

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**A Importância do Pombo Urbano (*Columba livia*) na  
Disseminação Ambiental de *Cryptosporidium* spp.**

**Alexandre de Pina Costa**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**A IMPORTÂNCIA DO POMBO URBANO (*Columba livia*) NA  
DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL DE *Cryptosporidium* spp.**

**ALEXANDRE DE PINA COSTA**

*Sob a Orientação da Professora*

**Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

**Seropédica, RJ**

**2017**

C837i Costa, Alexandre de Pina, 1972-  
A Importância do Pombo Urbano (*Columba livia*) na  
Disseminação Ambiental de *Cryptosporidium* spp. /  
Alexandre de Pina Costa. - 2017.  
110 f.: il.

Orientadora: Teresa Cristina Bergamo Bomfim.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias, 2017.


1. Pombo doméstico. 2. *Cryptosporidium*. 3.  
Diagnóstico molecular. I. Bomfim, Teresa Cristina  
Bergamo, 1964-, orient. II Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias III. Título.

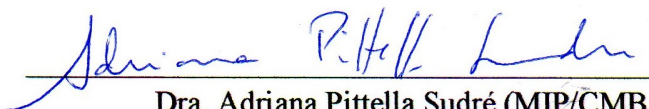
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

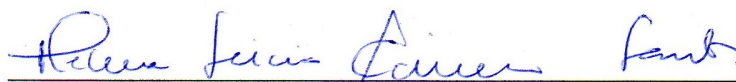
**ALEXANDRE DE PINA COSTA**


Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias


TESE APROVADA EM 09/03/2017.

  
Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim (IV/DPA - UFRRJ) (Orientadora)

  
Dra. Adriana Pittella Sudré (MIP/CMB - UFF)

  
Dra. Helena Lúcia Carneiro Santos (LBM/DE - FIOCRUZ/RJ)

  
Helena Keiko Toma (DACT/FF - UFRJ)

  
Dr. Luciano Antunes Barros (FMV - UFF)

## AGRADECIMENTOS

À Professora Teresa Cristina Bergamo do Bomfim pela oportunidade, acolhimento, confiança, atenção, paciência e disposição para me auxiliar durante os anos de desenvolvimento deste trabalho. Sem o seu apoio, isto não seria possível, meu muito obrigado.

À Professora Maria das Lurdes Azevedo, pelo apoio e companheirismo durante nossos anos de convívio e pela oportunidade de me apresentar ao departamento de Parasitologia Veterinária da UFRRJ, meu muito obrigado.

À minha esposa Irlane Faria de Pinho, pela paciência, amizade, confiança, entusiasmo, dedicação e apoio nesta jornada, sua presença foi fundamental.

Às minhas filhas Laura e Stella, pelo apoio e compreensão nos momentos de minha ausência com elas.

À coordenação da pós-graduação em Ciências Veterinária da UFRRJ, pelo apoio durante todo o período do curso de doutorado.

À equipe do laboratório de biologia molecular da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O.M. Neitz.

Aos colegas de turma do doutorado de 2013-1, pelo companheirismo e apoio durante toda jornada do curso.

À CAPES pelo suporte financeiro para desenvolvimento do projeto.

Aos professores do Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias por todos ensinamentos.

## RESUMO

COSTA, Alexandre de Pina. **A importância do pombo urbano (*Columba livia*) na disseminação ambiental de *Cryptosporidium* spp.** 2017. 96p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O pombo urbano (*Columba livia*), é uma ave frequentemente observada em centros urbanos, vivendo em estreito contato com humanos, sendo um possível disseminador de patógenos no meio ambiente. Dentre estes, uma atenção especial deve ser dada às espécies de *Cryptosporidium*, já que o pombo pode albergar e eliminar oocistos através das fezes. Até o momento, três espécies são consideradas como válidas parasitando aves (*Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium galli*) e 13 genótipos como possíveis agentes da criptosporidiose aviária. Sendo que a primeira espécie, além de parasitar a classe das aves, tem sido diagnosticada em vários hospedeiros mamíferos, também com caráter zoonótico. Devido a ausência de estudos sobre o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. parasitando pombos no Brasil e com escassos relatos no mundo, o presente trabalho teve como objetivos: diagnosticar microscopicamente a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras fecais de pombos capturados em três áreas no município do Rio de Janeiro; caracterizar genotipicamente espécies e/ou genótipos e/ou subtipos obtidos daquelas amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. e realizar o sequenciamento e análises filogenéticas, comparando as sequências obtidas com aquelas sequências depositadas no GenBank. Foram coletados um total de 387 amostras fecais de pombos, em três regiões administrativas: Campo Grande – denominada de A (98 amostras), Bangu – denominada de B (187 amostras) e Madureira – denominada de C (102 amostras). Inicialmente foi realizada a pesquisa de oocistos *Cryptosporidium* spp., para tal, as fezes foram processadas através da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar e avaliadas por microscopia óptica. No diagnóstico microscópico, 81 (20,93%) amostras apresentaram positividade para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., distribuídos: 28,82% na área A, 22,99% na área B e 9,80% na área C. Nestas, foi realizada a extração de DNA, seguida de amplificação e sequenciamento para o alvo 18S. Sendo que destas 81, 53 amostras amplificaram na Nested-PCR. Posteriormente, estas amostras foram purificadas e encaminhadas para o sequenciamento, seguido de análises filogenéticas. Neste estudo, foram diagnosticadas duas espécies: *Cryptosporidium meleagridis* em 44 amostras (91,67%) e *Cryptosporidium baileyi* em quatro amostras (8,33%), ambas se apresentando mais estreitamente relacionadas às espécies intestinais. As sequências de sete amostras contendo nucleotídeos diferentes de *Cryptosporidium* foram depositadas no Genbank. Até o momento o relato deste patógeno em pombos só havia ocorrido em quatro países no mundo: Turquia, Irã, China e Tailândia. Os dados obtidos neste estudo refletem preocupação em saúde pública, sendo que a *C. meleagridis* pode apresentar potencial zoonótico. Este estudo é o primeiro registro no Brasil tendo o hospedeiro pombo (*Columba livia*) infectado por *Cryptosporidium*, contribuindo para traçar a epidemiologia molecular deste agente etiológico no país.

**Palavras-chave:** Saúde pública, diagnóstico molecular, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi*, contaminação ambiental.

## ABSTRACT

COSTA, Alexandre de Pina. **The importance of urban pigeon (*Columba livia*) on the *Cryptosporidium* spp. environment dissemination.** 2017. 96p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The urban pigeon (*Columba livia*) is a bird frequently observed in urban centers, living in close contact with humans, being a possible disseminator of pathogens in the environment. Among these, special attention should be given to the species of *Cryptosporidium*, since the pigeon can harbor and eliminate the oocysts through the faeces. To date, three species are considered valid parasitizing birds (*Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium galli*) and 13 genotypes as possible agents of avian cryptosporidiosis. As the first species, besides parasitizing the birds class, has been diagnosed in several mammalian hosts, also zoonotic. Due to the lack of studies on the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. parasitizing pigeons in Brazil and with few reports in the world, the present work had as objectives: to diagnose microscopically the presence of oocysts of *Cryptosporidium* spp. from pigeons faecal samples captured in three areas in the Rio de Janeiro city; to characterize genotypes and / or genotypes and / or subtypes obtained from those positive samples for *Cryptosporidium* spp. and perform sequencing and phylogenetic analyzes by comparing the sequences obtained with those sequences deposited in GenBank. A total of 387 pigeons fecal samples were collected in three administrative regions: Campo Grande - denominated A (98 samples), Bangu - denominated B (187 samples) and Madureira - denominated C (102 samples). Initially the *Cryptosporidium* spp. oocysts were investigated. For this, the faeces were processed through the technique of centrifugation and flotation in saturated sugar solution and evaluated by light microscopy. In the microscopic diagnosis, 81 (20.93%) samples were positive for the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts, distributed: 28.82% in area A, 22.99% in area B and 9.80% in area C. In these, DNA extraction was performed, followed by amplification and sequencing for the 18S target. Of these 81, 53 samples amplified in Nested-PCR. Subsequently, these samples were purified and sent for sequencing, followed by phylogenetic analyzes. In this study, two species were diagnosed: *Cryptosporidium meleagridis* in 44 samples (91.67%) and *Cryptosporidium baileyi* in four samples (8.33%), both of which were more closely related to intestinal species. Sequences of seven samples containing different nucleotides of *Cryptosporidium* were deposited in Genbank. So far, the report of this pathogen in pigeons had only occurred in four countries in the world: Turkey, Iran, China and Thailand. The data obtained in this study reflect public health concern, and *C. meleagridis* may present zoonotic potential. This study is the first Brazilian registry to have the host pigeon (*Columba livia*) infected by *Cryptosporidium*, contributing to trace the molecular epidemiology of this etiological agent in the country.

**Keywords:** Public health, molecular diagnosis, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi*, environmental contamination.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação morfológica de oocistos de <i>Cryptosporidium meleagridis</i> , <i>Cryptosporidium baileyi</i> , <i>Cryptosporidium galli</i> .	6
<b>Tabela 2.</b> Distribuição da prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. pelo mundo até o momento em fezes de pombos ( <i>Columba livia</i> ).	9
<b>Tabela 3.</b> Aves detectadas com <i>Cryptosporidium meleagridis</i> e os países onde foram descritas respectivamente.	12
<b>Tabela 4.</b> Genótipos de <i>Cryptosporidium</i> descritos até o momento, de acordo com as ordens da classe das aves, sítio de parasitismo e localização geográfica.	19
<b>Tabela 5.</b> Publicações de infecções por <i>Cryptosporidium</i> spp. em humanos com diarreia, de acordo com os países de estudo (exceto Brasil) e o ano da publicação, nos últimos cinco anos.	26
<b>Tabela 6.</b> Publicações de artigos descrevendo a presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em humanos no Brasil.	28
<b>Tabela 7.</b> Resultado do exame parasitológico amostras de fezes de pombos ( <i>Columba livia</i> ) de acordo com a localidade da coleta, para <i>Cryptosporidium</i> spp.	41
<b>Tabela 8.</b> Resultado das amostras de fezes de pombos ( <i>Columba livia</i> ) que foram positivas no diagnóstico parasitológico de fezes para <i>Cryptosporidium</i> spp., e submetidas na técnica de PCR e Nested-PCR de acordo com a região do estudo.	41
<b>Tabela 9.</b> Total de amostras total amplificadas, número de amostras analisadas e espécies de <i>Cryptosporidium</i> diagnosticadas de acordo com as áreas de coleta de amostras de fezes de pombos ( <i>Columba livia</i> ).	56



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Subtipos descritos até o momento, de <i>Cryptosporidium meleagridis</i> utilizando o gene alvo GP60 de acordo com a região descrita e seus respectivos hospedeiros.	14
<b>Quadro 1.</b> Subtipos descritos até o momento, de <i>Cryptosporidium meleagridis</i> utilizando o gene alvo GP60 de acordo com a região descrita e seus respectivos hospedeiros (Continuação).	15
<b>Quadro 2.</b> Estudos realizados descrevendo a presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em aves no Brasil.	27
<b>Quadro 3.</b> Sequências utilizadas para o gene alvo 18S, registradas no ‘Genbank’, e que foram comparadas com as obtidas no estudo para a construção da árvore filogenética.	38
<b>Quadro 3.</b> Sequências utilizadas para o gene alvo 18S, registradas no ‘Genbank’, e que foram comparadas com as obtidas no estudo para a construção da árvore filogenética (Continuação).	39
<b>Quadro 4.</b> Tamanho das sequencias obtidas de <i>Cryptosporidium</i> após análise da qualidade dos cromatogramas das amostras de pombos ( <i>Columba livia</i> ), referente à área A de acordo com aquelas amostras que amplificaram DNA.	45
<b>Quadro 5.</b> Tamanho das sequencias obtidas de <i>Cryptosporidium</i> após análise da qualidade dos cromatogramas das amostras de pombos ( <i>Columba livia</i> ), referente à área B, de acordo com aquelas amostras que amplificaram DNA.	46
<b>Quadro 6.</b> Tamanho das sequencias obtidas de <i>Cryptosporidium</i> após análise da qualidade dos cromatogramas das amostras de pombos ( <i>Columba livia</i> ), referente à área C, de acordo com aquelas amostras que amplificaram DNA.	46
<b>Quadro 7.</b> Sequencias obtidas do GenBank da espécie <i>Cryptosporidium meleagridis</i> utilizadas como comparação das sequencias obtidas neste estudo (áreas A, B e C), com as suas respectivas similaridades.	57
<b>Quadro 8.</b> Sequencias obtidas do GenBank da espécie <i>Cryptosporidium baileyi</i> utilizadas como comparação das sequencias obtidas neste estudo (áreas A, B e C), com as suas respectivas similaridades.	58

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama-F, Modelo conceitual dos meios de transmissão de patógenos de doenças diarreicas no ambiente. (Adaptado de WAGNER, LANOIX, 1958; KAWATA, 1978) 21
- Figura 2.** Imagens da localização das áreas de coleta das amostras fecais provenientes de pombos (*Columba livia*): A- Mapa do Brasil com a localização do estado do Rio de Janeiro, assinalando a região metropolitana do Rio de Janeiro; B- Região Metropolitana do Rio de Janeiro com os seus municípios (<http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-regiao-metropolitana-do-rio-de-janeiro/>); C - Município do Rio de Janeiro subdividido em regiões administrativas (<http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-regiao-metropolitana-do-rio-de-janeiro/>), assinalando as áreas de coletas (Áreas A, B e C), com os respectivos números totais de amostras. 34
- Figura 3.** Oocistos de *Cryptosporidium* sp. observados na microscopia óptica após a utilização da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar, provenientes de amostras fecais de pombos (*Columba livia*) provenientes de três locais do Município do Rio de Janeiro(— = 10 µm). 40
- Figura 4.** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 2 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* sp. provenientes da região A. M = marcador de peso molecular (1Kb plus), C+ = controle positivo bovino e C- = branco da reação. 42
- Figura 5.** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 2 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* sp. provenientes da região B. = marcador de peso molecular (1Kb plus), C+ = controle positivo bovino e C- = branco da reação. 43
- Figura 6.** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 2 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* sp. provenientes da região C. M = marcador de peso molecular (1Kb plus), C+ = controle positivo bovino e C- = branco da reação. 44
- Figura 7.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área A comparando com sequencia completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ). 47
- Figura 7.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área A comparando com sequencia completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ) (Continuação). 48
- Figura 7.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área A comparando com sequencia completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ) (Continuação). 49

<b>Figura 8.</b> Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área A comparando com sequencia completa de <i>Cryptosporidium baileyi</i> , evidenciando que há nucleotídeos idênticos ( . ).	50
<b>Figura 9.</b> Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área B comparando com sequencia completa de <i>Cryptosporidium meleagridis</i> , evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ).	51
<b>Figura 9.</b> Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área B comparando com sequencia completa de <i>Cryptosporidium meleagridis</i> , evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ) (continuação).	52
<b>Figura 9.</b> Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área B comparando com sequencia completa de <i>Cryptosporidium meleagridis</i> , evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ) (continuação).	53
<b>Figura 10.</b> Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área B comparando com sequencia completa de <i>Cryptosporidium baileyi</i> , evidenciando que há nucleotídeos idênticos ( . ).	54
<b>Figura 11.</b> Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área C comparando com sequencia completa de <i>Cryptosporidium meleagridis</i> , evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ).	55
<b>Figura 11.</b> Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área C comparando com sequencia completa de <i>Cryptosporidium meleagridis</i> , evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ) (continuação).	56
<b>Figura 12.</b> Análise filogenética entre os isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp. baseada no sequenciamento total do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 712pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura-2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequencias obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pombos da área A.	59
<b>Figura 13.</b> Análise filogenética entre os isolados de <i>Cryptosporidium</i> sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 733pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura - 2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequencias obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pombos da área B.	60
<b>Figura 14.</b> Análise filogenética entre os isolados de <i>Cryptosporidium</i> sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 751 pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura - 2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequencias obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pombos da área C.	61

**Figura 15.** Análise filogenética entre os isolados de *Cryptosporidium* sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 713 pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura-2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequencias obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pombos das áreas A, B e C. Área A: *C. meleagridis* (A1-A10, A12-A15, A17-A20, são idênticas); Área B, *C. meleagridis* (B1- B13, B17-B21, são idênticas); *C. baileyi* (B14 e B16 são idênticas). Área C (C1 a C7, são idênticas).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1. Pombos urbanos ( <i>Columba livia</i> )	3
2.2. Taxonomia e biologia do <i>Cryptosporidium</i> spp.	5
2.3. Infecção de <i>Cryptosporidium</i> spp. em aves	6
2.4. Infecção de <i>Cryptosporidium</i> spp. em aves da ordem Columbiformes	8
2.5. Espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	11
2.5.1. <i>Cryptosporidium meleagridis</i> Slavin, 1955	11
2.5.1.1. Subtipos de <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	13
2.5.2. <i>Cryptosporidium baileyi</i> Current, Upton and Haynes, 1986	15
2.5.3. <i>Cryptosporidium galli</i> Pavlasek, 1999	17
2.5.4. Genótipos de <i>Cryptosporidium</i> diagnosticados em aves	18
2.5.4.1. Genótipos Avian I – VI	18
2.5.4.2. Genótipo da Galinhola Euroasiática	19
2.5.4.3. Genótipo do Pato preto	20
2.5.4.4. Genótipos do Ganso I-V	20
2.6. Contaminação ambiental pelo <i>Cryptosporidium</i> spp.	20
2.7. Transmissão zoonótica por <i>Cryptosporidium</i> spp.	24
2.8. <i>Cryptosporidium</i> spp. no Brasil	26
2.8.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. em aves no Brasil	26
2.8.2. <i>Cryptosporidium</i> spp. em humanos no Brasil	27
2.9. Diagnóstico laboratorial da Criptosporidiose	28
2.9.1. Diagnóstico Parasitológico	29
2.9.2. Diagnóstico Imunológico	29
2.9.3. Diagnóstico Molecular	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
3.1. Obtenção das amostras fecais de pombos e procedimentos de coleta	33
3.2. Processamento das amostras fecais de pombos e Diagnóstico Microscópico	34
3.3. Extração de DNA	35
3.4. Técnicas de PCR Primária e Nested-PCR para o gene alvo 18S	35
3.5. Purificação dos produtos da Nested-PCR e sequenciamento	36
3.6. Análise das sequências	36
3.7. Análises filogenéticas	37
<b>4. RESULTADOS</b>	40
4.1. Diagnóstico Microscópico de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de pombos ( <i>Columba livia</i> )	40
4.2. Diagnóstico Molecular: PCR e Nested-PCR para 18S	41
4.3. Análise das Sequências e Filogenia	44
<b>5. DISCUSSÃO</b>	63
5.1. Diagnóstico Microscópico	63
5.2. Diagnóstico Molecular: PCR, Nested-PCR e Sequenciamento	64

5.3. Importância do pombo como hospedeiro e transmissor de patógenos	65
5.4. <i>Cryptosporidium</i> como um agente de zoonose	67
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Pombos são encontrados em várias regiões do mundo, exceto nos pólos, vivendo próximo aos humanos e outras espécies de animais na natureza. Além disso, são criados como fonte de alimento, passatempo, símbolo e para fins experimentais. No Brasil devido a sua grande proliferação esta ave se dispersou na natureza se tornando uma praga urbana.

Com grande rusticidade e possuindo grande capacidade de voo, associado ao aumento crescente dos centros urbanos e a falta de saneamento básico adequado, esta ave se adaptou prontamente a este tipo de situação. Com reprodução rápida, gerou uma população crescente, formando casais para a vida toda. A sua sobrevivência e manutenção nas cidades se deve a três fatores: oferta abundante de abrigo, ausência de predadores e a vasta disponibilidade de alimentos.

Essa ave abriga e constroem seus ninhos em prédios, torres de igreja, forros de casas e beirais de janelas. Nas grandes cidades, diariamente, nos mesmos horários e locais, alimentos são disponibilizados por humanos, favorecendo o aumento da sua população. Assim, os pombos deixam de buscar na natureza os alimentos adequados à sua dieta.

Esta ave é protegida pelas leis ambientais (Lei 9605 de 12/02/98 - Artigo 29, parágrafo 3º), sendo considerada doméstica e levando assim qualquer ação de controle que provoque sua morte, danos físicos, maus tratos e apreensão, passível de pena de reclusão e inafiançável de até 5 anos. Desta forma, é uma ave doméstica livre para a reprodução, garantida pelos próprios habitantes das cidades, sua população só aumenta, trazendo transtornos ao meio ambiente e à saúde pública.

Nos ambientes urbanos causam grande incômodo, pelo número elevado de indivíduos, gerando grande quantidade de fezes, penas, ninhos, cascas de ovos e carcaças de aves mortas. Além disso, o acúmulo de fezes também é observado nos locais onde as aves pousam durante o dia danificando mercadorias e monumentos, provocando entupimento de calhas e apodrecimento de forros de madeira e ainda contaminam uma grande variedade de alimentos onde a ave tenha acesso.

Como dificilmente os pombos são predados por outros animais, sua população cresce muito rapidamente e o aumento de sua quantidade tornou-se um grave problema de saúde pública. Esta ave pode ser veiculadora de vários patógenos causadores de doenças tanto em animais quanto em humanos. Dentre estas, podemos destacar as parasitárias, e neste grupo os protozoários do gênero *Cryptosporidium* assumem o seu destaque.

Na classe das aves, três espécies de *Cryptosporidium* são consideradas como causadoras de patogenicidade, sendo estas, *Cryptosporidium meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli*. *Cryptosporidium meleagridis*, tem sido diagnosticada em várias espécies de aves tanto domésticas quanto silvestres, e também nos seres humanos, sendo uma espécie de caráter zoonótico.

Para a determinação de espécie e/ou possíveis genótipos e/ou subtipos de *Cryptosporidium* a utilização das ferramentas moleculares são imprescindíveis, propiciando um melhor entendimento da biologia e da epidemiologia desse protozoário.

