6 mil espécies. Várias espécies são criadas em cativeiro, entre elas o azulão (*Passerina brissonii*), coleira do brejo (*Sporophila collaris*), curió (*Oryzoborus angolensis*) e bicudo (*Oryzoborus maximiliani*), que estão entre as aves mais populares e apresentam alto valor comercial. Biólogos e veterinários sempre são questionados, por criadores, sobre as doenças que acometem aves criadas em cativeiro. No entanto, há poucas informações, na literatura científica, relacionadas às diversas enfermidades de passeriformes, incluindo a criptosporidiose.

Cryptosporidium é um protozoário que pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Coccidea, Ordem Eucoccidiorida e Família Cryptosporidiidae (FAYER, 2007). A criptosporidiose em aves já foi descrita em diversas espécies, em diversos continentes (RYAN, 2009). Três espécies foram descritas em aves: *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Cryptosporidium galli* (CURRENT et al., 1986; RYAN et al., 2003; SLAVIN, 1955).

Cryptosporidium baileyi apresenta tropismo pelo trato respiratório, cloaca e bursa de Fabricius, e é responsável por doenças respiratórias (Current et al., 1986; Sréter; Varga, 2000) *C. meleagridis* parasita células epiteliais de intestino delgado, causando enterite e mortalidade em aves (GHARAGOZLOU et al.,

2006; PAGÈS-MANTE et al., 2007; SLAVIN,1955), podendo ainda infectar mamíferos (SRÉTER; VARGA, 2000), inclusive o ser humano (XIAO; FAYER, 2008), em alguns países com frequência semelhante ou superior à de infecções por *Cryptosporidium parvum* (CAMA et al., 2003; XIAO et al., 2001).

Cryptosporidium galli parasita o proventrículo (RYAN et al., 2003), podendo causar infecções crônicas, em sua maioria associadas a outros agentes etiológicos (ANTUNES et al., 2008; BLAGBURN et al., 1990; LINDSAY et al., 1991). Infecção natural por esse parasito foi relatada em calau (*Buceros rhinoceros*), calopsita (*Nymphicus hollandicus*), canário (*Serinus canaria*), curió (*Oryzoborus angolensis*), galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*), galo de campina (*Paroaria dominicana*), flamingo cubano (*Phoenicopterus ruber ruber*), periquito turquesa (*Neophema pulchella*), pintarroxo de bico roxo (*Pinicola enucleator*), várias espécies de tentilhões (Spermetidae e Fringillidae), tetraz (*Tetrastes bonasia rupestris*) e urogalo (*Tetrao urogallus*) (ANTUNES et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009; NG et al., 2006; RYAN et al., 2003).

De acordo com Ryan (2009), há vários genótipos de *Cryptosporidium* que infectam aves, sem classificação em nível de espécie, como os genótipos I, II, III e IV, em várias espécies de aves (NG et al., 2006), o genótipo de avestruzes, correspondente ao genótipo II de aves (MEIRELES et al., 2006; SANTOS et al., 2005), cinco genótipos de gansos (JELLISON et al., 2004; XIAO et al., 2004; ZHOU et al., 2004) e os genótipos de pato negro e de galinhola (MORGAN et al., 2001).

Em aves, ainda há poucas informações a respeito de infecções por *Cryptosporidium* spp., principalmente no Brasil, particularmente em relação às suas características clínicas e epidemiológicas. Os objetivos deste trabalho foram determinar a periodicidade de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium*, por um período de 13 meses, e sua associação com sinais clínicos e com a taxa de mortalidade, e realizar a caracterização molecular desse coccídio, em passeriformes mantidos em cativeiro.

Material e Métodos

Espécies de passeriformes

Foram selecionados cinco criatórios, na cidade de Araçatuba-SP., com criação mista de bicudos (*Oryzoborus maximiliani*) e curiós (*Oryzoborus angolensis*). Em um criatório havia ainda criação de azulão (*Passerina brissonii*) e coleira do brejo (*Sporophila collaris*).

Amostras de fezes

Foram colhidas 12 amostras de cada ave, totalizando 480 amostras, provenientes de 40 aves, por meio de colheita individual, no fundo da gaiola, com periodicidade mensal, no período de setembro de 2007 a setembro de 2008, com exceção do mês de abril. As amostras foram provenientes das quatro espécies de aves, sendo 372 de aves adultas, em sua maioria fêmeas (a partir de um ano de idade) e 108 eram de filhotes (duas semanas a 12 meses de idade), sem determinação do sexo. O cronograma de colheita obrigatoriamente incluiu o período reprodutivo (aproximadamente setembro a dezembro) e o período de muda de penas (aproximadamente janeiro a março).

As amostras foram armazenadas em bicromato de potássio 2,5% (concentração final), a 4° C e, posteriormente, foram submetidas à concentração e purificação de oocistos por centrífugo-flutuação em solução de Sheather. O sedimento resultante do processo de purificação foi armazenado em solução salina fosfatada tamponada, pH 7,2, adicionada de antibióticos e antifúngico (estreptomicina, 100 mg/ml; penicilina G, 100 UI/ml e anfotericina B, 0,25 mg/ml), e refrigeradas a 4° C.

Pesquisa de *Cryptosporidium*

Todas as 480 amostras foram submetidas à pesquisa de

Cryptosporidium por meio da reação em cadeia de polimerase-*nested* (nPCR), para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do rRNA (18S rRNA) (XIAO et al., 1999), com posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados.

Avaliação do manejo sanitário, presença de sinais clínicos e de mortalidade

Em todos os criatórios foi utilizado um questionário, com informações relacionadas aos manejos sanitário e nutricional e à presença de sintomatologia clínica ou de mortalidade. Nas aves que vieram a óbito, foi pesquisada a presença de *Cryptosporidium*, em raspados de mucosa de intestino e proventrículo, por meio da técnica de Kinyoun. As amostras positivas foram submetidas à caracterização molecular, por meio de *nested* PCR (nPCR), para amplificação de fragmentos da 18S rRNA.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos oocistos foi extraído por meio de técnica descrita por (BOOM et al., 1990) com adaptações, conforme descrição a seguir: o sedimento resultante do processo de concentração e purificação em solução de Sheather foi diluído em 300µl de tampão de lise [(12,5% chelex 100® Bio-rad, Hercules, Califórnia, USA), 1% polivinilpirrolidona K-90 (USB, Cleveland, Ohio, USA), 10 mM Tris-HCl, 10 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)] + 5 µl de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) e vortexado vigorosamente. Os microtubos foram submetidos a congelamento em nitrogênio líquido, por um minuto, e descongelamento a 65°C, por três minutos, por cinco vezes. Em seguida, foram adicionados 20 µl de proteinase K (25 mg/ml), com incubação a 65°C, por duas horas, a 400 rpm. Para remoção de proteínas e lipídeos, 1.000 µl de tampão L6 [0,1 M Tris-Cl pH 6,4, 6 M isotiocianato de guanidina (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 10 mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 1 % triton X-100)] foram adicionados à suspensão, que foi

incubada a 60°C, a 900 rpm, e em seguida centrifugada a 16.100 g, por cinco minutos, para remoção do chelex e dos debris. O sobrenadante 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 16.100 g, por três minutos, e o sobrenadante foi descartado em seguida. A sílica presente no sedimento foi lavada duas vezes, por centrifugação, a 12.000 g, com 500 µl de tampão L2 (0,1 M Tris-Cl pH 6,4, 6 M isotiocianato de guanidina), duas vezes com 500 µl de 80% etanol e uma vez com 500 µl de 100% acetona. O microtubo foi invertido para descarte da acetona e colocado em banho seco, a 58°C, por 10 minutos, com a tampa aberta, para evaporação da acetona restante no sedimento. Com o objetivo de recuperação do DNA, 150µl de TE (10mM Tris, 1 mM EDTA) 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 16.100 g, por três minutos, e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C.