Os pombos são animais que tem como hábito de ciscar em busca de alimentos em várias áreas, e acidentalmente podem ingerir oocistos de *Cryptosporidium* spp. Após adquirirem a infecção, podem eliminar a forma infectante no ambiente, através das suas fezes contaminando água e alimentos, assim, podem infectar outros hospedeiros pela ingestão e/ou inalação de oocistos, e seres humanos estão incluídos nesta cadeia epidemiológica.

Assim sendo, estudos utilizando o hospedeiro pombo, para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. tornam-se de extrema relevância, para elucidar as diversas questões que

envolvem o ciclo de transmissão deste parasito. Além de verificar se este hospedeiro apresenta a capacidade de disseminar a forma infectante do protozoário no meio ambiente.

Portanto, devido aos poucos estudos relacionados a pombos (*Columba livia*) infectados por *Cryptosporidium* spp. e a ausência de trabalhos publicados no Brasil, o presente estudo teve como objetivos: diagnosticar microscopicamente a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras fecais de pombos capturados no município do Rio de Janeiro; caracterizar genotipicamente espécies e/ou genótipos e/ou subtipos obtidos de amostras fecais positivas para *Cryptosporidium* spp., através da técnica de sequenciamento e análises filogenéticas, comparando as sequencias obtidas com aquelas sequências depositadas no GenBank.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Pombos urbanos (*Columba livia*)

Os pombos urbanos são aves que vivem em estreito contato com os humanos, se adaptando prontamente ao ambiente sinantrópico em virtude da oferta de alimento, abrigo e água, sendo considerada uma das aves mais comuns ao redor do mundo (HARLIN, 1994). Pertencem ao Filo Chordata, Classe Aves, Ordem Columbiformes, Família Columbidae, Gênero *Columba* e Espécie *Columba livia*. Os relatos da domesticação destas aves datam de 12.000 a.C., descendendo do pombo-bravo do Mediterrâneo europeu. Em 2600 a.C., egípcios utilizavam estes animais como alimento e pouco tempo depois os romanos passaram a também adotá-las na sua dieta alimentar (SICK, 1997; GODOI, 2009).

Já em aproximadamente 2000 a.C., os chineses iniciaram o consumo destas aves e atualmente, somente na província de Guangdong existe uma das maiores produções de pombos domésticos do mundo, com pelo menos 6 milhões de aves (LI et al., 2015). O fato de ganharem peso rapidamente, além de facilidade na sua criação, estimularam sua intensa produção em cativeiro (RADFAR et al., 2012).

A capacidade de orientação durante o voo destas aves levou o homem a utilizá-los na comunicação entre aldeias e povoados, inicialmente pelos gregos, por volta de 700 a.C. No Brasil há relatos que demonstram que estes animais foram trazidos no século XVI, em gaiolas, como animais domésticos para serem utilizados tanto na alimentação quanto como meio de comunicação. Porém, devido ao manejo inadequado, estas aves acabaram disseminando-se em todo o território nacional, conseguindo sobreviver de forma feroz e multiplicando-se de forma descontrolada em ambientes urbanos (BENCKE, 2007). Além de serem utilizados como fonte de alimento humano são usados como animal de estimação e em esportes de competição (SCHULLER, 2004; KOOMPAPONG et al., 2014).

Atualmente, a distribuição dessa ave inclui todos os continentes com exceção da Antártida (GIBBS et al., 2001). Os pombos possuem grande facilidade de adaptação nas cidades pela semelhança das estruturas dos edifícios aos penhascos rochosos do ambiente natural dos pombos das rochas, ave nativa da Europa, Norte da África, Oriente Médio e Ásia (SCHULLER, 2004). Constroem seus ninhos em locais altos como telhados e terraços de edifícios, torres de igrejas e construções abandonadas. Este fato, associado à oferta de alimentos e a ausência de predadores naturais no Brasil, facilitou o aumento de sua população nos centros urbanos, adquirindo o status de praga urbana. Embora o pombo possa atingir velocidades de até 50 km/h e percorrer 800 km por dia, seu hábito é circular em seu território natal, em busca de alimentos (FEDERAÇÃO COLUMBÓFILA BRASILEIRA, 2016).

Os pombos da espécie *Columba livia* são aves de cabeça pequena e redonda, com aproximadamente 38 cm de comprimento, bico curto e delgado com a base coberta por pele grossa e mole. Possuem plumagem cheia e macia, sendo a mais comum a cinza-azulada, com brilho metálico azulado ou esverdeado no pescoço, embora possa haver grande diversidade de cores. O macho durante o cortejo da fêmea faz reverências diante dela, os parceiros se acariciam na cabeça e se alimentam de uma massa regurgitada do papo (SICK, 1997; MUR, 1999; SCHÜLLER, 2004; BENCKE, 2007).

A fêmea faz os ninhos com materiais que encontra nas proximidades de seus abrigos como galhos de árvores, folhas secas e outros materiais diversos encontrados no ambiente urbano. As fêmeas realizam a postura de dois ovos que são incubados por um período de 16 a 19 dias, com variação de eclosão dos ovos, sendo que, um filhote eclode antes do outro. Um casal pode ter entre cinco e seis ninhadas por ano. A variação de número de ninhadas está diretamente relacionada à oferta de alimento e disponibilidade de abrigo aos pombos

(SCHULLER, 2004; BENCKE, 2007), gerando uma população crescente, com grande rusticidade, levando a graves problemas ambientais (RADFAR et al., 2012).

O casal de pombos alimenta os filhotes nos primeiros dias com um material denominado popularmente de leite de papo. Quando um pouco mais velhos passam a receber alimentos que os pais regurgitam no papo de seus filhotes, alimentos das mais diferentes formas e conteúdo (grãos, sementes e até insetos e moluscos). Com até 2 meses de idade, eles abandonam o ninho, aprendendo a voar e com 7 meses de idade atingem a maturidade sexual. Há estudos afirmando que os pombos podem ouvir frequência ultrassônica, e têm uma visão aguçada, vendo espectros infravermelhos e ultravioletas. Um pombo enxerga um grão de milho com 200 metros de distância (VALADARES, 2004).

O período de vida dessa ave nos centros urbanos varia de três a cinco anos, mas em condições selvagens pode chegar de duas a três décadas (AMBIENTE BRASIL, 2016). Os pombos alimentam-se geralmente de sementes, grãos e frutas, descendo ao solo para comer, ingerindo grãos inteiros, sem quebrá-los enchendo o papo onde ocorre sua digestão (SICK, 1997). Nas cidades se alimentam de insetos (larvas e adultos), e praticamente tudo que estiver disponível no ambiente, tais como, pão, ração animal, restos de alimentos e até lixo, desta forma aumentando sua população proporcionalmente quando houver uma maior oferta de alimentos (PADORI, 2016).

As aves na natureza têm diversas funções importantes, entre elas o controle de insetos e na dispersão de sementes das plantas. Estas são eliminadas junto com as suas fezes úmidas para germinarem no solo (SILVA et al., 2014). Por outro lado, os pombos competem por alimento com as espécies nativas de uma determinada região. Além disso, por apresentarem "vôo livre", suas fezes acabam danificando construções e monumentos além de transmitir e disseminar vários agentes patogênicos. Este fato é considerado habitual, uma vez que ao bater suas asas devido ao deslocamento constante de locais elevados até o chão, aumenta e favorece o processo de suspensão de partículas (incluindo suas fezes ressecadas) em forma de pó (ADANG et al., 2008; RADFAR et al., 2012).

A grande concentração de pombos em determinadas áreas, aumenta a sua interação com os humanos. Este fato representa risco para a saúde pública, seja de forma direta, através da inalação das excretas contaminadas, ou de forma indireta, pela contaminação de fontes de água e alimentos destinados ao consumo animal e humano (NUNES, 2003). Essa ave se tornou uma veiculadora potencial de patógenos zoonóticos tais como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans* e de algumas espécies de *Cryptosporidium* (ADANG et al., 2008; KOOMPAPONG et al., 2014; SILVA et al., 2014; LI et al., 2015). Deve-se destacar também como um reservatório e transmissor de patógenos para aves domésticas e selvagens. Atualmente, inúmeras espécies de aves exóticas estão ameaçadas de extinção, e patógenos veiculados por pombos poderiam contribuir para seu declínio (RADFAR et al., 2012; LI et al., 2015).

O Brasil carece de estudos fidedignos que afirmem o tamanho da população destas aves, principalmente em ambientes urbanos, embora seja visível a sua grande quantidade, sendo muitas vezes alvos de pedidos de controle populacional a serem realizados pelos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) (SCHULLER, 2004). Em virtude deste crescimento progressivo da sua população, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através de sua Instrução Normativa nº 141, de 19/12/2006, regulamentou o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva (IBAMA, 2006), estando os pombos inseridos nesta lista.

A população dos pombos pode ser controlada com a administração de Nicarbazina (FERRI et al., 2009), que embora seja um coccidiostático, quando administrado em aves apresenta redução da viabilidade de ovos (BYNUM et al., 2007). A administração de anticoncepcional também pode ser útil para reduzir a população destas aves, embora deva ser

empregada de maneira sistemática, pois a droga tem efeito de curta a média duração (GIUNCHI et al., 2007; MAGNINO et al., 2009). Na Europa, a redução da população de pombos foi possível por meio de obstrução das aberturas de edifícios e pela conscientização da população reduzindo a oferta de alimentos (SILVA et al., 2014).

## 2.2. Taxonomia e biologia de *Cryptosporidium* spp.

Segundo a classificação de Levine (1980) *Cryptosporidium* apresenta a seguinte posição sistemática: Filo Apicomplexa Levine, 1970; Classe Sporozoa Leuckart, 1879; Subclasse Coccidia Leuckart, 1879; Ordem Eucoccidiida Léger & Duboscq, 1910; Sub-ordem Eimeriina Léger, 1911; Família Cryptosporidiidae Léger, 1911; Gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907. Há descrições de 30 espécies de *Cryptosporidium*, embora ainda haja debate sobre quais espécies são válidas (SLAPETA, 2013; RYAN; HIJJAWI, 2015). Estas espécies possuem diferentes implicações clínicas, tanto em mamíferos quanto nas aves (RYAN, 2010).

O gênero *Cryptosporidium* é encontrado em todo o mundo, exceto na Antártida, sendo comum tanto em países em desenvolvimento como naqueles mais desenvolvidos. Porém em regiões com baixo saneamento básico a dispersão deste coccídeo torna-se maior (SHIRLEY et al., 2012).

Os estágios morfológicos de *Cryptosporidium* spp. e seu desenvolvimento se assemelham a de outros coccídios, pertencentes à subordem Eimeriina (CURRENT; GARCIA, 1991). A morfologia do gênero *Cryptosporidium* varia de acordo com os estágios evolutivos, que são os oocistos, esporozoítas, merozoítas, microgamontes e macrogamontes. O oocisto esporulado contém quatro esporozoítas não apresentando esporocisto, que é uma característica do gênero (UPTON; CURRENT, 1985). A parede do oocisto é delgada com duas camadas, uma interna e outra externa. Em uma das extremidades do oocisto, no ato do desencistamento, localiza-se uma sutura, por onde os esporozoítas são liberados (FAYER et al. 1986).

As espécies do gênero *Cryptosporidium* apresentam um ciclo monoxênico. O início da infecção ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminados por oocistos, ou através da inalação. O desencistamento, ocorre por vários fatores, incluindo redução de condições de dióxido de carbono, temperatura, enzimas pancreáticas e sais biliares (CAMPBELL et al., 1993). Em seguida há liberação dos esporozoítas pela sutura da parede do oocisto (FAYER; UNGAR, 1986). Os esporozoítas livres penetram na superfície das células epiteliais, onde se tornam inclusos dentro do vacúolo parasitóforo e desenvolvem-se em trofozoítas. Esses então sofrem reprodução assexuada por esquizogonia. A divisão das células ocorre por endopoligenia, onde múltiplas células filhas são formadas por célula tipo merontes. O meronte do tipo I, contendo oito merozoítas, é liberado dos vacúolos parasitóforos quando desenvolvidos. Os merozoítas de primeira geração, então, invadem outras novas células epiteliais e desenvolvem em meronte tipo II. Estes com quatro esporozoítas, que após a liberação, os merozoítas se diferenciam para progressão da fase reprodutiva denominada de gametogonia dos gamontes (O'DONOGHUE, 1995).

Na gametogonia, ocorre a produção de macrogameta (célula reprodutora feminina) e microgameta (célula reprodutora masculina), posteriormente haverá a fecundação do macrogameta com o microgameta, gerando o oocisto imaturo até o desenvolvimento do oocisto maduro. Dois tipos de oocistos são descritos: um oocisto de parede fina e um de parede espessa. Nos dois tipos de oocistos a esporulação ocorrerá no local de parasitismo. Oocistos de parede fina se desencistam com facilidade iniciando a autoinfecção interna, já os oocistos de parede espessa, são eliminados através das fezes, e são altamente resistentes às

adversidades ambientais, levando a transmissão da infecção aos outros hospedeiros (SRÉTER; VARGA, 2000).

### 2.3. Infecção em aves por *Cryptosporidium* spp.

A classe das aves compõem uma parte de praticamente todos os ecossistemas no planeta, sendo comumente encontrados em residências, áreas urbanas e selvagens de todo o mundo. Estes animais podem ser parasitados por uma ampla variedade de patógenos (SILVA et al., 2014). Os efeitos do parasitismo em aves são muitas vezes graves, incluindo retardo de crescimento, baixa produção de ovos e susceptibilidade a outras infecções (RADFAR et al., 2012). Dentre todos os parasitos que acometem as aves, o gênero *Cryptosporidium* possui grande relevância, pois dependendo da espécie e do subtipo diagnosticado, apresenta importância em saúde pública (PAPINI et al., 2012). Este parasito é considerado por muitos autores, um patógeno emergente na medicina das aves em todo o mundo, infectando tanto aves domésticas como selvagens, criadas a solta ou em cativeiro, podendo gerar perdas econômicas em larga escala (HAMIDINEJAT et al., 2014; REBOREDO-FERNÁNDEZ et al., 2015).

Nas aves, três espécies são reconhecidas como válidas: *C. meleagridis*; *C. baileyi* e *C. galli* (QI et al., 2011; QUAH et al., 2011; NAKAMURA et al., 2014). A identificação de espécies através da caracterização morfológica e morfométrica (Tabela 1), não sustenta corretamente a classificação, sendo necessária a utilização de ferramentas moleculares para a obtenção da nomenclatura de uma determinada espécie, subtipos e genótipos (RYAN, 2010).

**Tabela 1.** Comparação morfométrica de oocistos de *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium galli*.

Espécie	Diâmetro maior (µm)	Diâmetro menor (µm)	Índice Morfométrico	Referência
<i>C. meleagridis</i>	4,5–6,0	4,2–5,3	1,00–1,33	LINDSAY et al. (1989a,b)
<i>C. baileyi</i>	6,0–7,5	4,8–5,7	1,05–1,79	LINDSAY et al. (1989a,b)
<i>C. galli</i>	8,0–8,5	6,2–6,4	1,3	RYAN et al. (2003a,b)

Adaptado de RYAN et al., 2010.

Existem descrições da infecção por *Cryptosporidium* spp. entre diversas espécies de aves, sendo que nas décadas de 80 e 90, o diagnóstico foi realizado somente de observações microscópicas e histopatológicas, sem caracterização molecular para espécie ou genótipo (GOODWIN, 1989; SRÉTER; VARGA, 2000; KVÁČ et al., 2014; CHELLADURAI et al., 2016).

Os sinais clínicos encontrados foram na maioria dos casos no trato respiratório e gastrointestinal associado com altas taxas de mortalidade. Embora em outros tecidos tenha sido detectada a colonização por *Cryptosporidium* spp., tanto em infecções clínicas como subclínicas tais como: Bursa de Fabricius, conjuntiva, ouvido médio, pâncreas e rins (SRÉTER; VARGA, 2000; RYAN, 2010; NAKAMURA; MEIRELLES, 2015).

Snyder et al. (1988) detectaram a presença de anticorpos para *Cryptosporidium* spp. utilizando a técnica de ELISA indireto em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) nos EUA, e observaram que os lotes que apresentaram o melhor desempenho foram negativos para este patógeno. Outros autores têm correlações positivas relatadas entre a presença deste

parasito em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) e a diminuição do ganho de peso, aerossaculite, aumento da mortalidade e maiores taxas de condenação de carcaça nos matadouros (GORHAM et al., 1987; GOODWIN et al., 1996). Em um estudo de revisão realizado por Nakamura; Meireles (2015), a infecção pelo *Cryptosporidium* spp. em diversas espécies de aves selvagens e domésticas foi demonstrado entre elas: *Alectoris rufa*, *Anas platyrhynchos*, *Columba livia*, *Coturnix coturnix japonica*, *Gallus gallus domesticus*, *Meleagris gallopav* e *Struthio camelus*.

Na China a produção de codornas (*Coturnix coturnix*) para consumo humano atinge grandes proporções, com aproximadamente 200 milhões de aves (20% da população mundial de codornas), e entre os anos de 2006 e 2007, Wang et al. (2012) coletaram 1818 amostras fecais destas espécies em 47 granjas de 5 regiões distintas. Um total de 239 amostras foram positivas para *Cryptosporidium* (prevalência de 13,1%), sendo que 237 foram identificadas como *C. baileyi* e 2 como *C. meleagridis*.

Em uma pesquisa realizada por Quah et al. (2011) no Jardim Zoológico de Kuala Lumpur (Malásia), utilizando 90 amostras de fezes de 37 espécies de aves diferentes, 10% apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. Estes resultados evidenciaram que estes animais em exposição têm potencial de se tornarem uma fonte de disseminação para o ambiente. Neste estudo, sete amostras foram submetidas ao estudo molecular, sendo todas elas diagnosticadas como *Cryptosporidium parvum*. Neste mesmo Jardim Zoológico, estudos prévios indicavam a prevalência deste coccídeo em 6% e 4% respectivamente (ROHELA et al., 2005; MAHAT, 2006), porém nas ocasiões não foram realizados o estudo molecular. Um trabalho semelhante realizado por Papini et al. (2012), utilizando aves em um Jardim Zoológico na Itália revelou uma prevalência de 5,7% para *Cryptosporidium* spp., embora não tenha sido realizado a análise molecular das amostras positivas. Os dados alertaram que trabalhadores destes locais estão altamente expostos ao risco de infecção com agentes zoonóticos, sendo recomendado utilizar medidas de higiene e biossegurança quando no manuseio destas aves e na limpeza rotineira de suas gaiolas. Utilizando também aves de zoológico, Gu et al. (2016), realizaram um levantamento em 103 aves selvagens diferentes, na Província de Anhui na China, com positividade de oocistos nas fezes de 6,8%, não foram realizados estudos moleculares.

Gomes et al. (2009) verificaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em fezes de patos (*Anas platyrhynchos*), pintos (*Gallus gallus domesticus*) e codornas japonesas (*Coturnix japonica*) comercializadas em mercados populares, aviários comerciais e lojas de animais no Rio de Janeiro, Brasil. Das 180 amostras fecais analisadas, 131 (72,77%) foram positivas. Pela análise morfométrica dos oocistos, as amostras foram classificadas como *C. meleagridis* e *C. baileyi*. As altas taxas de infecção encontradas neste estudo estavam relacionadas às condições sanitárias observadas nos locais de coleta, pois apresentavam pouca higiene, não havendo limpeza periódica das gaiolas. Além disso, havia alta aglomeração de aves, que, muitas vezes, apresentaram-se mantidas com as outras espécies. Outra pesquisa foi realizada em mercados populares, aviários comerciais e lojas de animais no Rio de Janeiro. Desta vez 103 amostras fecais de 64 diferentes aves comercializadas foram analisadas e sete (6,8%) apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. Destas foi possível após sequenciamento genético, identificar uma amostras como *C. parvum* e quatro como Genótipo Avian III (GOMES et al.; 2012).

Um estudo realizado por Wang et al. (2014) na província de Zhejiang na China para pesquisa de *Cryptosporidium* spp., utilizando 385 amostras fecais de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) obtiveram uma taxa de infecção de 9,9% (38 amostras). Trinta e três foram diagnosticadas com *C. baileyi*, duas com *C. meleagridis* e três contendo o Genótipo Avian II. Estes resultados, levaram os autores a sugerirem que este coccídeo está amplamente

disseminado nas granjas de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) na província pesquisada, representando ameaça econômica e à saúde pública.

A presença e o impacto da infecção por *Cryptosporidium* spp. em psitacídeos foram realizadas nos Estados Unidos da América (EUA) (RAVICH et al., 2014) em um período de 14 anos, utilizando como diagnóstico a histopatologia e técnicas moleculares. Foi possível verificar que em 11 aves (32,5%) (três calopsitas - *Nymphicus hollandicus*, sete agapornes – *Agapornis* spp., um papagaio – *Amazona* spp.) ocorreram graves lesões gastrointestinais originadas por este parasito. A análise molecular foi realizada apenas em duas amostras encontradas em agapornes, e ambas foram identificadas como genótipo Avian III, sendo que este genótipo é considerado como patógeno oportunista, considerado como agente secundário em infecções (DONELEY, 2009).

Um estudo realizado na República Tcheca (MÁCA; PAVLÁSEK, 2015) em um aviário de perdizes (*Alectoris rufa*), utilizando 663 amostras fecais, houve uma positividade para oocistos de *Cryptosporidium* de 22% (145 amostras). Pela biologia molecular foi possível identificar *C. meleagridis* em 141 amostras, enquanto quatro da espécie *C. baileyi*. Os mesmos autores também na República Tcheca analisaram um aviário de faisões (*Phasianus colchicus*) (MÁCA; PAVLÁSEK, 2016), analisando 85 pools de fezes. Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em 14,1% (12 amostras), pelas análises moleculares, oito foram identificados como *C. baileyi*, três como *C. meleagridis* e uma como *C. galli*.