Nested PCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados

Para amplificação do fragmento do gene da subunidade 18S do rRNA, foram utilizados os iniciadores descritos por Xiao et al. (1999), adicionando-se albumina sérica bovina (5pMol/µl) no *mix* da nPCR. Como controle positivo e negativo foram utilizados, respectivamente, DNA de *C. parvum* e água ultra-pura. O fragmento amplificado (~830 bp), resultante da reação secundária da n-PCR, foi purificado utilizando-se o *kit* "GFX PCR DNA band purification[®]" (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) e seqüenciado com utilização do DYEnamic[®]ET dye terminator Cycle Sequencing Kit[®] (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) no MegaBACE[®] (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA). As reações de sequenciamento foram realizadas pelo menos

duas vezes, nas duas direções, com os iniciadores da reação secundária da n-PCR.

Alinhamento e tradução das seqüências de nucleotídeos e edição final

A determinação das seqüências consenso foi realizada utilizando-se o 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 determinação das seqüências consenso, elas foram alinhadas com seqüências homólogas disponíveis no *GenBank*, com auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999).

Análise estatística

Para avaliação da associação entre a positividade para *Cryptosporidium* e os diferentes períodos de colheita das amostras fecais, foram utilizados os testes de Q-Cochran e o de McNemar, ambos com nível de significância de 5%, empregando-se o programa SAS (1999).

Resultados

A análise molecular revelou amplificação positiva, para DNA de *Cryptosporidium*, em 105 (21,9%) amostras e negatividade em 375 (78,1%) amostras, provenientes das 40 aves (Tabela 1).

Tabela 1. *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de passeriformes, por meio da *nested* PCR para o gene da subunidade 18S do rRNA.

continua

Criatório	Nome comum	Espécie	2007					2008							
			Aves	set	Out	nov	dez	jan	fev	mar	mai	jun	jul	ago	set
1	Bicudo	<i>Oryzoborus maximiliani</i>	A ^b	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
			B ^b	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
			C ^b	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	Curió	<i>Oryzoborus angolensis</i>	A ^b	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
			B ^b	+	-	-	-	-	-	+	-*	+	-	-	+
			C ^b	+	-	-	-	+	-	+	-*	-	-	+	+
	Azulão	<i>Passerina brissonii</i>	A ^b	+	-	-	-	-	-	+	-*	-	-	-	-
			B ^b	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Coleira do brejo	<i>Sporophila collaris</i>	A ^b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
			B ^b	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
2	Bicudo	<i>Oryzoborus maximiliani</i>	A ^b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			B ^b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
			C ^b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Curió	<i>Oryzoborus angolensis</i>	A ^b	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
			B ^b	+	-*	-*	-	+	-	+	+	-	-	+	-
			C ^a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			D ^a	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
			E ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Bicudo	<i>Oryzoborus maximiliani</i>	A ^a	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
			B ^b	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
			C ^a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Curió	<i>Oryzoborus angolensis</i>	D ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			A ^b	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
			B ^b	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
			C ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

															conclusão		
				2007					2008								
Criatório	Nome comum	Espécie	Aves	set	out	nov	dez	jan	fev	mar	mai	jun	jul	ago	set		
4	Bicudo	<i>Oryzoborus maximiliani</i>	A ^b	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
			B ^b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
	Curió	<i>Oryzoborus angolensis</i>	A ^b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
			B ^b	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
			C ^b	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
			D ^b	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Curió	<i>Oryzoborus angolensis</i>	E ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			A ^a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			B ^b	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
			C ^a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
			D ^b	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
			E ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
			F ^b	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			G ^b	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*
H ^a	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-			
Total**				22 ^a	8 ^{bg}	4 ^c	3 ^c	8 ^{bg}	3 ^c	24 ^a	2 ^{cde}	5 ^{bcef}	6 ^{bcef}	6 ^{bcef}	14 ^g		

^a Amostras de aves jovens (em setembro de 2007, com aproximadamente duas semanas de vida).

^b Amostras de aves adultas (em setembro 2007, com mais de 12 meses de idade).

* Período de apresentação de sintomatologia (apatia e/ou emagrecimento).

**Valores na mesma linha, seguidos de letras diferentes, diferem significativamente, entre si, pelo teste de McNemar (P<0,05)

Observando-se a tabela 1, pode-se notar que houve diferença significativa ($p < 0,0001$) para a positividade para *Cryptosporidium*, nos diferentes períodos de colheita de amostras fecais, de filhotes e de aves adultas, pelo teste de Q-Cochran. Foi observada eliminação intermitente de *Cryptosporidium* em fezes, com maior freqüência nos meses de março e setembro, nas aves adultas, com diferença significativa em março de 2008 e setembro de 2008 ($p < 0,05$) pelo teste de McNemar.

Entre as 372 amostras provenientes de 31 aves adultas, 91(24,5%) foram positivas e 281(76%), negativas. Maior positividade foi observada nos meses de setembro e março (Tabela 1 e Figura 2). Em relação as 108 amostras fecais, provenientes de nove aves jovens, a positividade para *Cryptosporidium*, também em período intermitente, foi observada em 14 (13%) amostras. Foi verificado que algumas aves foram infectadas com aproximadamente duas semanas de idade e permaneceram infectadas até a fase adulta (Tabela 1 e Figura 3). Ao contrário de aves adultas, não foi observada diferença significativa, entre os períodos de colheita.

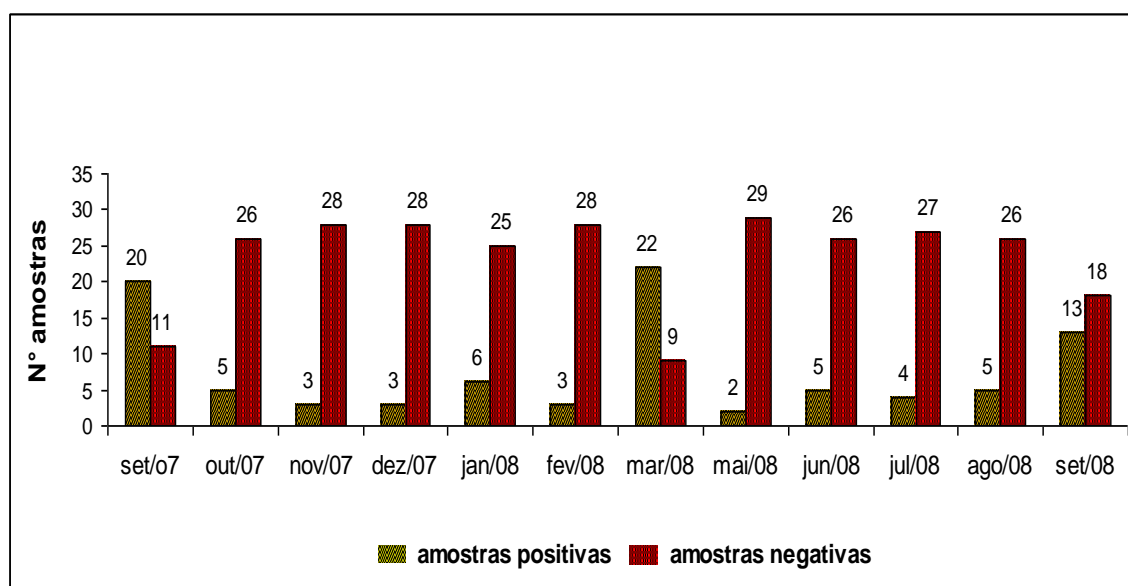


FIGURA 2 - Detecção de *Cryptosporidium galli*, por meio de *nested* PCR para o gene da subunidade 18S do RNA ribossômico, em amostras fecais de aves adultas.