Um grande estudo ocorreu na Península Ibérica envolvendo *Cryptosporidium* spp. em aves selvagens, abrangendo 42% das espécies de aves descritas na região da Galícia (REBOREDO-FERNÁNDEZ et al., 2015). Este ambiente é rico na fauna de pássaros, e foram utilizadas 433 amostras de fezes pertencentes a 64 espécies de aves selvagens. Foram detectados oocistos em 36 amostras (8,3%), nas seguintes aves: Gavião (*Harpia harpyja*), urubu (*Coragyps atratus*), Milhafre Negro (*Milvus parasitus*), Gavião asa-de-telha (*Parabuteo unicinctus*), Pato real (*Anas platyrhynchos*), Andorinhão Negro (*Apus apus*), Noitibó Europeu (*Caprimulgus europaeus*), Cegonha branca (*Ciconia ciconia*), Pombo-torcaz (*Columba palumbus*), Rola (*Streptopelia* spp), Peneireiro (*Falco tinnunculus*), Codorniz (*Coturnix coturnix*), Gralha Negra (*Corvus corone*), Gralha Cinzenta (*Corvus cornix*), Pega-Rabuda (*Pica pica*), Mocho-Galego (*Athene noctua*), Aluco (*Strix aluco*), Coruja das Torres (*Tyto Alba*), Ganso-Patola (*Morus bassanus*). A maioria das amostras estudadas neste estudo correspondeu a espécies de aves de rapina (68%) com prevalência de 7,1% de positividade para *Cryptosporidium*. Estas aves estão localizadas no topo da cadeia alimentar indicando que estes parasitos estão presentes no meio ambiente, uma vez que estas aves se alimentam de pequenos mamíferos, outras aves, peixes e répteis, que provavelmente estão infectados (RYAN; 2010).

#### **2.4. Infecção por *Cryptosporidium* spp. em aves da ordem Columbiformes**

O primeiro relato da presença de *Cryptosporidium* spp. em pombos foi realizado em 1994 (ÖZKUL; AYDIN, 1994) na Turquia. Ocorreu após uma necrópsia realizada em um espécime com 10 dias de idade atendido com sinais e sintomas de depressão, abatimento, gastroenterite e fezes aderidas a pena na área da cloaca. Na necrópsia do pombo foram observadas lesões macroscópicas no trato intestinal, com intestino delgado distendido e presença de líquido de cor verde. Microscopicamente as vilosidades nas porções inferiores do intestino delgado estavam atrofiadas e disformes, com infiltração da lâmina própria por células mononucleares. A detecção de *Cryptosporidium* spp. foi realizada por microscopia das criptas intestinais, acreditando-se que este parasito foi responsável pela diarreia e morte do

pombo. Embora tenha sido detectada a presença de *Escherichia coli* também na mucosa intestinal e sua participação na patogenia não poderia ser excluída.

A infecção por *Cryptosporidium* spp. em pombos provoca alterações clínicas associada principalmente a queda no ganho de peso e redução da capacidade de vôo a grandes distâncias (RADFAR et al., 2012). Por outro lado, os pombos interagem com aves selvagens, domésticas e diversos mamíferos, incluindo humanos, facilitando a dispersão deste parasito, caso estejam infectados (GRACZYK et al., 2008). Estudos são escassos a respeito da presença deste parasito nestas aves. Desde a primeira descrição na Turquia (ÖZKUL; AYDIN, 1994), até o momento ocorreram em apenas três países asiáticos: Irã, Tailândia, e China, com a distribuição demonstrada na tabela 2.

Na pesquisa desenvolvida por Qi et al. (2011) na China para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em 32 espécies de aves envolveram 434 amostras fecais. Destas 21 eram de pombos e uma foi positiva para *C. meleagridis*. Ainda nas columbiformes, duas amostras fecais de rola (*Streptopelia turtur*) foram analisadas e uma foi positiva para *C. meleagridis*. Estas amostras foram obtidas de Pet Shops localizadas na cidade de Zhengzhou, Província de Henan. Devido ao grande número de aves de estimação na China para o mercado interno e exportação (pelo menos um milhão de aves por ano para países do Sudeste Asiático) (WEI, 2003), a presença deste parasito nas aves de estimação não deve ser negligenciada, devido a importantes implicações para a saúde pública, especialmente para crianças e idosos, que tem maior frequência no contato com estas aves de estimação (QI et al., 2011).

**Tabela 2.** Distribuição da prevalência de *Cryptosporidium* spp. pelo mundo até o momento em fezes de pombos (*Columba livia*).

Localidade	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp.	Referências
China	4,8%	QI et al., 2011
Irã	2,94%	RADFAR et al., 2012
Irã	1,2%	BAHRAMI et al., 2012
Tailândia	25%	KOOMPAPONG et al., 2014
Irã	2,7%	BADPARVA et al., 2014
China	0,82%	LI et al., 2015
China	25%	LI et al., 2016
Irã	2,5%	MIRZAGHAVAMI et al., 2016

A China possui alta produção de pombos, tendo a província de Guangdong aproximadamente 6 milhões destas aves. São utilizados como fonte de proteínas na alimentação humana, mas também como animais de estimação e em competições esportivas, aumentando assim, o interesse da sua criação nos últimos anos (CHEN, 2012). No estudo realizado por Qi et al. (2011) com 32 aves diferentes de Pet Shop, destas 21 eram pombos, com uma amostra positiva (4,8%) para *Cryptosporidium meleagridis*. Em outro trabalho

realizado na China por Li et al. (2015), foram estudados pombos de criatórios para consumo humano. Neste último estudo, foram analisadas 244 amostras fecais de pombos de quatro criações da Província de Guangdong, duas amostras foram positivas para *Cryptosporidium* (0,82%) e caracterizadas pelo estudo molecular uma como *C. baileyi* e a outra como *C. meleagridis*. Devido aos hábitos alimentares da região, a indústria de pombos desempenha um papel relevante para o crescimento econômico, sendo essencial esse monitoramento. A presença de infecções por *C. baileyi* torna-se importante já que esta espécie diminui o ganho de peso dos animais infectados (GOODWIN et al., 1996; SRETER; VARGA, 2000).

Nestes dois estudos na China houveram a detecção de *C. meleagridis*, que tem sido considerada a terceira espécie mais envolvida na transmissão zoonótica deste gênero (ficando atrás apenas de *C. parvum* e *C. hominis*) (XIAO; FENG, 2008). Embora até o momento a transmissão de *Cryptosporidium* spp. em seres humanos na China seja mal compreendida. Estudos recentes relataram a ocorrência de infecção por *C. meleagridis* (21,4%) em pacientes internados em Xanghai (FENG et al., 2012). Além disso, *C. meleagridis* e *C. baileyi*, já foram detectadas em águas residuais desta mesma cidade (LI et al., 2012). Um trabalho realizado em 2016 no nordeste da China envolvendo 27 espécies diferentes de aves comercializadas em Pet Shop. Desta vez quatro amostras fecais de pombos foram analisadas para a presença do gênero *Cryptosporidium*. Apenas uma amostra (25%) foi positiva e caracterizada molecularmente como *C. baileyi* (LI et al., 2016).

Radfar et al. (2012) realizaram um estudo no Irã para pesquisa de parasitos em pombos, envolvendo helmintos, ectoparasitos e protozoários. O trabalho ocorreu na cidade de Birjand, e o inquérito revelou a presença de 13 patógenos, entre eles *Cryptosporidium* spp. Um total de 102 amostras fecais de pombos foram analisadas, sendo que três amostras (2,94%) foram positivas utilizando a técnica da microscopia. Não foi realizado o estudo molecular das amostras. Nesta região o pombo é utilizado como fonte de alimento, pois são animais que tem ganho de peso rápido e seu manejo é facilitado. A infecção por este coccídeo pode provocar efeito significativo sobre a taxa de desenvolvimento destas aves reduzindo sua produtividade, além de se tornar um reservatório do protozoário para o homem (RADFAR et al., 2012). Neste mesmo ano no Irã um outro trabalho foi desenvolvido, desta vez com pombos de corrida. Foram analisados diversos agentes parasitários que poderiam prejudicar a performance destas aves nas competições. Após a análise das amostras fecais de 250 pombos, três (1,2%) foram positivas pela microscopia para oocistos de *Cryptosporidium* spp. (BAHRAMI et al., 2012).

Na cidade de Khorramabad, localizada no oeste do Irã, Badparva et al. (2014), realizaram um estudo envolvendo diversas espécies de aves da região inclusive com pombos. Foram analisadas pela microscopia 37 amostras fecais, sendo duas (2,7%) com a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Novamente no Irã, porém na capital Teerã, Mirzaghavami et al. (2016), realizaram um estudo utilizando amostras fecais de animais sinantrópicos comuns na região, que são potenciais reservatórios de patógenos para humanos. Estes autores realizaram a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por análise microscópica em gatos, corvos, ratos e pombos. Em relação aos pombos, foram utilizadas armadilhas para captura destas aves. Foram coletadas 40 amostras de fezes, sendo que uma delas foi positiva (2,5%) para *Cryptosporidium* spp. Neste estudo, não foram utilizadas técnicas moleculares para o diagnóstico.

Koompapong et al. (2014) na Tailândia pesquisaram *Cryptosporidium* spp. em gaivotas (*Larus* spp.) e pombos domésticos, pelo fato destas aves viverem perto de fontes de água, tornando-as potenciais veiculadores de patógenos ao homem. Neste país, diversas pessoas visitam a região do cais à beira-mar e áreas de lazer com presença de fontes de água. Também essas áreas funcionam como santuários para estas aves, que se reúnem em certos momentos, à espera de pessoas para alimentá-las, tornando uma zona de risco de transmissão



zoonótica. Amostras fecais de pombos foram coletadas em três locais: próximo ao cais em Wat Rakang Kositaram; o santuário religioso Brahmin Swing; e o parque urbano Pramane Ground todas localizadas em Bangkok. Estas amostras foram obtidas em *pools* com fezes de 10 pombos cada, com 7 “*pools*” no total, em que um destes (14,28%) obtido na região do píer foi positivo para *C. meleagridis*. Pombos que vivem em parques urbanos podem ser uma fonte zoonótica da criptosporidiose, afetando principalmente imunocomprometidos, crianças e idosos (QI et al., 2011), além do fato deste parasito ser transmitido através da água de consumo e águas residuais (XIAO et al., 2012).

No estudo de Reboredo-Fernández et al. (2015) na Espanha para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em aves, foram testadas oito amostras fecais de Pombo-Torcaz (*Columba palumbus*) e uma amostra foi positiva (12,5%). Outro Columbiforme também foi utilizado, a rola (*Streptopelia turtur*), sendo analisadas duas amostras fecais, com uma (50%) diagnosticada com *C. meleagridis*.

## 2.5. Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp.

Atualmente, 30 espécies de *Cryptosporidium* são reconhecidas como válidas, sendo estas diagnosticadas utilizando metodologias moleculares (ŠLAPETA, 2013; RYAN; HIJAWI, 2015; NAKAMURA; MEIRELLES, 2015; LI et al., 2015; CHELLADURAI et al., 2016; ZAHEDI, 2016). Nestas, inclui-se *Cryptosporidium proliferans* que foi recentemente descrito em toupeiras (*Tachyoryctes splendens*) no Quênia (KVÁČ et al., 2016).

As orientações básicas para a descrição de uma nova espécie do gênero *Cryptosporidium*, incluem a necessidade de fornecer dados de morfologia do oocisto; fornecer a caracterização genética; demonstrar infecção natural com a localização da infecção, e quando possível, a infecção experimental. Além disso, cumprir as regras que são fornecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (FENG, 2010; RYAN, POWER, 2012). A identificação de oocistos através do diagnóstico morfológico do protozoário, não sustenta uma classificação de espécie e/ou genótipos, pois as similaridades morfológicas dos oocistos entre as espécies e /ou genótipos tornam impossíveis uma identificação específica (FAYER et al., 2000; HUBER et al., 2004; FAYER, 2007; SMITH, 2007; FAYER, 2010; XIAO, 2010).

Nos hospedeiros da classe das aves são descritas três espécies (*C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis*) (SMITH et al., 2006; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008; RYAN et al., 2014). Além destas três espécies de *Cryptosporidium* reconhecidas como válidas para aves, têm sido relatados 13 genótipos com “*status*” de espécies desconhecidas, sendo estes os genótipos Avian I-VI, o genótipo do pato preto, o genótipo da galinhola (*Woodcock*) da Euroasiática e genótipos de gansos I-V (RYAN et al., 2014; ABE, MAKINO, 2010), sendo que nenhum destes é considerado patogênico para humanos e parecem ser adaptados aos hospedeiros da classe das aves (FENG, 2010; RYAN; POWER, 2012). São considerados genótipos distintos. No entanto, no futuro poderão ser descritos como novas espécies, uma vez que mais informações sobre a sua biologia possam estar disponíveis (RYAN, 2010).

### 2.5.1. *Cryptosporidium meleagridis* Slavin, 1955

A espécie *C. meleagridis* foi descrita por Slavin em 1955 no íleo de perus selvagens (*Meleagris gallopavo*), e posteriormente foi encontrado em ampla faixa de hospedeiros. Possui potencial patogênico, sendo descrito em diversas espécies de aves (tabela 3), também tem sido relatado em cães (*Canis familiaris*), bovinos (*Bos taurus*), suínos (*Sus scrofa*),

coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), roedores (*Rattus* spp.) e humanos (*Homo sapiens*), considerada como uma espécie zoonótica. Inclusive, é considerada a terceira espécie mais encontrada em humanos em todo o mundo, ficando atrás apenas de *C. parvum* e *C. hominis* (QUAH et al., 2011; LI et al., 2015).

**Tabela 3.** Aves detectadas com *Cryptosporidium meleagridis* e os países onde foram descritas respectivamente.

<b>AVE HOSPEDEIRA</b>	<b>LOCAL DE DESCRIÇÃO</b>
<b>Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)</b>	EUA Suécia Argélia Brasil Tunísia
<b>Perus (<i>Meleagris gallopavo</i>)</b>	EUA Itália Argélia
<b>Periquito de colar (<i>Psittacula krameri</i>)</b>	Austrália
<b>Calopsita (<i>Nymphicus hollandicus</i>)</b>	Japão
<b>Perdiz vermelha (<i>Alectoris rufa</i>)</b>	China
<b>Periquito de colar rosa (<i>Psittacula krameri</i>)</b>	República Tcheca
<b>Asa de cera (<i>Bombycilla garrulus</i>)</b>	Tailândia
<b>Rolinha oriental (<i>Streptopelia orientalis</i>)</b>	Tailândia
<b>Pombo rabo de leque (<i>Columba livia domestica</i>)</b>	Tailândia
<b>Codorna escamada azul (<i>Callipepla squamata</i>)</b>	Tailândia
<b>Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>)</b>	Tailândia
<b>Codornas (<i>Coturnix coturnix japonica</i>)</b>	China
<b>Rola (<i>Streptopelia turtur</i>)</b>	Espanha

Adaptado de KOOMPAPONG et al., 2014.

Em perus, este coccídeo provoca infecções subclínicas e em alguns casos manifestações como diminuição do ganho de peso, diarreia e distensão do intestino delgado (GOODWIN et al., 1988; . GHARAGOZLOU et al., 2006). Esta espécie tem como local de parasitismo, principalmente o íleo dos indivíduos atingidos, causando além da diarreia, atrofia de vilosidades, hipertrofia das criptas intestinais, promovendo uma intensa redução no ganho de peso. Outros sítios de infecção são citados, tais como, a Bursa de Fabricius, o trato respiratório e urinário. Nestas localizações, também podem causar altas mortalidades (RYAN, 2010). Diversos autores indicam que apenas esta espécie de *Cryptosporidium* consegue infectar tanto aves como mamíferos. É considerada a principal espécie aviária com potencial patogênico para humanos, sendo diagnosticada tanto em indivíduos imunocompetentes quanto em imunodeprimidos, seja em países industrializados ou aqueles em desenvolvimento (AKIYOSHI et al., 2003; XIAO et al., 2004a; XIAO; FENG, 2008; ABE; MAKINO, 2010; RYAN, 2010; BAROUDI et al., 2013; STENSVOLD et al., 2014).

Embora *C. meleagridis* infecte aves domésticas (LINDSAY et al., 1989a), a criptosporidiose clínica ocorre com pouca frequência, havendo relatos ocasionais desta

patologia. Normalmente é subclínica ou associada a sinais clínicos em co-infecções com outros patógenos (NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

Inicialmente haviam sugerido que *C. meleagridis* seria o *C. parvum*. No entanto análises moleculares nos EUA, Austrália e países da Europa com isolados da subunidade menor do RNA ribossomal (18S), proteína HSP70, proteínas da parede do oocisto (COWP), actina e glicoproteína 60 (GP60), demonstraram a singularidade genética e biológica de *C. meleagridis*. Análises filogenéticas sugerem que esta espécie foi originada de um *Cryptosporidium* parasito de mamífero que se estabeleceu em aves pela ingestão de presas infectadas (XIAO et al., 2002; RYAN, 2010).

Em uma pesquisa conduzida na República Tcheca entre 2012 e 2013 (MÁČA; PAVLÁSEK, 2015), utilizando 663 amostras fecais de Perdizes vermelhas (*Alectoris rufa*) criadas em cativeiro, foi detectado *Cryptosporidium* em 22% (146 amostras), sendo que 21% (142) de *C. meleagridis* e 0,6% de *C. baileyi* (4 amostras). Na Argélia entre 2010 e 2011, Baroudi et al. (2013), realizaram um estudo com 90 amostras do íleo de galinhas e 57 de perus. Das amostras de galinhas, 26 continham *C. meleagridis* e cinco *C. baileyi*, enquanto nos perus 25 (43,9%) foram detectados apenas *C. meleagridis*.

### 2.5.1.1. Subtipos de *Cryptosporidium meleagridis*

Devido às diferenças genéticas, *C. meleagridis* pode ser classificado em subtipos, sendo reportados na literatura tanto em humanos quanto em aves (ABE; MAKINO, 2010; XIAO, 2010; BAROUDI et al., 2013). Para a realização da subtipagem, inicialmente foram propostas técnicas de PCR e Nested-PCR utilizando o gene 18S (XIAO et al., 1999a; FENG et al., 2007). Assim, era obtido um fragmento entre 826 e 864 pb, seguido de uso de enzimas de restrição (XIAO et al., 1999a). Posteriormente, as amostras eram submetidas a um novo PCR e Nested-PCR para o gene alvo GP60, obtendo fragmento de aproximadamente 650 pb. Estes produtos foram sequenciados, editados e analisados, posteriormente comparados com as sequências depositadas no GenBank, para classificação do seu respectivo subtipo (SULAIMAN et al., 2005; XIAO, 2010; FENG et al., 2011). Em 2014, Stensvold et al. realizaram reações tendo como base para desenho dos primers, sete isolados de *C. meleagridis* que demonstraram maior especificidade. Pois nos estudos anteriores estes iniciadores foram desenvolvidos tendo como bases sequências de *C. parvum* e *C. hominis*.

Até o momento, nove subtipos têm sido reconhecidos para *C. meleagridis*, nomeados como IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe, IIIf, IIIg, IIIh e IIIi. A porção final 5' do gene que codifica a GP60 contém uma região variável da tríade que codifica o aminoácido serina (TCA/TCG/TCT), que é o alvo primário dos métodos de tipagem do GP60. Desta forma os subtipos do *C. meleagridis* iniciam com a designação IIIa, IIIb, etc, seguido dos números repetidos de TCA (representado pela letra A), TCG (representado pela letra G), TCT (representado pela letra T). Alguns subtipos também possuem uma ou mais cópias da sequência ACATCA imediatamente após a tríade de nucleotídeos repetida, representada pela letra R. Assim, por exemplo, o subtipo denominado IIIbA23G2R1, indica que o parasito pertence ao *C. meleagridis* subtipo IIIb e tem 23 cópias de TCA, duas de TCG na região repetida da tríade de nucleotídeos, seguido de uma cópia da sequência ACATCA (SULAIMAN et al., 2005; FENG et al., 2011; ABAL-FABEIRO et al., 2013; BAROUD et al., 2013; STENSVOLD et al., 2014).

Estudos demonstram que *C. meleagridis* possui baixa especificidade de hospedeiro e muitos subtipos têm sido encontrados tanto em aves como em humanos, havendo sugestões de transmissões zoonótica e antroponótica (CAMA et al., 2003; ELWIN et al., 2012; SILVERLAS, 2012; STENSVOLD et al., 2014).

No estudo de Stensvold et al. (2014), foram identificados os subtipos de vinte amostras de *C. meleagridis* obtidas na Suécia, sendo que o isolado IIIg indicou uma transmissão zoonótica no país. Uma vez que esse subtipo foi diagnosticado em amostras de humanos e em quatro aves domésticas, todas originadas de um surto de *C. meleagridis* em uma fazenda orgânica (SILVERLAS; BLANCO-PENEDO, 2013). Todas as sequências do IIIg deste surto foram 100% idênticas, porém diferentes de outros subtipos IIIg encontrados em humanos na Espanha e Reino Unido e de aves domésticas na Argélia (ABAL-FABEIRO et al., 2013; BAROUD et al., 2013). O subtipo IIIb foi encontrado em todo o mundo, embora os casos identificados na Europa provavelmente foram contraídos na Ásia, o subtipo IIIbA26G1R1b encontrado em uma pessoa infectada na África foi previamente diagnosticada em um paciente HIV positivo na China (WANG et al., 2013). Enquanto outra variante deste subtipo IIIbA26G1R1a, foi encontrada em um paciente HIV positivo no Quênia (GLABERMAN et al., 2001). Quatro pacientes suecos que viajaram para Índia e Tailândia antes da infecção carregaram o subtipo IIIbA22G1R1c. A mesma variante do subtipo tinha sido previamente detectada em um paciente na Inglaterra, provavelmente infectado na Índia (ABAL-FABEIRO et al., 2013). Uma segunda variante deste subtipo IIIbA22G1R1b, foi registrada de um humano infectado no Japão (ABE, 2010), e finalmente, uma terceira variante, IIIbA22G1R1a foi encontrada em perus nos EUA (GLABERMAN et al., 2001). Três pacientes detectados com o subtipo IIIe neste estudo da Suécia tinham viajado para países da Ásia, sendo que tanto no Japão como na China este mesmo subtipo já havia sido descrito em humanos, e um caso em calopsita no Japão (ABE, 2010; ABE e MAKINO, 2010; WANG et al., 2013). Outro relato deste mesmo subtipo ocorreu também na China, porém em bovinos (ZHANG et al., 2013), destacando assim a ampla gama de hospedeiros deste subtipo.

No quadro 1, estão demonstrados os subtipos de *C. meleagridis* descritos até o momento, de acordo com seus hospedeiros em que se obtiveram a amostra e o país de origem.

**Quadro 1.** Subtipos descritos até o momento, de *Cryptosporidium meleagridis* utilizando o gene alvo GP60 de acordo com a região descrita e seus respectivos hospedeiros.

<b>HOSPEDEIRO</b>	<b>PAÍS DE ORIGEM</b>	<b>SUBTIPO de <i>C. meleagridis</i></b>
<b>Humano</b>	Jordânia	IIIaA12G3R1
<b>Peru</b>	EUA	IIIaA24G3R1
<b>Humano (HIV +)</b>	Quênia	IIIaA24G3R1
<b>Humano (HIV +)</b>	Peru	IIIbA13G1R1
<b>Humano</b>	Tailândia	IIIbA19G1R1
<b>Humano</b>	Tailândia	IIIbA19G1R1
<b>Humano</b>	Japão	IIIbA20G1R1
<b>Humano</b>	Tailândia/Vietnam	IIIbA21G1R1
<b>Humano</b>	Tailândia	IIIbA21G1R1
<b>Humano</b>	Índia	IIIbA22G1R1
<b>Humano</b>	India	IIIbA22G1R1
<b>Humano</b>	India	IIIbA22G1R1
<b>Humano</b>	Tailândia	IIIbA22G1R1
<b>Humano</b>	India	IIIbA22G1R1
<b>Humano</b>	Japão	IIIbA22G1R1
<b>Peru</b>	EUA	IIIbA22G1R1
<b>Humano</b>	Indonésia	IIIbA23G1R1
<b>Humano</b>	Tailândia	IIIbA23G1R1
<b>Humano</b>	Indonésia	IIIbA23G2R1

**Quadro 1.** Subtipos descritos até o momento, de *Cryptosporidium meleagridis* utilizando o gene alvo GP60 de acordo com a região descrita e seus respectivos hospedeiros (Continuação).

<b>Humano</b>	África do Sul	IIIbA26G1R1
<b>Humano (HIV +)</b>	Quênia	IIIbA26G1R1
<b>Humano (HIV +)</b>	China	IIIbA26G1R1
<b>Humano (HIV +)</b>	China	IIIbA26G1R1
<b>Humano (HIV +)</b>	China	IIIbA27G1R1
<b>Humano (HIV +)</b>	China	IIIbA29G1R1
<b>Humano (HIV +)</b>	China	IIIbA29G1R1
<b>Humano (criança)</b>	Peru	IIIcA6R1
<b>Humano (HIV +)</b>	Índia	IIIcA6R1
<b>Humano</b>	África do Sul	IIIIdA4
<b>Humano (HIV +)</b>	Índia	IIIIdA6R1
<b>Humano (HIV +)</b>	Índia	IIIIdA6R1
<b>Humano (HIV +)</b>	Índia	IIIIdA6R1
<b>Humano (HIV +)</b>	Índia	IIIIdA6R1
<b>Humano (HIV +)</b>	Índia	IIIIdA6R1
<b>Humano (HIV +)</b>	Índia	IIIIdA6R1
<b>Humano</b>	Japão	IIIeA16G2R1
<b>Humano</b>	Índia	IIIeA17G2R1
<b>Humano</b>	Uzbequistão	IIIeA19G2R1
<b>Ave (calopsita)</b>	Japão	IIIeA20G2R1
<b>Ave (calopsita)</b>	Japão	IIIeA20G2R1
<b>Bovino</b>	China	IIIeA22G2R1
<b>Humano</b>	Índia	IIIeA25G2R1
<b>Humano (HIV +)</b>	China	IIIeA26G2R1
<b>Humano</b>	Austrália	IIIfA16G2R2
<b>Ave</b>	Argélia	IIIgA18G4R1
<b>Ave</b>	Argélia	IIIgA19G5R1
<b>Ave</b>	Argélia	IIIgA19G5R1
<b>Humano</b>	Reino Unido	IIIgA23G3R1
<b>Humano</b>	Espanha	IIIgA23G3R1
<b>Ave</b>	Argélia	IIIgA24G2R1
<b>Humano</b>	Reino Unido	IIIgA24G3R1
<b>Ave</b>	Argélia	IIIgA26G3R1
<b>Humano</b>	Reino Unido	IIIgA26G3R1
<b>Galinha</b>	Suécia	IIIgA31G3R1
<b>Frango</b>	Suécia	IIIgA31G3R1
<b>Frango</b>	Suécia	IIIgA31G3R1
<b>Humano</b>	Suécia	IIIgA31G3R1
<b>Frango</b>	Suécia	IIIgA31G3R1

Adaptado de: STENSVOLD et al., 2014.

### 2.5.2. *Cryptosporidium baileyi* Current, Upton and Haynes, 1986

*Cryptosporidium baileyi* é a espécie mais comum que infecta aves, incluindo domésticas e selvagens (GOODWIN, 1989; FAYER, 2010), sendo principalmente associada a infecção no trato respiratório superior (RYAN, 2010), atingindo o ouvido médio e mucosa da

conjuntiva de aves selvagens, tais como corujas (*Otus scops*), andorinhas (*Petrochelidon pyrrhonota*), falcões (*Falco cherrug* e *Falco rusticolus*) e perdizes vermelho (*Lagopus lagopus scoticus*) (VAN ZEELAND et al., 2008; MOLINA-LOPEZ et al., 2010; COLDWELL et al., 2012; LEY et al., 2012; BOUGIOUKLIS et al., 2013; BAINES et al., 2014). Também atinge aves domésticas como galinhas (*Gallus gallus domesticus*) (BLAGBURN et al., 1991), gansos (*Anser anser*) (CHVALA et al., 2006), perus (*Meleagris gallopavo*) (GLISSON et al., 1984), patos (*Cairina momelanotus*) (MASON, 1986; O'DONOGHUE et al., 1987), pavões (*Pavo cristatus*) (MASON; HARTLEY, 1980) e faisões (*Phasianus colchicus*) (RANDALL, 1986).

A transmissão cruzada de *C. baileyi* já foi documentada por diversos autores especialmente entre galinhas e perus, e algumas espécies de codornas e patos. Esta probabilidade de transmissão ocorre quando estas aves são criadas e mantidas em conjunto (LINDSEY et al., 1986; HAMIDINEJAT et al., 2014).

A infecção oral causada pelo *C. baileyi* geralmente é subclínica, embora possa haver redução do ganho de peso de forma transitória (BLAGBURN et al., 1987; LEVY et al., 1988; MEIRELES et al., 1999). Após a infecção oral ou intratraqueal, *C. baileyi* coloniza a Bursa de Fabricius, que apresenta ligeira hiperemia na mucosa, podendo reduzir a capacidade imunológica da ave acometida (SCOTT, 2004), principalmente a resposta humoral contra a doença de Marek (ABBASSI et al., 2000), a doença de Gumboro (LEVY et al., 1988), infecções por reovírus (GUY et al., 1988), a doença de Newcastle (RHEE et al., 1998; ELADL et al., 2014), a bronquite infecciosa (RHEE et al., 1998) e gripe aviária (HAO et al., 2008; ELADL et al., 2014).

A associação de *C. baileyi* com outros agentes infecciosos pode resultar em redução do ganho de peso entre as galinhas com índices elevados de mortalidade. Entre os agentes que podem apresentar sinergia com *C. baileyi* são: vírus da doença de Marek (ABBASSI et al., 2000), vírus da anemia infecciosa das aves (HORNOK et al., 1998), vírus da doença de Gumboro (LEVY et al., 1988) e reovírus (GUY et al., 1988).

Nas infecções respiratórias, *C. baileyi* atinge inicialmente a parte superior, podendo difundir para o trato respiratório inferior, incluindo brônquios, pulmões e sacos aéreos, havendo possibilidades de associação com outros agentes etiológicos de infecções respiratórias em frangos (*Gallus gallus domesticus*), tais como *Escherichia coli* e o vírus da bronquite infecciosa, resultando em altos índices de mortalidade (BLAGBURN et al., 1987; GOODWIN, 1989; BLAGBURN et al., 1991; MEIRELES et al., 1999).

Estudos de infecções orais com oocistos de *C. baileyi* em galinhas resultaram em grande parasitismo do trato respiratório. Esta espécie desempenha um papel importante na patogênese de doenças respiratórias na produção de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) e perdas podem ocorrer inesperadamente. Duas manifestações diferentes deste tipo de patologia podem ser observadas, uma com envolvimento respiratório superior, que incluiu sinusite ("cabeça inchada"), e outro na inferior que incluiu colonização dos sacos de traquéia, brônquios e pulmões. Nesta última forma são maiores as taxas de mortalidade. Lesões graves relatadas incluem exsudado mucóide excessivo nos sacos conjuntivais ou nasais, dos seios nasais e traqueia, hiperemia, seios edematosos, pulmões cinza-vermelho manchado, sacos de ar nebuloso, atrofia da bursa, fígado alterado, baço inflamado, e emagrecimento (SRÉTER; VARGA, 2000; RYAN 2010).

*Cryptosporidium baileyi* foi analisado em vários loci presentes nos genes 18S, HSP70, COWP e actina e demonstrou ser geneticamente distinto das demais espécies, além disso, esta espécie é mais estreitamente relacionada ao genótipo Avian I, II e V (FAYER, 2010; RAVICH et al., 2014). Esta espécie é mais comumente diagnosticada em aves domésticas, mas há registros de diagnóstico em mais de 20 espécies de aves em todo o mundo, tanto domésticas quanto selvagens, também incluindo se pombos (RYAN, 2010; RAVICH et al.,

2014; WANG et al, 2014). Os sinais clínicos da doença em aves, estão associados a diminuição do ganho de peso e na produção de ovos, bem como rendimento de produção de carne (SRÉTER; VARGA, 2000; WANG et al., 2014).

Na China entre 2006 e 2007, WANG et al. (2012) realizaram uma análise com fezes de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) criadas em cativeiro para pesquisa de *Cryptosporidium*, sendo que este país possui 20% do número destas aves no mundo. Foram utilizadas 1818 amostras fecais, e 239 foram positivas (13,1 %), 237 foram caracterizadas como *C. baileyi*, as outras duas amostras foram identificadas como *C. meleagridis*. Os autores não consideram que estas aves sejam importantes reservatórios do gênero *Cryptosporidium* com potencial zoonótico, pois estudos demonstram que esta espécie possui baixo nível de virulência para os humanos (WANG et al., 2012).

Em outro estudo realizado por Wang et al. (2014) com 385 amostras de frangos (*Gallus gallus domesticus*), 38 amostras foram positivas para o gênero *Cryptosporidium* sendo que 33 foram identificadas como *C. baileyi*, duas *C. meleagridis* e três para o genótipo Avian tipo II. Foram realizadas também a análise filogenética das amostras utilizando o gene 18S e os isolados mostraram alta homologia de sequência (99% de similaridades com amostras de codornas e 99,5% de similaridade com amostras de frangos do Irã). Este estudo recente na China alertou sobre os riscos que este patógeno pode levar a economia local, pelo fato deste parasito diminuir a taxa de crescimento em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) e diminuir a produção de ovos de galinhas poedeiras.

No estudo conduzido por Hamidinejat et al. (2014) no Irã entre 2012 e 2013 com 1000 frangos (*Gallus gallus domesticus*), foram obtidas 1000 amostras fecais e 1000 amostras de traquéia. O resultado obtido foi de cinco amostras positivas para cada grupo de amostras (0,5% em cada), sendo que três amostras foram positivas simultaneamente nas fezes e na traquéia. Nenhuma ave apresentava desordens respiratórias e gastrointestinais. *Cryptosporidium* spp. pode afetar o epitélio mucociliar nos órgãos respiratórios reduzindo a imunidade inata e com isso facilitando situações que favoreçam a infecção por vírus (NILI; ASASI, 2002; HAMIDINEJAT et al., 2014).

### **2.5.3. *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999**

A terceira espécie de *Cryptosporidium* nas aves foi descrita pela primeira vez por Pavlásek (PAVLÁSEK, 1999, 2001) em proventrículos de galinhas. Posteriormente, o parasito foi redescrito com base em dados moleculares (RYAN et al., 2003a). Pouco tempo depois uma espécie foi descoberta no proventrículo de um pássaro australiano (*Stagonopleura guttata*) e foi nomeada *C. blagburni* (MORGAN et al, 2000), porém através de análises moleculares revelou-se que esta espécie era idêntica ao *C. galli*, havendo uma sinonímia, e segundo a lei da prioridade, permaneceu *C. galli* (RYAN et al., 2003).

Ao contrário das outras duas espécies relatadas anteriormente, os estágios do ciclo de vida de *C. galli* desenvolvem-se em células epiteliais do proventrículo, e não no trato respiratório ou intestinal em uma ampla variedade de aves (PAVLÁSEK, 1999, 2001; RYAN et al., 2003). Não há associação baseada em evidências entre criptosporidiose gástrica e a presença de sinais clínicos em aves. No entanto, existem razões para se acreditar que a criptosporidiose gástrica em aves, poderia conduzir a altas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, a espécie está associada a infecções crônicas em aves adultas, com liberação prolongada de oocistos no ambiente (SILVA et al., 2010; NAKAMURA et al., 2014; NAKAMURA; MEIRELLES, 2015).

A análise histopatológica de tentilhões (*Fringilla coelebs*) infectados demonstrou necrose e hiperplasia de células epiteliais glandulares proventriculares associadas a um grande

número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. ligados à superfície destas células (MORGAN et al., 2001). Infecções naturais por *C. galli* já foram relatados além das galinhas, em papagaios turquesa (*Neophema pulchella*), flamingos (*Phoenicopterus ruber*), calaus (*Buceros rhinocerotis*), e outros passeriformes (NG et al., 2006; RYAN, 2010). *C. galli* é a espécie mais frequentemente detectada em Passeriformes e Psittaciformes (NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; SILVA et al., 2010; SEVÁ et al., 2011; QI et al., 2011).

Através de estudos utilizando os genes 18S, da actina e HSP70, foi possível a demonstração de que *C. galli* é uma espécie distinta. A sua localização gástrica nos hospedeiros e seu tamanho maior, sugerem que está mais intimamente relacionado com outras espécies gástricas, tais como *C. muris*, *C. andersoni* e *C. serpentis* (MORGAN et al., 2000; RYAN, 2010; MÁCA; PAVLEV, 2015).

Um estudo realizado na Austrália por NG et al. em 2006, utilizando amostras fecais de 430 aves selvagens, revelou positividade em 27 (6,3%) para *Cryptosporidium*, sendo que destas, nove foram diagnosticadas como *C. galli*, uma amostra como genótipo Avian I, doze como genótipo Avian II e cinco do genótipo Avian III. Em 2014, Nakamura et al. analisaram 1027 amostras fecais de aves selvagens em São Paulo encontraram o coccídeo em 108 amostras (10,52%). Destas, 40 foram analisadas por estudos moleculares, sendo 28 identificadas como *C. galli* (espécie de maior prevalência obtida no estudo), oito foram classificadas como *C. baileyi*, três como genótipo Avian III e uma amostra como genótipo Avian V. Os autores afirmaram que um dos motivos seria que estas aves são mantidas em cativeiro por longos períodos de tempo em gaiolas ou viveiros próximos, podendo resultar na infecção em diversos hospedeiros suscetíveis próximos, por contato direto ou indireto. Neste caso, carregados por pessoas que realizam a manutenção e limpezas de bebedouros e comedouros (NAKAMURA et al., 2014). Antunes et al. (2008) sugeriram que esta espécie, poderia causar gastrite crônica em canários, tentilhões e periquitos com altas taxas de mortalidade. Até o momento, *C. galli* não é considerado com potencial zoonótico (SLAPETA, 2013).

## **2.5.4. Genótipos de *Cryptosporidium* diagnosticados em aves**

### **2.5.4.1. Genótipos Avian I – VI**

Os genótipos *Cryptosporidium* Avian I-VI, foram inicialmente diagnosticados com base no gene 18S (MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; CHELLADURAI et al., 2016). Estes genótipos têm sido relatados em diversas espécies da classe das aves (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; ABE; MAKINO, 2010; CHELLADURAI et al., 2016). Na tabela 4, estão relacionados os seis genótipos que ocorrem na classe das aves, relacionando as possíveis ordens de ocorrência com os sítios de parasitismo e a sua origem.

O genótipo Avian I foi encontrado em canários (*Serinus canaria*) e pavão indiano (*Pavo cristatus*) (NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009). Já o genótipo Avian II foi descrito em avestruzes e em várias espécies de psitacídeos (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; SEVÁ et al., 2011; NGUYEN et al., 2013). Embora Wang et al. (2014) em uma pesquisa relataram a presença do genótipo Avian II em 0,78% (3/385) de amostras fecais de frangos (*Gallus gallus domesticus*) na China, Meireles et al. (2006) não observaram infecção entre galinhas infectadas experimentalmente com genótipo Avian II. Neste trabalho, essas aves foram rastreadas para a infecção pelo gênero *Cryptosporidium* realizando pesquisa citológica e histológica de oocistos nas fezes. O genótipo Avian II coloniza o epitélio da cloaca e menos comumente o reto e a Bursa de Fabricius de avestruzes. A infecção resulta em prolapso da cloaca, particularmente em condições estressantes levando



a imunossupressão ou se houver manejo inadequado na oferta de alimentos, água e higiene (SANTOS et al., 2005).

O genótipo Avian III tem sido descrito em várias espécies de Psitaciformes e Passeriformes (NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; MAKINO et al., 2010; QI et al., 2011; GOMES et al., 2012; NAKAMURA et al., 2014). Este genótipo provoca doença gástrica, com sinais clínicos que incluem vômitos, perda de peso e lesões macro e microscópicas no proventrículo (MAKINO et al., 2010; RAVICH et al., 2014). O tropismo por tecidos e a importância clínica dos demais genótipos nas aves ainda não foi determinada.

Infecções pelo genótipo Avian IV foram descritas apenas uma vez, na ave olho branco Japonês (*Zosterops japonicus*) (NG et al., 2006), enquanto o genótipo Avian V, que foi descrito pela primeira vez por Abe; Makino (2010) em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), houveram dois relatos adicionais em aves da ordem Psittaciformes (QI et al., 2011; NAKAMURA et al., 2014). Ocorre uma similaridade genética entre o genótipo Avian I e V com *C. baileyi* e genótipo Avian II (ABE; MAKINO, 2010; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006). Provavelmente os genótipos Avian I e V colonizam a parte final do intestino, cloaca, Bursa de Fabricius ou sistema respiratório. Por outro lado, o genótipo IV afeta o proventrículo, havendo necessidade de novos estudos para conhecer de forma mais clara o potencial patogênico destes genótipos nas aves e eventualmente em hospedeiros mamíferos (NAKAMURA; MEIRELLES, 2015).

O genótipo Avian VI descrito recentemente no estudo de Chelladurai et al. (2016), possui elevada identidade genética ao *C. galli* (partilhando 99,9% de sua sequência). As aves não apresentavam quaisquer sintomatologia clínica e foi considerado como sítio de localização das formas endógenas o proventrículo (CHELLADURAI et al., 2016).

**Tabela 4.** Genótipos de *Cryptosporidium* descritos até o momento, de acordo com as ordens de aves, sítio de parasitismo e localização geográfica.

Genótipo Avian	Ordem dos Hospedeiros	Sítio de infecção	Origem geográfica
I	Galliformes, Passeriformes	Não registrado	Oceania e América do Sul
II	Galliformes, Psittaciformes, Struthioniformes	Cloaca, reto e Bursa de Fabricius	Ásia, Oceania e América do Sul
III	Passeriformes, Psittaciformes	Proventrículo	América do Norte e América do Sul
IV	Psittaciformes	Não registrado	Europa
V	Psittaciformes	Não registrado	Ásia e América do Sul
VI	Passeriformes	Proventrículo e intestino	América do Norte

Adaptado de: NAKAMURA; MEIRELLES, 2015; CHELLADURAI et al., 2016.

#### 2.5.4.2. Genótipo da Galinhola Euroasiática

Há poucas informações sobre este genótipo, sendo que só foi descrito apenas na galinhola euro-asiática (*Scolopax rusticola*) (NG et al., 2006). Este genótipo está mais

estritamente relacionado ao genótipo Avian III e às espécies de *Cryptosporidium* gástricas (*C. serpentis*, *C. muris*, *C. andersoni*) (RYAN et al., 2003; NG et al., 2006). Todos os estágios endógenos de desenvolvimento, incluindo oocistos, foram detectados somente no proventrículo (RYAN, 2010).

#### 2.5.4.3 Genótipo do Pato preto

Este genótipo foi identificado em um pato preto (*Melanitta nigra*) (MORGAN et al., 2001) apresentando identidades genéticas com os genótipos de ganso I e II nas análises filogenéticas utilizando o gene alvo 18S, apresentando 96,9 e 97,5% de similaridade, respectivamente.

As análises microscópicas de secções do intestino delgado coradas pela hematoxilina e eosina indicaram a ocorrência de uma infecção entérica com numerosos oocistos fixados à superfície apical dos enterócitos, mas informações clínicas sobre a ave infectada não foram disponibilizadas (MORGAN et al., 2001). O genótipo do pato preto foi posteriormente identificado em gansos do Canadá (*Branta canadensis*) (JELLISON et al., 2004; ZHOU et al., 2004). Este genótipo parece ter uma especificidade por hospedeiros da ordem dos Anseriformes.