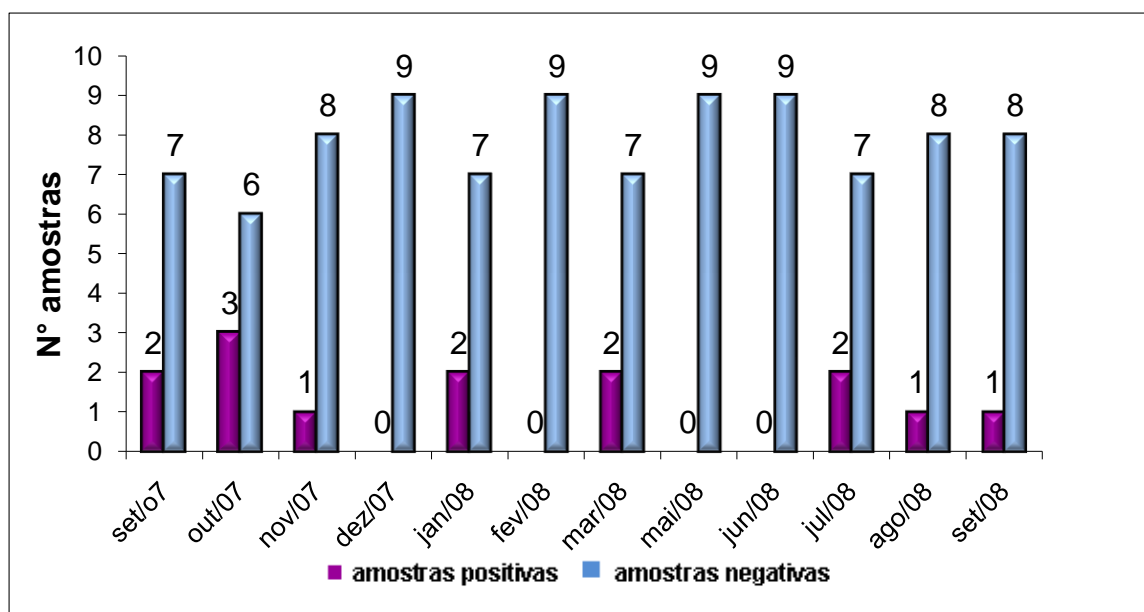


FIGURA 3 - Detecção de *Cryptosporidium galli*, por meio de *nested* PCR para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico, em amostras fecais de passeriformes, colhidas inicialmente em setembro de 2007 (aproximadamente 2 semanas de idade), até 13 meses de idade.

Por meio de sequenciamento dos fragmentos amplificados, pela n-PCR, houve identificação de uma única espécie em todas as aves positivas: *C. galli*.

Todos os criatórios apresentavam boas práticas relacionadas aos manejos sanitários e nutricionais. No entanto, no criatório 5, foi observada administração empírica de antibióticos (ampicilina, enrofloxacina, tetracilina, tilosina) e anticoccidianos (clopidol, diclazuril, toltrazuril) por todo o período de colheita de amostras, além da introdução de aves, provenientes de outros criatórios, sem realização de quarentena ou de exames laboratoriais.

Entre as aves utilizadas para colheita de amostras, foi observada a presença de sintomatologia clínica, caracterizada por apatia e/ou emagrecimento, de caráter crônico, em algumas aves dos criatórios 1 (3 aves), 2 (1 ave) e 5 (1 ave) (Tabela 1). No criatório 5, foi observado o óbito de 18 aves durante o experimento, não relacionadas às aves das quais as amostras foram colhidas. Em sua maioria, a mortalidade ocorreu após um período de apresentação de sintomatologia caracterizada por apatia e emagrecimento.

Nesse criatório, também na maioria das aves, havia associação da infecção por *C. galli* com septicemia por *Escherichia coli* ou enterite por *Isospora* sp.

Discussão

Neste experimento, a única espécie de *Cryptosporidium* encontrada foi *C. galli*, nas quatro espécies de passeriformes pesquisadas. NAKAMURA et al. (2009) e NG et al. (2006) e descreveram infecção por *C. galli* em várias espécies de aves, em sua maioria, pertencentes à ordem Passeriformes, o que sugere que essa espécie seja a mais prevalente em passeriformes e, ainda, a possibilidade de transmissão de *C. galli* entre diferentes espécies de aves. É importante salientar que este é o primeiro relato de infecção por *C. galli* em *P. brissonii*, *O. maximiliani* e *S. colaris*.