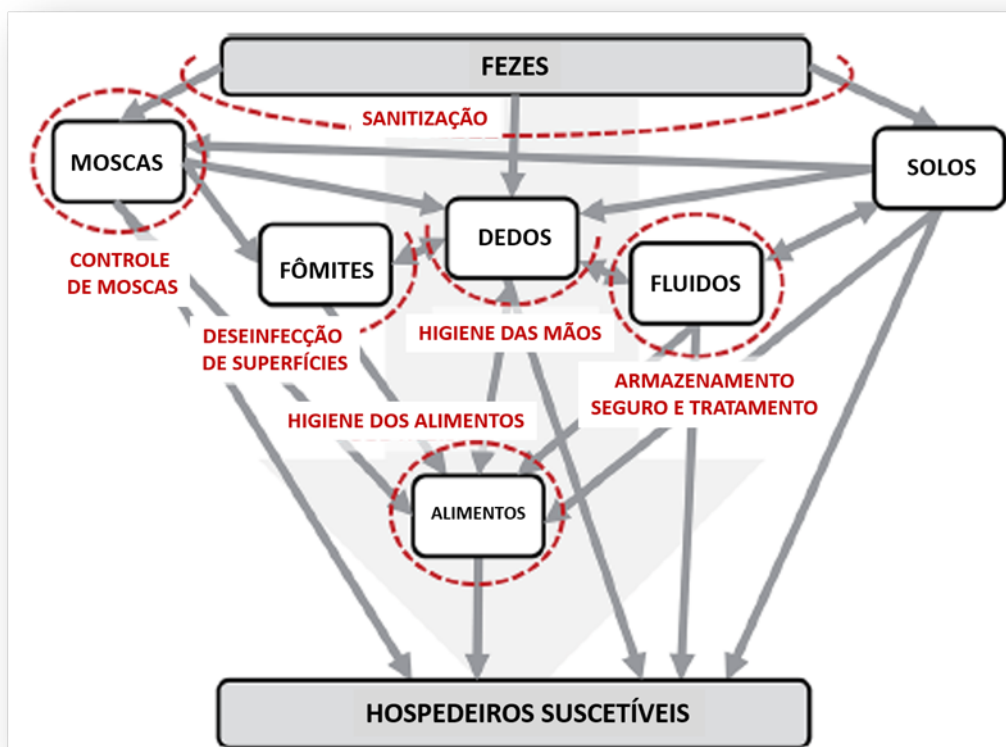
#### 2.5.4.4. Genótipos do Ganso I-V

Um estudo identificou *Cryptosporidium* spp. em gansos canadenses, onde as amostras de fezes foram coletadas em treze locais em Ohio e Illinois, Estados Unidos da América (EUA). Após as caracterizações genéticas, estes foram nomeados de genótipos do ganso I e II, além desses genótipos, foram diagnosticados o genótipo do pato preto e as espécies *C. parvum* e *C. hominis* (ZHOU et al., 2004). Neste estudo, a análise filogenética da sequência do gene 18S revelou que os genótipos ganso I e II e o genótipo do pato preto estavam intimamente relacionados.

Em outro estudo, conduzido por Jellison et al. (2004), usando amostras fecais provenientes de gansos (*Branta canadensis*) do Canadá e dos EUA parasitados por *Cryptosporidium* spp., evidenciaram cinco genótipos do ganso (I-V). Assim como o genótipo do pato, estes parecem ter uma especificidade pelo hospedeiro da ordem dos Anseriformes.

### 2.6. Contaminação ambiental pelo *Cryptosporidium* spp.

O diagrama-F (figura 1), é um modelo conceitual que demonstra a complexidade dos meios de transmissão das doenças diarreicas através de reservatórios ambientais, solo, mãos, fluidos, moscas, alimento e fômites, quando existe um hospedeiro infectado eliminando patógenos pelas fezes (WAGNER; LANOIX, 1958; KAWATA, 1978; JULIAN, 2016). Fluidos, incluem água de beber, águas residuais e de esgoto. Neste sentido, surtos ocasionados pela infecção por *Cryptosporidium* spp. principalmente em pacientes imunocomprometidos vêm sendo registrados na literatura, além de levar a perdas econômicas consideráveis em criações de animais (HAMIDINEJAT et al., 2014).



**Figura 1.** Diagrama-F, Modelo conceitual dos meios de transmissão de patógenos de doenças diarreicas no ambiente. (Adaptado de WAGNER, LANOIX, 1958; KAWATA, 1978)

Estudos vem sendo realizados, com objetivo de detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais, tais como, solo, vegetais, esgoto e fontes de água, evidenciando a presença de seus oocistos. Estes permanecem no ambiente por longos períodos de tempo, aumentando as chances de infecção na população tornando-se assim, responsável por surtos de origem alimentar e de veiculação hídrica em diversas regiões do mundo (FAYER, 2004; BALDERRAMA-CARMONA et al., 2014; DREELIN et al., 2014; HONG et al., 2014; MOSS et al., 2014).

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. são eliminados para o meio ambiente através de material fecal de hospedeiros infectados, permanecendo infecciosos durante meses, dependendo das condições ambientais (HONG et al., 2014). Vários autores já descreveram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em solos na Espanha, Coréia do Sul, China, Tailândia entre outros, notadamente estes estudos ocorreram em áreas rurais ou em localizações com altas concentrações de animais domésticos ou selvagens (WANG et al., 2014).

O solo representa um importante veículo para infecção por *Cryptosporidium* spp. em seres humanos. O solo é contaminado por efluentes (água de esgoto, chuva, inundações e águas residuais), além de fezes de animais (KOKEN et al., 2013; ZILBERMAN et al., 2009). A exposição causada pela inalação de poeiras do solo ou de sua ingestão é um sério risco de saúde para as crianças, que muitas vezes brincando ao ar livre, deliberadamente colocam as mãos em suas bocas. A estimativa de ingestão média de solo por crianças pode chegar entre 5 e 8 gramas por dia (CALABRESE et al., 1989). Em adultos, as pequenas partículas do solo são ingeridas inadvertidamente em um valor em torno de 0,01 gramas por dia (STANECK et

al., 1997). O solo em áreas rurais é altamente predisposto a sofrer contaminação com material fecal devido a falta de infra-estrutura sanitária, tornando-se maior dispersão pela poeira do ar durante a estações mais secas com baixo índice pluviométrico (DOYLE et al., 2012). Um estudo realizado na região rural do México por Balderrama-Carmona et al. (2014), utilizando 21 amostras de solo coletadas durante oito meses em cinco áreas, foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 52% das amostras analisadas. Uma pesquisa semelhante desenvolvida por Hong et al. (2014) na Coréia do Sul, com amostras de solo de sete localidades da região oeste da península deste país, totalizando 34 amostras, foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 32,4% destas. Estes oocistos foram encontrados em áreas de plantações de cenouras, repolhos e "Blueberries".

A preocupação com a contaminação ambiental pelo *Cryptosporidium* spp. teve dois grandes marcos no mundo. O primeiro, em 1989 quando houve um surto em vias navegáveis em Swindon e Oxfordshire na Inglaterra, afetando cerca de 5.000 pessoas (RICHARDSON et al., 1991). Outro evento ocorreu em 1993, um grande surto afetando mais de 400.000 pessoas em Milwaukee nos EUA (MACKENZIE et al., 1994). A magnitude destes surtos, com sua associação ao consumo de água, trouxe atenção do público e dos órgãos governamentais em diversas regiões do mundo. A constatação de que oocistos de *Cryptosporidium* spp. são resistentes a muitos desinfetantes químicos levou a uma busca de métodos eficazes de inativação, porém sem gerar subprodutos prejudiciais ambientais e a saúde humana e animal, como o uso de irradiação com raios ultravioleta (TZIPORI; WIDMER, 2008).

O uso de água não tratada para irrigação em plantações contribui para aumentar a distribuição de *Cryptosporidium* spp. no ambiente, e de modo geral os surtos de origem alimentar e aqueles de veiculação hídrica, muitas vezes não são bem caracterizados. Além disso, o solo contaminado por fezes de animais também pode ser uma fonte de infecção, sendo descrito em varias regiões do mundo. Neste sentido Hong et al. (2014) realizaram um estudo na Coréia do Sul, para avaliar a extensão da contaminação por este coccídeo no solo e em vegetais. Neste trabalho foram coletadas amostras de solo de diferentes regiões da península coreana, e também foram adquiridos verduras (espinafre e couve), frutas (amoras, frutas silvestres e tomates cereja) além de batatas e cenouras. Os resultados obtidos evidenciaram a presença do coccídeo em 32,4% de amostras do solo analisadas, enquanto dos vegetais e frutas, foram analisadas 3 amostras de cada, sendo que cenoura, repolho e amora, cada um positivo para a presença do coccídeo. O alimento pode mediar a infecção humana pela contaminação da água de irrigação e do solo. O crescente aumento da demanda global de alimentos que utilizam rápido transporte e distribuição, especialmente de frutas macias e hortaliças, aumenta o risco de infecção mesmo em áreas distantes das áreas rurais (HONG et al., 2014).

McKerr et al. (2015) relataram um surto generalizado de *Cryptosporidium* spp. em humanos, na Inglaterra e Escócia durante o mês de maio associado ao consumo de folhas da salada frescas pré-cortadas. Novamente levantou-se a hipótese de contaminação do solo por fezes de animais e ao uso de águas contaminadas, uma vez que o oocisto possui alta resitência. Os autores, relataram que este foi o maior surto de criptosporidiose de origem alimentar reportado a nível mundial, e sugere por parte da vigilância sanitária e epidemiológica, uma melhoria na prevenção da transmissão deste coccídeo para a população.

Uma outra pesquisa utilizando solos de parques na área urbana de Madrid (Espanha), Dado et al. (2012) encontraram *Cryptosporidium* spp. em 6% das amostras analisadas indicando que principalmente crianças podem ser afetadas, pela ingestão acidental de solo contaminado. Enquanto na área rural, provavelmente a principal fonte de transmissão para o solo e água sejam os animais de produção, tais como bovinos, suínos, cabras e ovelhas, nas áreas urbanas os animais de companhia e aves assumem este papel (HONG et al., 2014; KOOMPAPONG et al., 2014).

Uma outra ocorrência relacionada a contaminação ambiental pelo *Cryptosporidium* spp. foi um surto após enchente em agosto de 2013 na Alemanha descrito por Gertler et al. (2015). No início de junho de 2013, inundações extremas do rio Elba, importante para a navegação e distribuição de água para consumo humano transbordou na cidade de Halle (população de 230.000 habitantes). E embora o foco da pesquisa tenha sido o ambiente, durante o período ocorrido, os hospitais revelaram um aumento significativo de casos de diarreia na população da cidade de Halle e a criptosporidiose foi diagnosticada em 73 amostras de cada 100.000 habitantes. A parte inundada atingiu áreas de lazer incluindo playgrounds, lagos, parques, instalações desportivas e uma praia de rio. As áreas poluídas foram fechadas ao público para a limpeza e posteriormente foram reabertas. Esse evento também afetou partes centrais do sistema de tubulação e bombas do esgoto da cidade. Amostras de água foram coletadas nas áreas atingidas, dois meses após as inundações. As análises revelaram que não houve a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no sistema de abastecimento público de água. Porém, oocistos foram encontrados dois meses após o evento, em duas piscinas de banhos públicos. Três meses após a enchente, uma alta concentração de oocistos (592/100 litros) foi detectada em um canal lateral do rio, localizado próximo a uma praia de rio. Esta área era frequentemente utilizada com gramados para banhos de sol e piqueniques. Em sucessivas amostragens durante as semanas seguintes, as concentrações diminuíram, mas permaneceram elevada. Após a confirmação do surto, as autoridades de saúde pública informaram aos cidadãos dos riscos e indicaram a fervura da água recebida nas residências. Este evento demonstrou que mesmo em países com elevados padrões de saneamento, inundações podem causar epidemias de gastroenterite, principalmente quando interferem nos sistemas de esgoto com poluição de águas utilizadas para consumo humano, sendo considerado o maior surto de criptosporidiose na Alemanha (GERTLER et al., 2015).

Eventos com graves inundações tornaram-se comuns nos últimos anos em diversas regiões do mundo. Suas frequências provavelmente irão aumentar tanto nos países europeus como nos demais países, devido às alterações climáticas ocorridas nas últimas décadas, tais inundações demonstraram ser o gatilho para transmissão de doenças transmissíveis pela água (KUNDZEWICZ et al., 2013; DE MAN et al., 2014). Além disso, o aumento de doenças gastrointestinais associadas com esportes aquáticos em água doce tem sido relatados após chuvas fortes (HARDER-LAURIDSEN et al., 2013).

O monitoramento de patógenos em esgoto bruto tem sido realizado em comunidades urbanas em diversas regiões do mundo (FENG et al., 2009). Um grande estudo desenvolvido por Li et al. (2012) coletando 386 amostras de efluentes brutos de esgoto de quatro cidades da China entre 2006 e 2009, apresentou altos índices de *Cryptosporidium* spp., com uma média de 55,65% de positividade. Além disso, foi realizada também a identificação do parasito encontrando *C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. suis*, *C. cuniculus*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. muris* entre outros, e muitos destes sabidamente tendo animais como reservatórios naturais, sendo que as espécies *C. meleagridis* e *C. baileyi* foram encontradas em amostras coletadas nas quatro cidades analisadas. As altas concentrações de aves domésticas como galinhas e pombos na China contribuíram com esta elevada frequência obtida (LI et al., 2012). Em um estudo realizado em pacientes internados em três hospitais em Xangai na China, *C. meleagridis* foi detectado em seis de 28 (21,4%), ratificando a presença constante deste patógeno no ambiente.

A detecção de *Cryptosporidium* spp. continua sendo de grande interesse para a saúde pública e o monitoramento para sua detecção direta é justificado pela constante poluição fecal, principalmente em regiões de baixas condições sanitárias. Alguns métodos tornam-se inviáveis pelo seu alto custo, sendo utilizado na maioria das vezes apenas em países desenvolvidos (MOSS et al., 2014).

Neste sentido, nos últimos anos, a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. na água de consumo vem aumentando em todo o mundo, inclusive no Brasil (FREITAS et al., 2015; REZENDE et al., 2016). Pois a presença deste patógeno na água tornou-se um motivo de preocupação para empresas distribuidoras. No Brasil, de acordo com o Decreto nº 2914/2011 do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), que descreve os procedimentos de qualidade da água para consumo humano e padrões de potabilidade, reitera que as empresas de saneamento devem realizar a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. na água destinada ao consumo humano. Um levantamento feito por Freitas et al. (2015) no rio Beberibe em Pernambuco durante dezesseis meses, coletando amostras mensais da água, revelou que em apenas dois meses não foi detectado oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Em Londrina, Paraná, foi realizada uma pesquisa utilizando o sistema de abastecimento e tratamento de água e esgoto do município. Foi analisada água bruta oriunda de esgoto e também água tratada. Através do diagnóstico molecular, foi possível detectar a presença de *Cryptosporidium parvum* na água de esgoto, enquanto que na água tratada não foi detectado (ALMEIDA et al., 2015), resultados que estão de acordo com outras pesquisas no mundo (XIAO et al., 2013; LEE et al., 2014).

## **2.7. Transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* spp.**

Os animais desempenham um papel relevante na manutenção, amplificação e transmissão de patógenos, funcionando como reservatório para os humanos. E apesar disso, a falta de instrumentos adequados para acompanhar de forma contínua a mobilidade dos animais e seu potencial de transmissão dificultam os estudos a respeito da dinâmica de diversas doenças (PARSONS et al., 2014; HINNEY et al., 2015).

O gênero *Cryptosporidium* spp. parasita uma ampla variedade de hospedeiros e dependendo das espécies/subtipos/genótipos, podem infectar humanos, sendo considerado como zoonose. O uso da biologia molecular para detectar e diferenciar as espécies, genótipos/subtipos (XIAO; RYAN, 2004c; CACCIO, 2005) é essencial para compreender a dinâmica na transmissão para os humanos (XIAO; FENG, 2008; SLAPETA, 2013).

Surtos de criptosporidiose na década de 80 incriminaram bovinos infectados por *Cryptosporidium* spp. Estes animais foram considerados disseminadores ambientais de oocistos, em regiões rurais onde humanos tem contato com alimentos e água contaminadas com fezes contendo o parasito. A infecção possui diferentes rotas de transmissão, podendo ocorrer direta ou indiretamente (GLABERMAN et al., 2002; PREISER et al., 2003; SMITH et al., 2004; CHALMERS et al., 2005; BLACKBURN et al., 2006; KIANG et al., 2006; PAOLETTI et al., 2015).

Fatores estressantes e a idade são situações que influenciam a ocorrência de criptosporidiose em humanos. O uso de animais de companhia e animais de produção, são potenciais disseminadores de oocistos no meio ambiente. Estudos sobre investigação, monitoramento e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em humanos, a fim de identificar possíveis reservatórios deste patógeno vem sendo realizados em diversas regiões do mundo (HELMY et al., 2014; MOUSA et al., 2014; BANISH et al., 2015; DANIELS et al., 2015; HINEY et al., 2015; PAOLETTI et al., 2015).

Os primeiros estudos consideravam apenas *C. parvum* como espécie que infectava humanos. Porém no final da década de 90, técnicas de genotipagem utilizando a análise de DNA do parasito, demonstraram a presença de outras espécies em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) nos EUA, Suíça e Quênia. Outros trabalhos subsequentes demonstraram a presença em humanos de *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. felis* entre outras (XIAO; FENG, 2008; WANG et al., 2014).

A criptosporidiose é geralmente uma doença autolimitada, caracterizada por diarreia aquosa e uma variedade de outros sintomas incluindo cólicas, dor abdominal, perda de peso, náuseas, vômitos, febre e dor de cabeça. Os sintomas podem se tornar graves, ou até mesmo levando risco de vida, em indivíduos imunocomprometidos, sendo a criptosporidiose intestinal crônica uma doença característica de pacientes com SIDA (IQBAL et al., 2015).

Esta doença viral imunossupressora levou a criptosporidiose a um outro patamar nos humanos, pois já no início da epidemia de SIDA no mundo, os casos desta parasitose intestinal estavam aumentando. A ligação com a enfermidade viral era tão intensa que tornou a criptosporidiose, uma das características que definem a síndrome antes da descoberta do vírus causador, pois esta infecção em conjunto, leva a um quadro de diarreia secretora volumosa com grave perda de peso e eletrólitos. A prevalência de criptosporidiose em seres humanos varia entre 1% a 18%, dependendo da área geográfica, sendo sua distribuição maior em regiões com saneamento básico deficiente, períodos de chuvas maiores e áreas com proximidade de animais (TZIPORI; WIDMER, 2008; QI et al., 2011; WANG et al., 2014).

Um grande estudo epidemiológico ocorrido na Austrália foi realizado por Gibney et al. (2010) durante todo o ano de 2010 a fim de analisar as causas de gastroenterite. A população deste país era de aproximadamente 22 milhões de habitantes, sendo computados 16.626.069 casos de gastroenterite aguda. Neste estudo foram pesquisados os principais agentes desta patologia (vírus, bactérias e parasitos), sendo a prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 1,2%, somente a frente da infecção por *Salmonella* que obteve 0,4%. Além disso, os dados demonstraram que 86% dos pacientes apresentavam diarreia branda. De acordo com a ONU, a partir de 2012 a Austrália atingiu a segunda colocação mundial no índice de desenvolvimento humano (IDH) que avalia o nível socio-econômico. Assim, o risco de transmissão da criptosporidiose neste país é bem reduzido, enquanto o IDH do Brasil o coloca na 79ª colocação (JULIAN, 2016).

Algumas espécies de *Cryptosporidium* atingem um ampla faixa de hospedeiros e podem emergir como patógenos importantes nos seres humanos. Este fato ocorre principalmente em condições sócioeconômicas e ambientais propícias que facilitem a sua transmissão. O agente patogênico aviário *C. meleagridis* é reconhecido como importante patógeno humano (XIAO; FENG, 2008). Em Lima no Peru, e Bangkok na Tailândia, *C. meleagridis* é responsável de 10 a 20% dos casos de criptosporidiose humana (XIAO et al., 2001; GATEI et al., 2002; CAMA et al., 2003).

Nos últimos cinco anos, diversas publicações têm sido realizadas, a respeito da detecção de *Cryptosporidium* spp. (Tabela 5) em pacientes sintomáticos, tanto em crianças como em adultos e imunocomprometidos. Na Índia, um estudo com 1400 pacientes com imunidade debilitada foi conduzido e 53 amostras fecais foram positivas (3,8%) para *Cryptosporidium* spp. Na Arábia Saudita um levantamento com fezes de pacientes com diarreia no ano de 2013, a prevalência atingiu 11,6%. Segundo os autores, a alta prevalência desta infecção poderia ser atribuída à escassez de recursos de água potável que é comum nesta região (HAWASH et al., 2014). Durante um surto de diarreia em uma creche na Espanha em 2013, foram analisadas amostras fecais de crianças de até três anos, para vírus, bactérias e parasitos, tendo uma prevalência de 13,3% para *Cryptosporidium* spp. (GOÑI et al., 2015).

Uma pesquisa realizada por Jiang et al. na China em 2014, utilizando 232 amostras fecais de pacientes internados com diarreia em um hospital, revelou uma prevalência de 9,91% para *Cryptosporidium* spp. Porém, notou-se que os casos se concentraram em crianças até cinco anos de idade e em maiores de 50 anos, grupos de risco devido à resposta imunológica deficitária. Outro levantamento realizado na China em uma comunidade rural com 687 indivíduos, 12 % apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. Os autores ressaltaram que este valor significativo estava relacionado aos pacientes HIV positivos analisados na pesquisa (YANG et al., 2017).

No Egito, durante um período de seis meses, 104 pacientes com diarreia atendidos no Hospital Universitário do Cairo, suas fezes foram analisadas e sete (6,7%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. (BANISCH et al., 2015). No Irã foram utilizadas 1685 amostras fecais de pacientes com sintomas gastrointestinais e foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em sete amostras (0,4%). Os autores ressaltaram que este número baixo encontrado provavelmente estava associado ao fato de nenhum paciente era HIV positivo, sendo que as idades não estavam disponíveis (RANJBAR et al., 2016). No Canadá durante um surto de diarreia principalmente em crianças na região de Quebec, 283 amostras fecais foram analisadas com 51 positivas (18%) para oocistos de *Cryptosporidium* spp. Os autores relataram que este foi o primeiro surto de criptosporidiose na área, possivelmente associado a superpopulação e contaminação alimentar (THIVIERGE et al., 2016).

No trabalho desenvolvido na Nigéria, com 394 amostras fecais diarreicas de crianças e pacientes HIV positivos, os autores obtiveram 6,3% de positividade para *Cryptosporidium* spp., associando este número ao quadro de imunossupressão apresentado pelos pacientes analisados (UKWAH et al., 2017).

**Tabela 5.** Publicações de infecções por *Cryptosporidium* spp. em humanos com diarreia, de acordo com os países de estudo (exceto Brasil) e o ano da publicação, nos últimos cinco anos.

Localização do estudo	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. (%)	Referência
Índia	3,8	SHARMA et al., 2013
Espanha	13,3	GOÑI et al., 2014
Arábia Saudita	11,6	HAWASH et al., 2014
China	9,9	JIANG et al., 2014
Egito	6,7	BANISCH et al., 2015
Irã	0,4	RANJBAR et al., 2016
Canadá	18,0	THIVIERGE et al., 2016
China	12,0	YANG et al., 2017
Nigéria	6,3	UKWAH et al., 2017

## 2.8. *Cryptosporidium* spp. no Brasil

### 2.8.1. *Cryptosporidium* spp. em aves no Brasil

Até o momento no Brasil já foram descritos quatorze relatos envolvendo a detecção de *Cryptosporidium* spp. em aves (Tabela 6), porém nenhum em pombos. Apenas em dez destes trabalhos houve a descrição das espécies encontradas. Todos utilizaram a microscopia óptica como triagem para visualização dos oocistos a partir das amostras clínicas.

Das dez descrições, seis foram detectados como *C. baileyi*, a espécie mais prevalente em aves (tanto domésticas quanto selvagens) (GOODWIN, 1989; FAYER, 2010). *C. galli* foi encontrado em cinco trabalhos enquanto *C. meleagridis* apenas em um artigo. Esta descrição torna-se relevante pelo fato de que as amostras que foram positivas eram de frangos (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em mercado popular no município do Rio de Janeiro, colocando em risco a população da região devido à eliminação dos oocistos pelas fezes (HUBER et al., 2007).



**Quadro 2.** Estudos realizados descrevendo a presença de *Cryptosporidium* spp. em aves no Brasil.

Estado	Obtenção das aves	Técnica diagnóstica	Ave	Positivos (%)	Espécie de <i>Cryptosporidium</i>	Referência
RJ	Criatório	Microscopia	Frango	ND	<i>C. baileyi</i>	CARDOZO et al., 2005
SP	Criatório	Microscopia e Biologia molecular	Avestruz	100%	<i>C. baileyi</i>	MEIRELES et al., 2006
RJ	Aviário de Mercado	Microscopia e Biologia molecular	Codorna Pato Frango	100% 100% 100%	<i>C. baileyi</i> <i>C. baileyi</i> <i>C. meleagridis</i>	HUBER et al., 2007
RJ	Criatório	Microscopia	Avestruz	44%	ND	OLIVEIRA et al., 2008
RJ	Aviário de Mercado	Microscopia	Pato Frango Codorna	72,77%	ND	GOMES et al., 2009
RS	Criatório	Microscopia	Coruja	25%	ND	SILVA et al., 2009
GO PR SP	Diversos	Microscopia e Biologia molecular	25 espécies diferentes	4,86%	<i>C. baileyi</i> <i>C. galli</i> <i>C. parvum</i> <i>Cryptosporidium Avian I</i> <i>Cryptosporidium Avian II</i> <i>Cryptosporidium Avian III</i>	NAKAMURA et al., 2009
SP	Criatório	Microscopia e Biologia molecular	Canário Curió Calopsita	ND	<i>C. galli</i> <i>C. galli</i> <i>C. galli</i>	MEIRELES et al., 2010
SP	Criatório	Microscopia e Biologia molecular	Curió Azulão Coleiro	21,9%	<i>C. galli</i>	SILVA et al., 2010
SP	Agencia controle ambiental	Microscopia e Biologia molecular	Diversas espécies (10 ordens)	6,6%	<i>C. galli</i> <i>C. baileyi</i> <i>Cryptosporidium Avian II</i>	SEVÁ et al., 2011
RJ	Aviário de Mercado	Microscopia e Biologia molecular	64 espécies diferentes	6,8%	<i>C. parvum</i> <i>Cryptosporidium Avian III</i>	GOMES et al., 2012
SP MS	Centro de reabilitação	Microscopia	Arara Maitaca Periquito	ND	ND	HOLSBACK et al., 2013
SP	Criatório e Centro de reabilitação	Microscopia e Biologia molecular	Diversas espécies (2 ordens)	10,51%	<i>C. galli</i>	NAKAMURA et al., 2014
MG	Criatório	Microscopia e Biologia molecular	33 espécies diferentes	2,3%	<i>C. baileyi</i> <i>Cryptosporidium Ganso I</i>	CUNHA et al., 2016

ND – Não disponível

### 2.8.2. *Cryptosporidium* spp. em humanos no Brasil

Os estudos sobre a infecção pelo gênero *Cryptosporidium* no Brasil em humanos estão relacionadas principalmente às espécies *C. parvum* e *C. hominis*, que são mais comuns tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (PERALTA et al., 2016).

Geralmente as pesquisas estão relacionadas a pacientes imunocomprometidos, crianças com surtos de diarreia (GATEI et al. 2003; BRANTLEY et al., 2003; GONÇALVES et al., 2006; BUSHEN et al., 2007; ARAUJO et al., 2008; LUCCA et al., 2009; ROLANDO et al., 2012; ASSIS et al., 2013).

Há dois trabalhos, um registrando *C. canis* e *C. felis*, parasitando humanos (LUCCA et al., 2009) e outro com *C. meleagridis* (ARAUJO et al., 2008). A ocorrência do *Cryptosporidium* spp. como uma antropozoonose, ocorre especialmente em áreas com infraestrutura sanitária precária, principalmente pela contaminação de água e alimentos, que se tornam veículos importantes para transmissão humana (ARAUJO et al., 2008; FAYER et al., 2000; ROLANDO et al., 2012; ASSIS et al., 2013).

Na Tabela 7, encontram-se os trabalhos realizados no Brasil, envolvendo *Cryptosporidium* spp. tendo humanos como hospedeiros, além pesquisas com amostras ambientais de água.

**Tabela 6.** Publicações de artigos descrevendo a presença de *Cryptosporidium* spp. em humanos no Brasil.

Estado	Grupo Pesquisado	Técnica utilizada	Quantidade de amostra	Positivos	Espécie de <i>Cryptosporidium</i>	Referência
ND	Crianças	PCR, RFLP	7	1	<i>C. parvum</i>	GATEI et al. 2003
CE	Adultos HIV +	PCR, RFLP	12	5	<i>C. hominis</i>	BRANTLEY et al., 2003
SP	Crianças (surto de gastroenterite)	Microscopia, PCR, sequenciamento	224	29	<i>C. hominis</i>	GONÇALVES et al., 2006
CE	Crianças	Microscopia, PCR, RFLP	157	58	<i>C. hominis</i> (24) <i>C. parvum</i> (18)	BUSHEN et al., 2007
SP	Adultos e crianças HIV+	Microscopia, PCR, RFLP	ND	14	<i>C. parvum</i> (4) <i>C. hominis</i> (8) <i>C. meleagridis</i> (2)	ARAUJO et al., 2008
SP	Adultos HIV+	Microscopia, PCR, sequenciamento	ND	27	<i>C. hominis</i> (17) <i>C. parvum</i> (4) <i>C. felis</i> (5) <i>C. canis</i> (1)	LUCCA et al., 2009
RJ	Adultos e crianças HIV+	Microscopia, PCR	1207	48	<i>C. parvum</i> (5) <i>C. hominis</i> (37)	ROLANDO et al., 2012
MG	Adultos HIV+	Microscopia, PCR, RFLP	59	10	<i>C. parvum</i> (2)	ASSIS et al., 2013
RJ	Adultos HIV+	Microscopia, PCR, RFLP	89	26	<i>C. parvum</i> (5) <i>C. hominis</i> (15)	PERALTA et al., 2016

ND – Não disponível

## 2.9. Diagnóstico laboratorial da Criptosporidiose

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose nas aves se baseia nos exames parasitológico, imunológico e por métodos moleculares (OIE, 2008). Até o momento não possuem técnicas de isolamento do parasito *in vitro*, desta forma, cada uma das técnicas existentes possuem vantagens e desvantagens. As espécies de *Cryptosporidium* são difíceis de serem identificadas pela morfologia dos oocistos com o microscópio óptico, devido sua similaridade (ABE; MAKINO, 2010), porém é uma técnica de baixo custo. Os ensaios

imunológicos, geralmente os imunoenzimáticos são práticos, podendo ser utilizado a campo, porém podem acusar falsos positivos e negativos. Por outro lado, os métodos moleculares são os mais indicados pela alta sensibilidade porém os custos e contaminações podem dificultar sua realização (FAYER, 2008; CHALMERS, 2009).

### 2.9.1. Diagnóstico Parasitológico

A metodologia de diagnóstico geralmente utilizada de triagem é a microscopia, pois permite a identificação da presença de oocistos do protozoário principalmente nas fezes. É uma técnica de procedimento laboratorial de fácil execução e baixo custo, quando comparado a outras metodologias. As amostras de fezes de hospedeiros infectados possuem oocistos de paredes espessas que podem ser visualizados com auxílio de microscópio de campo claro, de contraste de fase, de contraste de interferência diferencial (DIC) e de imunofluorescência. As amostras eliminadas pelo hospedeiro podem ser coletadas e enviadas ao laboratório sem adição de conservantes ou preservados em formalina à 10% ou em solução aquosa de dicromato de potássio a 2,5%. Oocistos mantidos nesse composto, mantêm a infectividade durante vários meses (HUBER, 2007; FAYER, 2008; OIE, 2008).

Os oocistos são ovóides e pequenos quando comparados a outros coccídeos e o examinador deve possuir experiência para poder diferenciar de outros parasitos intestinais (FAYER, 2008; OIE, 2008). Além disso, apenas pelas características morfométricas torna-se impossível diferenciar corretamente as espécies do gênero *Cryptosporidium* (FAYER et al., 2000; HUBER et al., 2004; FAYER, et al., 2007; SMITH, 2007; FAYER, 2010; XIAO, 2010).

Heine (1982) desenvolveu uma técnica microscópica simples, onde o material fecal é finamente espalhado sobre a lâmina de vidro e secadas ao ar, em seguida cobertas com uma gota de óleo de imersão e adicionado lamínula. São analisados por microscópio de contraste de fase (400x), assim oocistos de *Cryptosporidium* spp. aparecem entre 4 a 6 µm com uma refração característica na luz do microscópio óptico (IGNATIUS et al., 2016).

Para otimização do esfregaço recomenda-se técnica de coloração, sendo a de Ziehl-Neelsen a mais utilizada. Com esta técnica, os oocistos apresentam-se corados de vermelho ou róseo, enquanto que outras estruturas fecais se coram de verde ou azul, de acordo com o corante utilizado para contra corar. Este método foi modificado e melhorado durante os anos, e atualmente há vários protocolos de coloração, a frio e à quente, baseados no método original (HUBER et al., 2007). No entanto, além das técnicas de coloração auxiliarem na visualização das formas infectantes, pode haver interpretação errônea quando a carga parasitária estiver baixa, gerando falso negativo, principalmente em hospedeiros assintomáticos. Com isso, o uso de métodos de concentração de oocistos aumentam as chances de detecção. Sendo os métodos mais comumente utilizados, as técnicas de flutuação em solução saturada de açúcar (SHEATER, 1923), a concentração em formol-éter, a flutuação em solução saturada de cloreto de sódio ou sulfato de zinco (HUBER, 2007; SMITH, 2007; FAYER, 2008).

### 2.9.2. Diagnóstico Imunológico

Nos últimos anos, os laboratórios vêm desenvolvendo kits de diagnóstico rápido para vários agentes etiológicos. Demanda menos tempo para a obtenção do diagnóstico e ao contrário do que ocorre na microscopia, não necessita de pessoal treinado para utilizá-lo (SMITH, 2007). Apesar disso, as metodologias baseadas em anticorpos podem apresentar problemas devido à reação cruzada com outros microrganismos, ou haver interferência por

substâncias inibitórias presentes nas fezes (FAYER et al., 2000). Devido a sua rapidez e alta sensibilidade, essa metodologia vem sendo introduzida em alguns laboratórios, principalmente aqueles com um grande volume de análises, como um novo diagnóstico de rotina (FAYER, 2008; CHALMERS, 2009).

Três principais metodologias para a detecção imunológica de antígenos de *Cryptosporidium* spp. são úteis, com uma variedade de kits comerciais disponíveis, cada um com níveis similares de sensibilidade. A imunofluorescência com anticorpos monoclonais (MAbs), que são anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína anti-*Cryptosporidium* spp. que reconhece a superfície exposta epítomos dos oocistos (FITC-C-MAbs) são os mais específicos (OIE, 2008).

Os kits comerciais de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), são ferramentas de grande utilidade no diagnóstico da criptosporidiose, pois os antígenos do parasito podem ser detectados em suspensão fecal que contenha ou não as formas infectantes (OIE, 2008). São reações em que antígenos são capturados por uma mistura de anticorpos monoclonais e policlonais, e no caso do ELISA sanduíche, anticorpos anti-*Cryptosporidium* spp. conjugado com uma enzima (peroxidase) reage com o substrato, o cromógeno. Estes kits comerciais contêm normalmente todos os reagentes necessários para realizar a análise. E as instruções do fabricante devem ser seguidas, sendo que estes devem ser armazenados a 4 °C quando não estiverem em uso. Todos os reagentes devem atingir a temperatura ambiente antes de serem utilizados (OIE, 2008).

O terceiro tipo de teste imunológico é pela detecção de antígenos do *Cryptosporidium* spp. por imunocromatografia (IC). Este teste é uma reação mais rápida, ocorrendo o resultado em poucos minutos. As reações positivas são qualitativas e vistas como uma banda de cor, normalmente identificada por uma linha no dispositivo. IC é um método alternativo conveniente para detectar antígenos deste parasito em amostras de fezes com especificidade elevada (entre 98 a 100%) (OIE, 2008).

### 2.9.3. Diagnóstico Molecular

As técnicas utilizando a biologia molecular se tornaram uma realidade nas últimas décadas, com grandes avanços e na redução de forma gradativa dos custos para sua realização. Para a detecção de *Cryptosporidium* spp. se mostram bastante eficazes não apenas para o simples diagnóstico de amostras suspeitas, mas para caracterizar espécies, genótipos e subtipos, proporcionando avanços na compreensão da biologia, evolução e epidemiologia deste agente (OIE, 2008; XIAO, 2010; CHECKLEY et al., 2015). Para a sua realização inicialmente deve-se obter o material genético do parasito, e este foi um dos primeiros desafios para o estudo do *Cryptosporidium* spp., pelo fato de seus oocistos possuírem parede extremamente espessa não se rompendo com facilidade. Portanto as técnicas de extração de DNA deste protozoário incluem sempre um passo de rompimento dos oocistos, seja por meios físicos, mecânicos, enzimáticos ou ainda a combinação destes (SCORZA et al., 2003; HUBER, 2007).

Em 1991, Mark Laxer foi o primeiro a aplicar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (LAXER et al., 1991). E desde então a técnica vem sendo aperfeiçoada com a redução de gastos e otimização das reações. Um dos grandes problemas na técnica de PCR é a presença de inibidores que podem estar presentes, principalmente quando se utilizam fezes (contendo sais biliares, bilirrubina e polissacarídeos complexos). Diminuem sua sensibilidade em até 1000 vezes para detecção do seu DNA (WARD; WANG, 2001). Para reduzir a ação destas substâncias, são previamente

utilizadas técnicas de concentração e purificação dos oocistos, aumentando assim a sensibilidade das reações (TZIPORI; WIDMER, 2008).

Boom et al. (1990) propuseram a purificação do DNA utilizando suspensão de sílica, que se baseia na adsorção seletiva dos ácidos nucleicos às partículas da sílica. Desta forma possibilitando procedimentos de lavagem do complexo sílica-DNA para a remoção de proteínas e inibidores indesejáveis. Atualmente são utilizados kits de extração de DNA, que utilizam colunas de centrifugação (*spin columns*). Neste caso utilizam uma resina com microporos que permite que as moléculas grandes (como ácidos nucleicos) sejam eluídas primeiro, enquanto moléculas menores (proteínas e inibidores) ficam retidas. Para sua realização, segue-se um protocolo de execução indicado pelo fabricante, no qual os reagentes são incubados com a suspensão fecal com temperaturas e tempos variados, e ao final a amostra é ressuspensa em 100µL de tampão AE (FAYER et al., 2010).

Com o DNA extraído deve-se realizar a PCR, diversos genes alvos são utilizados para caracterizar genotipicamente as espécies pertencentes ao gênero *Cryptosporidium*, dentre eles o 18S (RNA ribossomal), *COWP* (proteína da parede do oocisto), *HSP70* (proteína de choque térmico de 70kDa), o gene codificante da glicoproteína 60kDa (GP60), e o gene que codifica a Actina (XIAO; RYAN, 2007). A ampla utilização do gene 18S para a genotipagem do gênero *Cryptosporidium* se deve a sua natureza de cópia- múltipla, além da presença de regiões semi-conservadas e hipervariáveis que facilita o desenho de iniciadores específicos para o gênero (XIAO, 2010). A determinação de subgenótipos, envolvendo a pesquisa de variação dentro de uma determinada espécie ou genótipo requer o uso de *loci* mais variáveis como o gene hipervariável da glicoproteína 60-kDa (GP60) e o uso de microsatelites (FERGUSON et al., 2006).

Além dos procedimentos da PCR e Nested-PCR, para a identificação das espécies, genótipos e subtipos, torna-se necessária a realização de procedimentos complementares, tais como a digestão por enzimas ou o sequenciamento da amostra positiva (HUBER, 2007; OIE, 2008).

A técnica do Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição – RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorfism*) é um dos métodos mais empregados para a determinação de espécies e genótipos de *Cryptosporidium*. A técnica se baseia na digestão dos produtos da PCR por enzimas específicas, denominadas enzimas de restrição ou endonucleases. Estas enzimas clivam o DNA em fragmentos de determinados tamanhos, cuja análise no gel de agarose, resulta em diferentes padrões de tamanhos de fragmentos. Assim, de acordo com a espécie de *Cryptosporidium* examinada, possibilita sua identificação. Apesar de ser uma técnica relativamente simples, sua aplicação é limitada por pequenas falhas e por não diferenciar subgenótipos contidos em uma mesma espécie ou de genótipos de diferentes regiões geográficas, além disso a técnica também não é capaz de detectar infecções mistas (WIDMER et al., 2002). Diversos grupos trabalham para estabelecer protocolos de RFLP que possam ser utilizados no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em exames fecais ou amostras de água, podendo ainda ser utilizados em grande quantidade de amostras (HUBER, 2007).

O sequenciamento de DNA das amostras que foram submetidas as técnicas de PCR e Nested-PCR, é de fundamental importância, para realizar a genotipagem e subtipagem das amostras de *Cryptosporidium* spp. Para este procedimento deve-se inicialmente realizar a quantificação do material genético obtido, geralmente utiliza-se espectrofotômetro (*Nanodrop*), em seguida os produtos são purificados e submetidos a uma nova reação de PCR com os mesmos primers usados na Nested-PCR. Estas sequências são analisadas por programas como o software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) e a plataforma BLAST. Posteriormente as sequências são comparadas com aquelas já depositadas no GenBank, para preparo das árvores filogenéticas sendo possível verificar a similaridade entre as amostras obtidas (NAKAMURA, 2015).