Não há informações na literatura sobre a idade de maior ocorrência de infecção natural por *C. galli* em aves. Foi possível observar que algumas aves permaneceram infectadas por um período de 13 meses, inclusive aves que foram infectadas no primeiro mês de vida (Tabela 1 e Figura 3). De forma semelhante, Antunes et al. (2008) relataram eliminação de oocistos de *C. galli*, em amostras fecais de aves adultas, por até 12 meses, em canários, uma calopsita e em curió. No entanto, Ryan et al. (2003), por meio de pesquisa de oocistos em amostras fecais, por meio de microscopia, observaram período patente de seis dias, em dois pintos (*Gallus domesticus*) inoculados aos nove dias de idade e examinados por mais de 60 dias. Não é possível determinar se essa diferença no período patente se deve ao fato da infecção ter ocorrido em diferentes espécies aviárias, a diferenças entre cepas distintas de *C. galli* ou, ainda, à utilização, neste experimento, de uma técnica que apresenta maior sensibilidade que técnicas convencionais de microscopia, para detecção de oocistos em fezes.

A determinação da eliminação prolongada e intermitente, de *C. galli*, em amostras fecais, demonstra que essa espécie causa infecção crônica em

passeriformes. Entre as espécies de *Cryptosporidium*, infecções crônicas são relatadas em serpentes infectadas por *C. serpentis* (BROWNSTEIN et al., 1977; GODSHALK et al., 1986; GRACZYK et al., 1996) e em mamíferos infectados por *Cryptosporidium andersoni* (KVÁC et al., 2008; LINDSAY et al., 2000). De modo semelhante ao observado para *C. galli*, neste experimento, infecções subclínicas por *C. serpentis*, em serpentes, são caracterizadas por eliminação crônica e intermitente de oocistos em fezes (GRACZYK; CRANFIELD, 1996).

Os resultados obtidos pela n-PCR (Tabela 1) indicaram que um maior índice de positividade foi observado nos meses de setembro e março, quando as aves se encontram em reprodução ou em processo de muda de penas e, de acordo com Davis et al. (2000), estão sob condições de estresse, com comprometimento do sistema imunológico e predisposição às diversas enfermidades. No entanto, não foi observada relação entre a maior positividade nesses períodos e a presença de morbidade ou mortalidade.

Foi verificada a presença de algumas aves, positivas para *C. galli*, apresentando apatia e emagrecimento, porém, a maioria das aves infectadas não apresentou sintomas clínicos. Da mesma maneira, apesar da mortalidade verificada no criatório 5 estar associada à presença de grande quantidade de estágios evolutivos de *C. galli*, na mucosa do proventrículo, nenhuma ave dos outros criatórios, mesmo apresentando positividade para *C. galli*, veio a óbito durante o experimento. Em serpentes, já está comprovada a existência de infecção crônica subclínica ou de mortalidade associada à infecção gástrica crônica, por *C. serpentis* (BROWNSTEIN et al., 1977; GODSHALK et al., 1986; GRACZYK et al., 1996). Porém, em mamíferos, infecções no estômago ou abomaso, por *C. muris* e *C. andersoni*, geralmente apresentam caráter subclínico (KVÁC et al., 2008).