Uma outra opção é a técnica da PCR em Tempo Real (*Real time PCR=qPCR*), que foi desenvolvida no início dos anos 90 e permite que a amplificação da PCR seja monitorada em tempo real. A vantagem principal desta técnica sobre a PCR convencional é que ela permite a análise dos produtos, não sendo necessária a manipulação após sua amplificação (GASSER, 2006). Além disso, esta técnica permite diferenciar as espécies testadas, sem o uso adicional de RFLP ou sequenciamento, que diminui o tempo necessário para o processamento das amostras (RAMIREZ, et al., 2006). Por outro lado, a dificuldade no uso da PCR de Tempo Real é que produtos de amplificação inespecífica não são diferenciados dos produtos de amplificação desejados, além do seu custo ser maior (ZARLENGA; HIGGINS, 2001).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

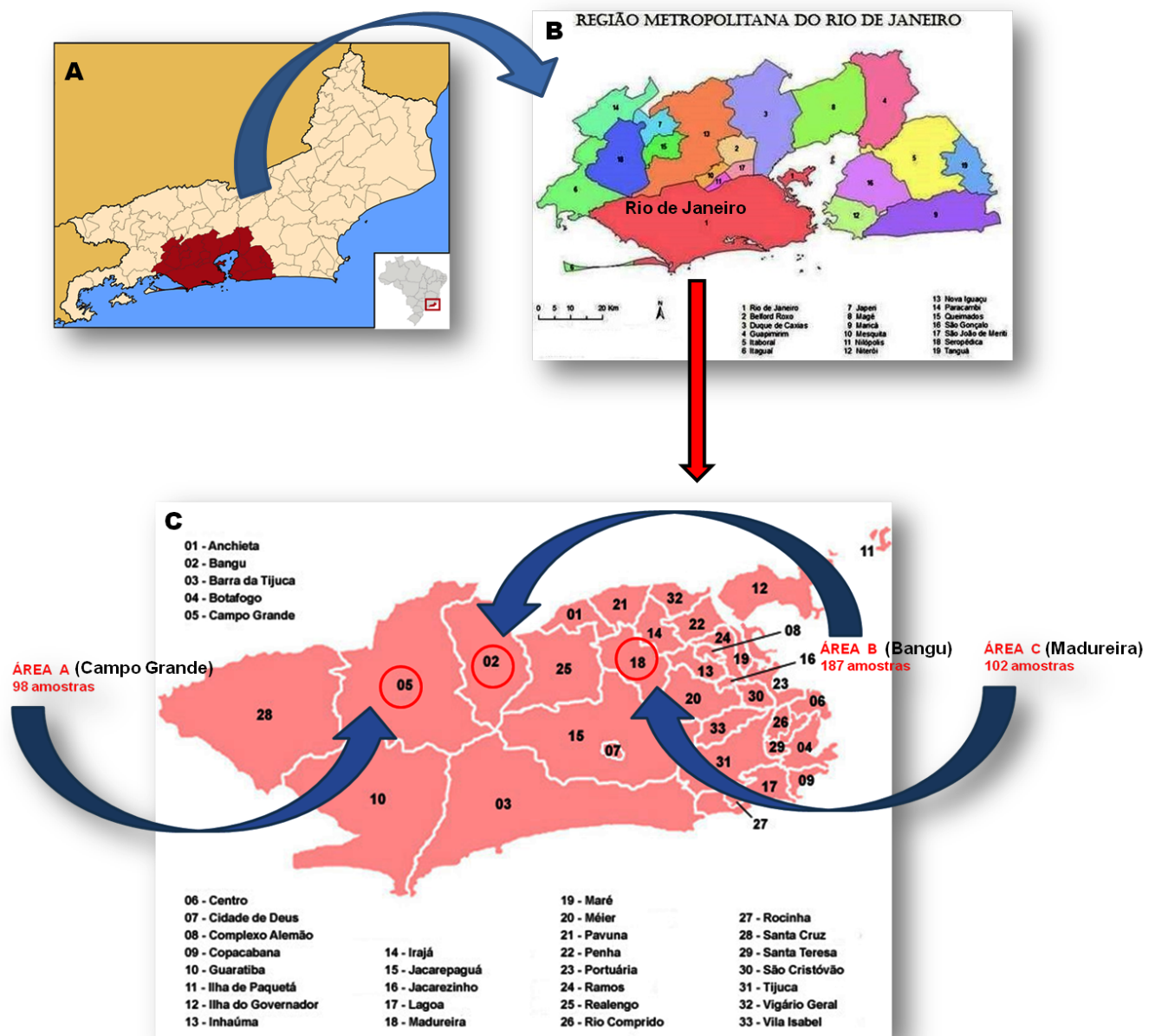
#### 3.1. Obtenção das amostras fecais de pombos e procedimentos de coleta

As amostras fecais dos pombos (*Columba livia*) foram obtidas em três regiões administrativas localizadas no município do Rio de Janeiro. As regiões de coleta foram denominadas de áreas A, B e C. A área A corresponde a localidade de Campo Grande, que totalizou 98 amostras fecais, a área B correspondeu a localidade de Bangu com 187 amostras fecais e a área C correspondeu a área de Madureira com 102 amostras fecais. Na figura 2, estão representadas as imagens da localização das áreas de coleta das amostras fecais provenientes de pombos, localizadas no município do Rio de Janeiro.

Nas Áreas A e C, as coletas das amostras fecais dos pombos foram realizadas no interior e no entorno de domicílios onde pombos eram constantemente visualizados. Nestes locais geralmente haviam animais domésticos de companhia, como cães (*Canis lupus familiaris*) e gatos (*Felis catus*) e alguns animais de produção como galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e suínos (*Sus scrofa domesticus*) criados para subsistências. As coletas foram únicas, e não houve repetição nos mesmos locais de coletas. Para coleta, foram utilizadas armadilhas rústicas para captura das aves, estas eram arejadas e no seu interior eram disponibilizados água e alimentos à vontade. O fundo das armadilhas era aramado que permitiam que as fezes passassem sem que houvesse o pisoteio do animal. As fezes eram retidas em um plástico que foi colocado no seu fundo. Após a observação de fezes depositadas no plástico, as aves eram soltas com todo o cuidado, no mesmo ambiente de captura. O máximo de tempo que a ave permanecia nas armadilhas era de aproximadamente 10 minutos. Após este procedimento, o plástico era recolhido e cada amostra fecal era colocada em recipientes de plástico com tampa rosqueada, identificado e acondicionado em isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório para processamento.

Já, na área B, as amostras fecais foram coletadas em um ambiente que servia de comercialização de pombos para várias finalidades, neste local só havia esta espécie de ave. No local, o proprietário adquiria as aves através de captura das mesmas na região, no seu domicílio e no entorno, para a captura eram utilizadas armadilhas rústicas. Após a captura, as aves eram mantidas no domicílio até a sua comercialização. Para a coleta das amostras fecais das aves neste local, o proprietário colocava a ave em gaiolas, com o fundo aramado, onde as fezes passavam para um plástico no fundo das mesmas.

Após as aves defecarem, os plásticos eram recolhidos com as amostras e acondicionados em tubos em ambiente refrigerado para envio ao laboratório.



**Figura 2.** Imagens da localização das áreas de coleta das amostras fecais provenientes de pombos (*Columba livia*): A- Mapa do Brasil com a localização do estado do Rio de Janeiro, assinalando a região metropolitana do Rio de Janeiro; B- Região Metropolitana do Rio de Janeiro com os seus municípios (<http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-regiao-metropolitana-do-rio-de-janeiro/>); C - Município do Rio de Janeiro subdividido em regiões administrativas (<http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-regiao-metropolitana-do-rio-de-janeiro/>), assinalando as áreas de coletas (Áreas A, B e C), com os respectivos números totais de amostras.

### 3.2. Processamento das amostras fecais de pombos e Diagnóstico Microscópico

O processamento das amostras fecais coletadas e o diagnóstico microscópico de *Cryptosporidium* spp. foram realizados no Laboratório de Protozoologia, localizado no



Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), seguindo a metodologia descrita por Huber et al., 2007.

As amostras foram identificadas, homogeneizadas com água destilada e filtradas com o auxílio de um tamis plástico descartável revestido com gaze para a retirada de resíduos grosseiros. Após a filtração a solução foi distribuída em tubos cônicos de 15 mL e centrifugada durante 10 minutos a 402,4 xg. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado restando apenas o sedimento.

Um tubo de cada amostra foi selecionado e homogeneizado novamente com solução saturada de açúcar (densidade específica de 1,30 g/mL) ao passo que o restante dos tubos foi armazenado sob refrigeração a uma temperatura aproximada de 4°C. Após a homogeneização com a solução saturada de açúcar, o material passou por uma nova centrifugação durante 10 minutos a 402,4 xg.

Posteriormente, a segunda centrifugação dos tubos referentes a cada amostra, foram completados com solução saturada de açúcar até formar um menisco na superfície. Estes foram cobertos com uma lamínula de vidro que após um período de cinco minutos, a lamínula foi retirada da superfície do tubo e colocada sobre uma lâmina de vidro para a realização do diagnóstico microscópico. As amostras foram consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. pela observação de oocistos na microscopia óptica de campo claro e contraste de fase.

Nas amostras diagnosticadas positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., do sedimento fecal acondicionado no tubo de 15 ml preservado sob refrigeração, foi realizada a extração de DNA e as análises subsequentes.

### 3.3. Extração de DNA

Os procedimentos de extração de DNA genômico, a PCR e Nested-PCR foram realizados no laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental W. O. Neitz do Departamento de Parasitologia Animal, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Para todas aquelas amostras que foram positivas para *Cryptosporidium* spp. na microscopia, foi realizada a extração de DNA, sendo utilizado o kit comercial da Qiagen ('QIAamp DNA Stool Mini Kit') (COKLIN et al., 2009; DAS et al., 2011), seguindo as recomendações especificadas pelo fabricante, com pequenas modificações.

Os dois períodos de incubação do material foram realizadas a uma temperatura de 95°C, com uma incubação 10 minutos, utilizando um agitador com controle de temperatura, a uma rotação de 1000 rpm para auxiliar na homogeneização das amostras. Ao final da extração, as amostras foram eluídas em 100 µL de tampão AE (fornecido pelo fabricante) ao invés de 200 µL como sugeria o manual de instruções (FAYER et al., 2010).

### 3.4. Técnicas de PCR e Nested-PCR para o gene alvo 18S

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em duas etapas. Na primeira reação de PCR tendo como gene alvo o 18S, utilizando os 'primers' 18SF: 5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' ('forward') e 18SR: 5'- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3' ('reverse'), obtendo-se 'amplicons' com aproximadamente 1.325 pb (XIAO et al., 1999a; FAYER et al., 2010).

Para a segunda etapa, Nested-PCR, que teve o mesmo gene como alvo, desta vez utilizando os 'primers' 18SNF: 5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'

(‘forward’) e 18SNR: 5’- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3’ (‘reverse’), obtendo-se ‘amplicons’ entre 826 a 864 pb, dependendo da espécie de *Cryptosporidium* e/ou genótipos diagnosticados (XIAO et al., 1999a; FAYER et al., 2010).

Como controle positivo para *Cryptosporidium* foi utilizado uma amostra de *Cryptosporidium parvum*, tendo como número de acesso no Genbank - DQ885333. Já para o branco da reação, foi utilizado água ultrapura.

Na realização das reações da PCR primária, foram utilizados 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2 μM de cada ‘primer’ (18SF e 18SR – Invitrogen), Tampão Taq 1X (Invitrogen), 200 μM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1,0 U ‘Platinum Taq Polymerase’ (Invitrogen), 2 μL de DNA da amostra e água ultrapura (‘Nuclease-free water’ – Promega) até completar o volume final de 25 μL.

Para a Nested-PCR foram utilizadas as mesmas condições da PCR primária, exceto pela diminuição da concentração de MgCl<sub>2</sub> que passou a ser 2 mM e a utilização de 0,2 μM do ‘primer’ 18SNF e 0,2 μM do ‘primer’ 18SNR, com 1 μL de DNA da amostra obtidas da reação da PCR e água ultrapura (‘Nuclease-free water’ – Promega) até completar o volume final de 25 μL.

As condições da termociclagem utilizadas das duas reações PCR-Nested tiveram como ponto de partida a temperatura de 94°C por três minutos (‘hot start’), seguida de um total de 35 ciclos onde ocorreu a desnaturação do DNA a 94°C por 45 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos na temperatura que foi de 58°C (PCR primária) e 59°C (PCR secundária) por 45 segundos e a extensão da cadeia de DNA a 72°C por um minuto. Ao final dos 35 ciclos foi realizada uma etapa de extensão a 72°C por sete minutos.

Após a execução de todos os ciclos, os microtubos contendo 25 μL de cada amostra foram retirados do termociclador e 10 μL do material visualizado através da eletroforese em gel de agarose a 2 % (100V por 60 minutos), corado com brometo de etídio (5μg/mL). O tampão de amostra utilizado foi ‘loading buffer’ 6X – tipo III (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) usando o marcador de peso molecular ‘1Kb Plus DNA Ladder’ (Invitrogen).

### 3.5. Purificação dos produtos da Nested-PCR e sequenciamento

Todas as amostras obtidas através na Nested-PCR foram purificadas utilizando ExoSAP-IT® (USB Corporação; Cleveland, OH), seguindo as recomendações do fabricante.

Após a purificação e quantificação, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento no "Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - USP". Os primers utilizados no sequenciamento foram os mesmos listados anteriormente, para a etapa de Nested-PCR, cada amostra foi sequenciada uma vez no sentido ‘forward’ e uma no sentido ‘reverse’.

### 3.6. Análise das sequências

A análise dos cromatogramas e edição das sequências foram realizadas utilizando-se o programa Bioedit versão 7.1 (HALL, 1999). O alinhamento das sequências foi feito através do algoritmo software ClustalW (LARKIN et al., 2007).

Na plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi realizada uma busca de sequências obtidas através do sequenciamento dos espécimes utilizando o gene 18S para determinar suas identidades.

As sequências do presente estudo foram depositadas no Genbank, utilizando-se a plataforma BankIt, disponibilizado pelo banco de dados.

As sequências registradas no 'Genbank' utilizadas como parâmetro de comparação com as sequências consenso obtidas no presente estudo estão descritas no quadro 3.

### **3.7. Análises filogenéticas**

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o 'software' MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Para verificar a topologia das árvores foi realizado 'bootstrap' com 1000 réplicas, das quais foram construídas a árvore consenso pelo método 'Neighbor-Joining', utilizando-se o algoritmo Kimura 2, para o gene alvo 18S. Durante a construção da árvore consenso através do método 'Neighbor-Joining' foi efetuada a deleção completa dos 'gaps'.

**Quadro 3.** Sequências utilizadas para o gene alvo 18S, que foram comparadas com as obtidas no estudo para a construção da árvore filogenética.

ESPÉCIES e GENÓTIPOS	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUENCIA NO GenBank	AUTOR	LOCAL	HOSPEDEIRO ORIGINÁRIO
Avian genotype I	<b>GQ227479</b>	Nakamura et al., 2009	Brasil	Canário ( <i>Serinus canaria</i> )
Avian genotype II	<b>JX548292</b>	Wang, et al., 2014	China	Galinhas ( <i>Gallus gallus</i> )
Avian genotype III	<b>HM116385</b>	Qi et al., 2011	China	black-billed magpie ( <i>Pica pica</i> )
	<b>KF994570</b>	Prystajacky et al., 2014	Canadá	Amostra ambiental (águas superficiais)
Avian genotype V	<b>HM116381</b>	Qi, et al., 2011	China	Calopsita ( <i>Nymphicus hollandicus</i> )
Avian genotype V	<b>KJ487974</b>	Nakamura et al., 2014	Brasil	Papagaio verdadeiro ( <i>Amazona aestiva</i> )
Duck genotype	<b>AY504514</b>	Zhou et al., 2004	USA	Ganso do Canadá ( <i>Branta canadensis</i> )
Goose genotype I	<b>AY120912</b>	Xiao et al., 2002	USA	Ganso do Canadá ( <i>Branta canadensis</i> )
Goose genotype II	<b>AY504515</b>	Zhou, et al., 2004	USA	Ganso do Canadá ( <i>Branta canadensis</i> )
<i>C. andersoni</i>	<b>AB089285</b>	Koyama et al., 2005	Japão	Bovinos ( <i>Bos taurus</i> )
<i>C. baileyi</i>	<b>EU814429</b>	Wang et al., 2010	China	Patos ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
	<b>GU377276</b>	Wang et al., 2011	China	Avestruz ( <i>Struthio camelus</i> )
	<b>HM116378</b>	Qi et al., 2011	China	Mandarim ( <i>Taeniopygia guttata</i> )
	<b>HM116380</b>	Qi et al., 2011	China	black-billed magpie ( <i>Pica pica</i> )
	<b>JX548296</b>	Wang et al., 2014	China	Galinhas ( <i>Gallus gallus</i> )
	<b>AY954882</b>	Li et al., 2015	China	Pombos ( <i>Columba livia</i> )
<i>C. canis</i>	<b>AF112576</b>	Xiao et al., 1999b	USA	Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )
<i>C. felis</i>	<b>AF112575</b>	Xiao et al., 1999b	USA	Gato ( <i>Felis catus domesticus</i> )
<i>C. galli</i>	<b>GU734646</b>	Silva et al., 2010	Brasil	Rusty-collared seedeater ( <i>Sporophila collaris</i> )
	<b>GU734647</b>	Silva et al., 2010	Brasil	Azulão ( <i>Cyanocompsa brissonii</i> )
	<b>HM116387</b>	Qi, et al., 2011	China	Silver-eared Liocichla ( <i>Leiothrix argentauris</i> )
	<b>HM116388</b>	Qi, et al., 2011	China	Bombycilla garrulus (Syn. <i>Bohemian waxwing</i> )

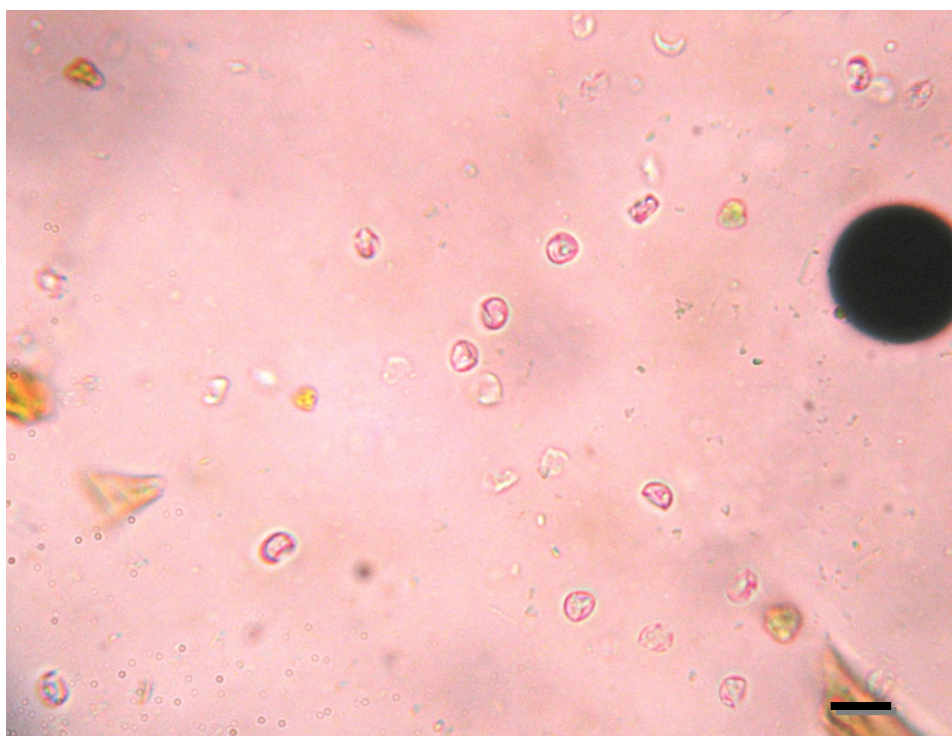
**Quadro 3.** Sequências utilizadas para o gene alvo 18S, registradas no ‘Genbank’, e que foram comparadas com as obtidos no estudo para a construção da árvore filogenética (Continuação).

<i>C. meleagridis</i>	<b>AF180339</b>	Wang et al., 2010	China	Pombo ( <i>Columba livia</i> )
	<b>KP730310</b>	Vermeulen et al., 2015	Australia	Cangurus ( <i>Petrogale penicillata</i> )
	<b>JQ217141</b>	Wang et al., 2012	China	Codornas ( <i>Coturnix coturnix japonica</i> )
	<b>JX548298</b>	Wang et al., 2014	China	Pintos ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )
	<b>EU814439</b>	Morgan et al., 2000	Austrália	Periquito de colar ( <i>Psittacula krameri</i> )
	<b>AJ493549</b>	Gatei et al., 2003	Quênia	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )
<i>C. muris</i>	<b>AY642591</b>	Hikosaka; Naka, 2005	Japão	Rato de campo japonês ( <i>Apodemus speciosus</i> )
<i>C. parvum</i>	<b>L25642</b>	Kilani; Wenman, 1994	Canada	Bovino ( <i>Bos taurus</i> )
<i>C. suis</i>	<b>AF108861</b>	Morgan et al., 1999	Australia	Suíno ( <i>Sus scrofa</i> )
<i>C. serpentis</i>	<b>AF151376</b>	Kimbell et al., 1999	USA	Cobra do milho ( <i>Elaphe guttata guttata</i> )

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Diagnóstico Microscópico e ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em fezes de pombos (*Columba livia*)

Neste estudo, de um total de 387 amostras fecais de pombos, após a realização do diagnóstico microscópico utilizando a técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar, foi possível a observação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (figura 3) em 81 (20,57%) amostras analisadas. Nas amostras positivas para *Cryptosporidium* sp. foi encontrado número variável de oocistos por campo de observação microscópica por lâmina ( $< 5 \leq 30$ ) analisada. Na tabela 7, encontra-se o número total de amostras de fezes por área de coleta e número de amostras positivas e seus respectivos percentuais.



**Figura 3.** Oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados na microscopia óptica após a utilização da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar, provenientes de amostras fecais de pombos (*Columba livia*) provenientes de três locais do Município do Rio de Janeiro (— = 10  $\mu$ m).

**Tabela 7.** Resultado do exame parasitológico amostras de fezes de pombos (*Columba livia*) de acordo com a localidade da coleta, para *Cryptosporidium* spp.