Ainda não há definição sobre a importância da infecção por *C. galli* em passeriformes, uma vez que em vários relatos de mortalidade associada à infecção por *C. galli* havia presença de outros agentes etiológicos (ANTUNES et al., 2008; BLAGBURN et al., 1990; LINDSAY et al., 1991). Antunes et al. (2008) relataram infecção gástrica crônica, por *C. galli*, em canários, curiós, e

calopsita, com presença de sinais clínicos e mortalidade, e sugeriram que a presença de *C. galli*, mesmo na ausência de mortalidade, poderia causar doença crônica e predispor as aves às infecções secundárias. Não foi possível determinar se *C. galli* foi um agente primário ou secundário nos casos de mortalidade observados neste experimento, já que havia associação, nessas aves, com infecções por *E. coli* ou *Isospora* sp.. A possibilidade de interação entre diferentes agentes etiológicos, em infecções concomitantes, com presença de sinergismo ou antagonismo, foi discutida por COX (2001). O alto grau de parasitismo por *C. galli*, observado nas aves que vieram a óbito, sugere sinergismo entre esse parasito e outros agentes etiológicos, na ocorrência de morbidade e mortalidade, em passeriformes.

Os resultados deste experimento e dos trabalhos de NG et al. (2006) e NAKAMURA et al. (2009) fornecem evidências de que *C. galli* é a espécie de *Cryptosporidium* mais prevalente em passeriformes, e de que a ocorrência de infecção gástrica crônica apresenta características epidemiológicas similares às de infecções por *C. serpentis*, em serpentes, em que se observa, até o momento, ausência de definição de formas de tratamento ou de erradicação. Dessa maneira, em criatórios de passeriformes comprovadamente positivos para *C. galli*, medidas rigorosas relacionadas ao manejo sanitário e nutricional da criação devem ser adotadas para prevenção da ocorrência de infecções multifatoriais.

REFERÊNCIAS

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**, v. 52, p. 702-705, 2008.

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 (*Staganoplura bella*: passeriformes, estrilgidae). **Avian Diseases**, v. 34, p. 1027-1030, 1990.

BOOM R, SOL CJA, SALIMANS MMM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN P.M.E., VAN DER NOORDAA J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BROWNSTEIN, D. G.; STRANDBERG, J.D.; MONTALI, R.J.; BUSH, M.; FORTNER, J. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 606-617, 1977.

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.

COX, FEG Concomitant infections, parasites and immune responses. **Parasitology** 122: S23-S38, 2001.

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.

DAVIS, G.S; ANDERSON, K.E; CARROLL, A.S. The effects of long-term caging and molt of Single Comb White Leghorn hens on heterophil to lymphocyte ratios, corticosterone, and thyroid hormones. **Poultry Science**, v.79, p. 514–518, 2000.

FAYER R General biology. In: Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2 ed. CRC Press, Boca Raton p.1–42, 2007.

GHARAGOZLOU, M.J.; DEZFOULIAN, O.; RAHBARI, S.; BOKAIE, S.; JAHANZAD, I.; RAZAVI, A.N.E. Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 53, p. 282–285, 2006.

GODSHALK, C.P; MACCOY, D.M; PATTERSON. J.S; MCKIERNAN, B.C. Gastric hypertrophy associated with cryptosporidiosis in a snake. **J. Am. Veterinary Medical Association**, v.189, p. 1126–1128, 1986.

GRACZYK, T.K; CRANFIELD, M.R. Assessment of the conventional detection of fecal *Cryptosporidium serpentis* oocysts in subclinically infected captive snakes. **Veterinary Research**, v. 27, p.185-192, 1996.

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.

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.

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

KVÁC, M; SAK, B; KVĚTOŇOVÁ, D; DITRICH, D; HOFMANNOVÁ, L; MODRÝ, D; VÍTOVEC, D; XIAO, L. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp.in domestic ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.153, p. 363–367, 2008.

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.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, M.; MEAD, J.R.; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos Taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 91-95, 2000.

MEIRELES, M. V.; SOARES, M. R.; SANTOS, M. M. A. B.; 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.

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.

NAKAMURA, A.A; SIMÕES, C.D; ANTUNES, G.R; SILVA, C.D; MEIRELES, M.V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.166, p. 47-51, 2009.

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

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, p. 275-278, 2007.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 113-120, 2009.

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.

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, p. 113-117, 2005.

SAS. Institute Inc. SAS Procedures Guide. Version 8 (TSMO). Cary: p.454, 1999.

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

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

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.

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

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

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, p. 1578-1583, 1999.

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.

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

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](#)