ÁREA	REGIÃO	NÚMERO DE AMOSTRAS FECAIS	NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS
A	Campo Grande	98	28 (28,82%)
B	Bangu	187	43 (22,99%)
C	Madureira	102	10 (9,80 %)
TOTAL		387	81 (20,93%)

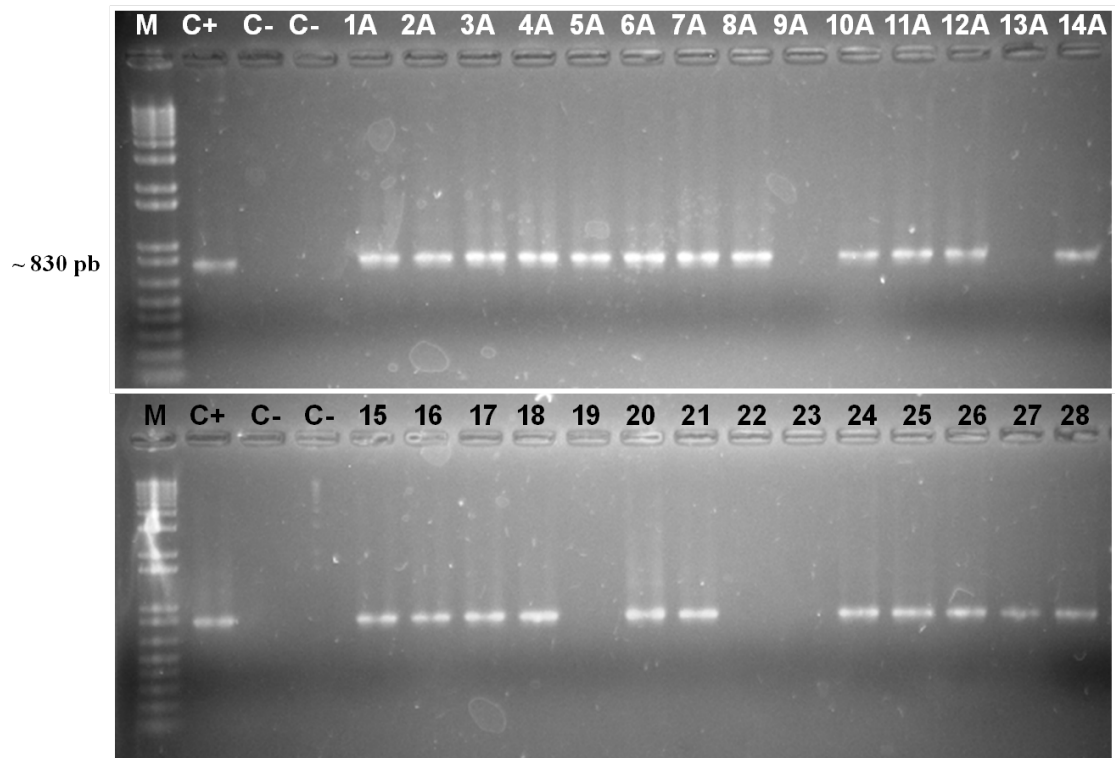
#### 4.2. Diagnóstico Molecular: PCR e Nested-PCR para 18S

Nas 81 amostras fecais dos pombos que foram diagnosticadas positivas para *Cryptosporidium* spp. pela visualização de oocisto na microscopia, foram submetidas ao diagnóstico molecular. Destas, 53 amostras amplificaram DNA específico para *Cryptosporidium* spp. na reação da Nested-PCR (Tabela 8).

**Tabela 8.** Resultado das amostras de fezes de pombos (*Columba livia*) que foram positivas no diagnóstico parasitológico de fezes para *Cryptosporidium* spp., e submetidas na técnica de PCR e Nested-PCR de acordo com a região do estudo.

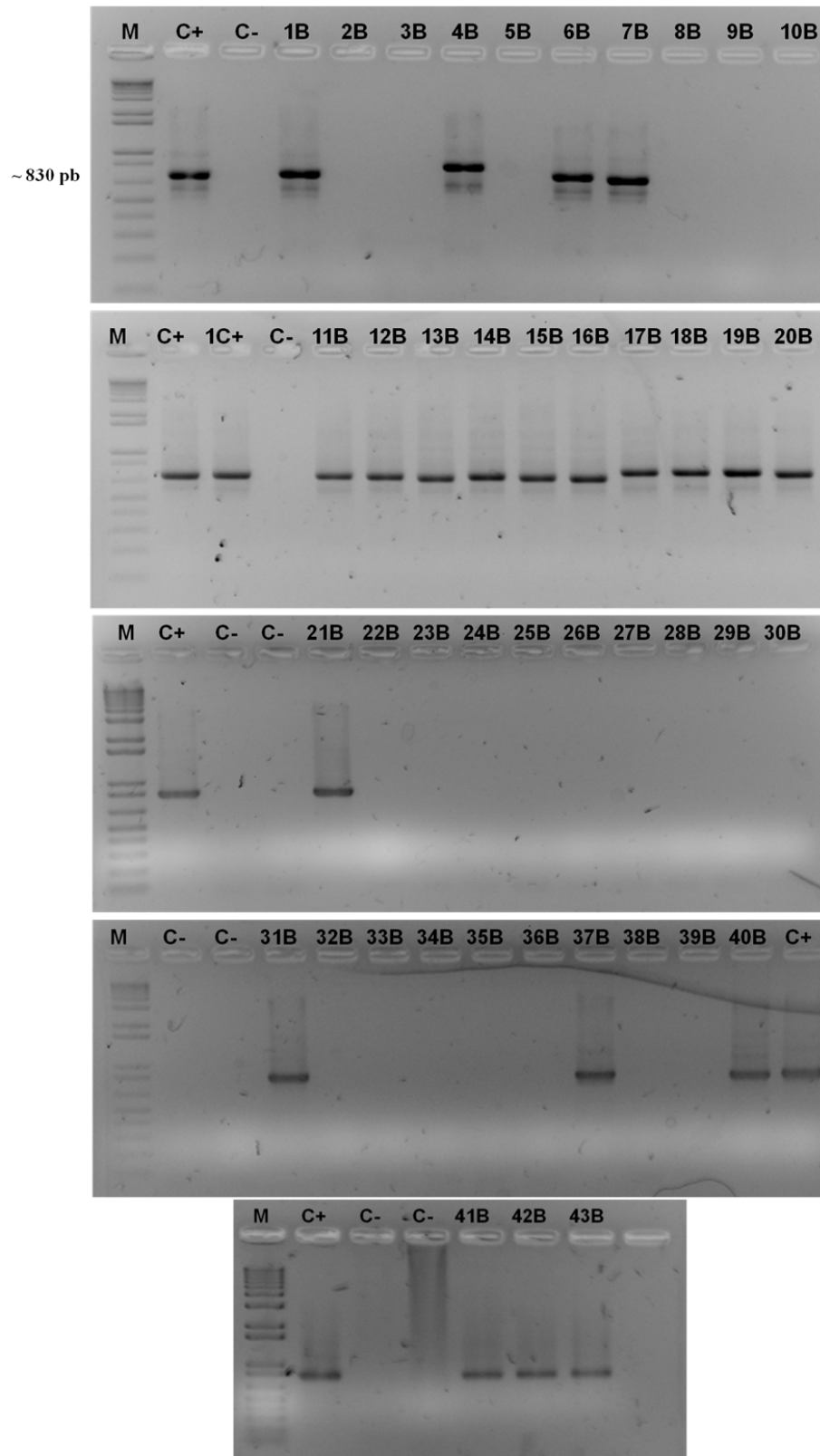
ÁREA	REGIÃO	AMOSTRAS POSITIVAS NA MICROSCOPIA	AMOSTRAS POSITIVAS NA Nested-PCR
A	Campo Grande	28	23 (82,14%)
B	Bangu	43	21(48,83%)
C	Madureira	10	9 (90%)
TOTAL		81	53 (65,43%)

Em nenhuma das reações da PCR obtidas das amostras das aves positivas na microscopia, foram observados resultados visualizáveis em géis de agarose, porém confirmando que houve a reação primária, isto porque no controle positivo foi visualizado banda de aproximadamente 1.350 pares de bases (pb). Nas reações da Nested-PCR foram observados amplicons com aproximadamente 830 pb (figuras 4, 5, 6), confirmando que a região do gene alvo de *Cryptosporidium* spp foi amplificada.

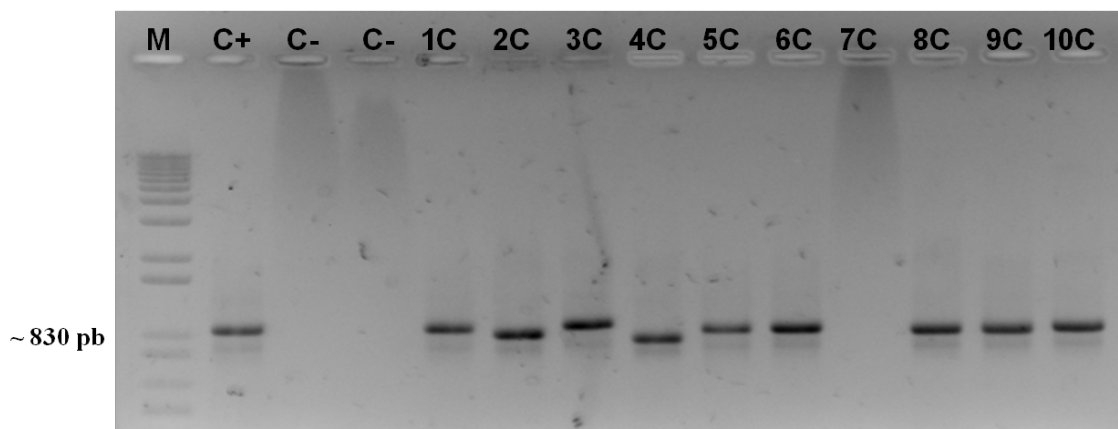


**Figura 4.** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 2 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* spp. provenientes da região A. M = marcador de peso molecular (1Kb plus), C+ = controle positivo bovino e C - = branco da reação.





**Figura 5.** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 2 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* spp. provenientes da região B. = marcador de peso molecular (1Kb plus), C+ = controle positivo bovino e C - = branco da reação.



**Figura 6.** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 2 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* spp. provenientes da região C. M = marcador de peso molecular (1Kb plus), C+ = controle positivo bovino e C - = branco da reação.

### 4.3 Análise das Sequências e Filogenia

Das amostras que amplificaram na Nested-PCR para o gene alvo 18S, todas foram encaminhadas para o sequenciamento. Desta forma, das 53 amostras que amplificaram, 48 amostras apresentaram sequências de boa qualidade. Destas, 23 amostras da área A, 20 apresentaram sequências de boa qualidade; na área B as 21 amostras que amplificaram todas apresentaram sequências de boa qualidade e na área C das nove amostras que amplificaram, sete apresentaram sequências de boa qualidade. Nos quadros 4, 5 e 6, encontram-se o tamanho das sequências obtidas após análise da qualidade dos cromatogramas, das três áreas estudadas (A, B e C).

As sequências obtidas neste estudo, foram alinhadas, de acordo com as áreas de coletas das amostras (A, B e C) e estão representadas nas figuras 7, 8 (A); 9,10 (B); 11 (C) e observou-se que a maioria das amostras mostraram-se idênticas entre si.

Na plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi realizada uma busca de sequências obtidas através do sequenciamento dos espécimes utilizando o gene 18S para determinar suas identidades com espécies previamente depositadas no 'GenBank'. Os fragmentos das sequências obtidas dos isolados de *Cryptosporidium* das amostras desse estudo, comparando-se com as sequências depositadas no GenBank e suas identidades, permitiu classificá-las como duas espécies. Desta forma, as áreas A e B, duas espécies foram identificadas parasitando pombos, sendo estas *C. meleagridis* e *C. baileyi* e na área C apenas espécie *C. meleagridis*. Na tabela 9, encontram os percentuais de cada espécie diagnosticada neste trabalho, de acordo com as áreas do estudo.

**Quadro 4.** Tamanho das sequências obtidas de *Cryptosporidium* após análise da qualidade dos cromatogramas das amostras de pombos (*Columba livia*), referente à área A de acordo com aquelas amostras que amplificaram DNA.

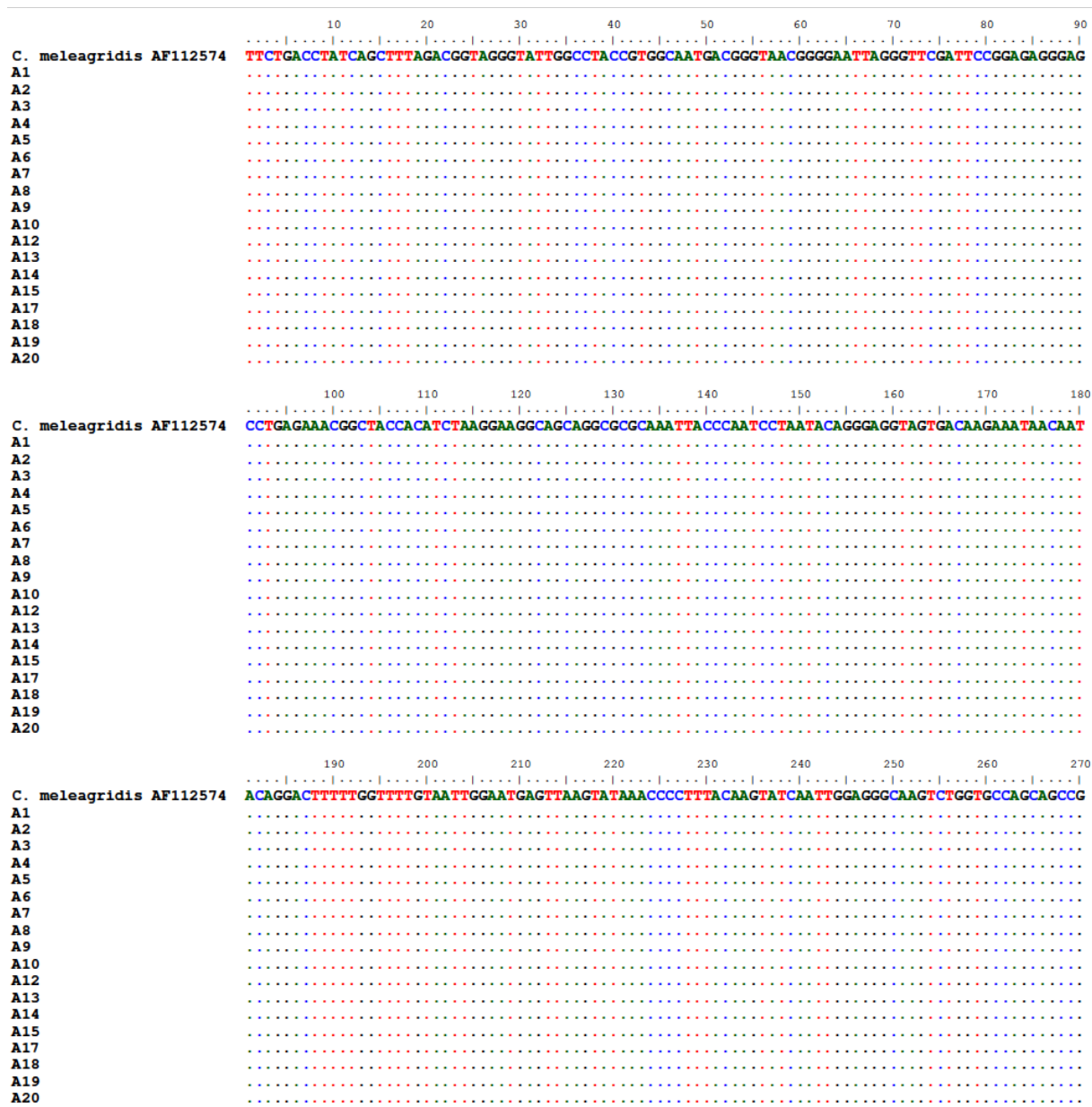
<b>NOME DAS SEQUENCIAS</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS QUE AMPLIFICARAM</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DA SEQUENCIA</b>	<b>TAMANHO DO FRAGMENTO</b>
A1	2	TCB3 (F) e TCB4 (R)	739pb
A2	3	TCB5 (F) e TCB6 (R)	713pb
A3	4	TCB 7 (F) e TCB8 (R)	731pb
A4	5	TCB9 (F) e TCB10 (R)	728pb
A5	6	TCB11 (F) e TCB12 (R)	737pb
A6	7	TCB13 (F) e TCB14 (R)	746pb
A7	8	TCB15 (F) e TCB16 (R)	757pb
A8	11	TCB11 (F) e TCB12 (R)	728pb
A9	12	TCB13 (F) e TCB14 (R)	728pb
A10	15	TCB15 (F) e TCB16 (R)	728pb
A11	16	TCB17 (F) e TCB18 (R)	734pb
A12	17	TCB19 (F) e TCB20 (R)	747pb
A13	18	TCB21 (F) e TCB22 (R)	724pb
A14	19	TCB23 (F) e TCB24 (R)	739pb
A15	20	TCB25 (F) e TCB26 (R)	739pb
A16	25	TCB1 (F) e TCB2 (R)	725pb
A17	26	TCB3 (F) e TCB4 (R)	730pb
A18	27	TCB5 (F) e TCB6 (R)	681pb
A19	28	TCB7 (F) e TCB8 (R)	725pb
A20	01	TCB9 (F) e TCB10 (R)	728pb

**Quadro 5.** Tamanho das sequências obtidas de *Cryptosporidium* após análise da qualidade dos cromatogramas das amostras de pombos (*Columba livia*), referente à área B, de acordo com aquelas amostras que amplificaram DNA.

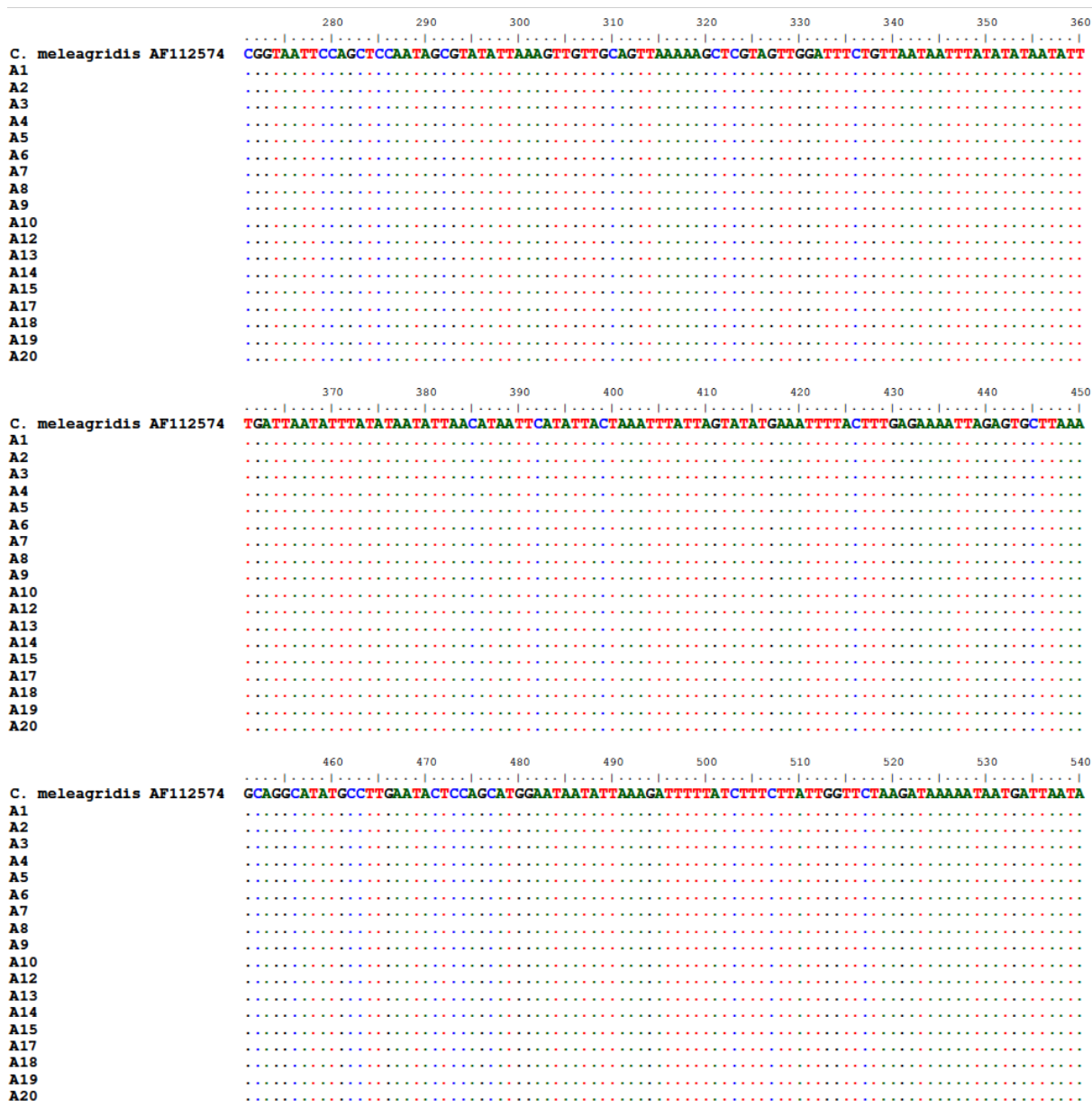
NOME DAS SEQUENCIAS	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS QUE AMPLIFICARAM	IDENTIFICAÇÃO DA SEQUENCIA	TAMANHO DO FRAGMENTO
B1	01	TCB11 (F) e TCB12 (R)	733pb
B2	04	TCB13 (F) e TCB14 (R)	733pb
B3	06	TCB 15 (F) e TCB16 (R)	732pb
B4	07	TCB17 (F) e TCB18 (R)	734pb
B5	11	TCB19 (F) e TCB20 (R)	739pb
B6	12	TCB21 (F) e TCB22 (R)	738pb
B7	13	TCB23 (F) e TCB24 (R)	738pb
B8	14	TCB25 (F) e TCB26 (R)	728pb
B9	15	TCB27 (F) e TCB28 (R)	729pb
B10	16	TCB29 (F) e TCB30 (R)	738pb
B11	17	TCB31 (F) e TCB32 (R)	738pb
B12	18	TCB33 (F) e TCB34 (R)	738pb
B13	19	TCB35 (F) e TCB36 (R)	734pb
B14	20	TCB41 (F) e TCB42 (R)	722pb
B15	21	TCB43 (F) e TCB44 (R)	738pb
B16	31	TCB45 (F) e TCB46 (R)	722pb
B17	37	TCB47 (F) e TCB48 (R)	731pb
B18	40	TCB3 (F) e TCB4 (R)	734pb
B19	41	TCB5 (F) e TCB6 (R)	734pb
B20	42	TCB7 (F) e TCB8 (R)	739pb
B21	43	TCB9 (F) e TCB10 (R)	729pb

**Quadro 6.** Tamanho das sequências obtidas de *Cryptosporidium* após análise da qualidade dos cromatogramas das amostras de pombos (*Columba livia*), referente à área C, de acordo com aquelas amostras que amplificaram DNA.

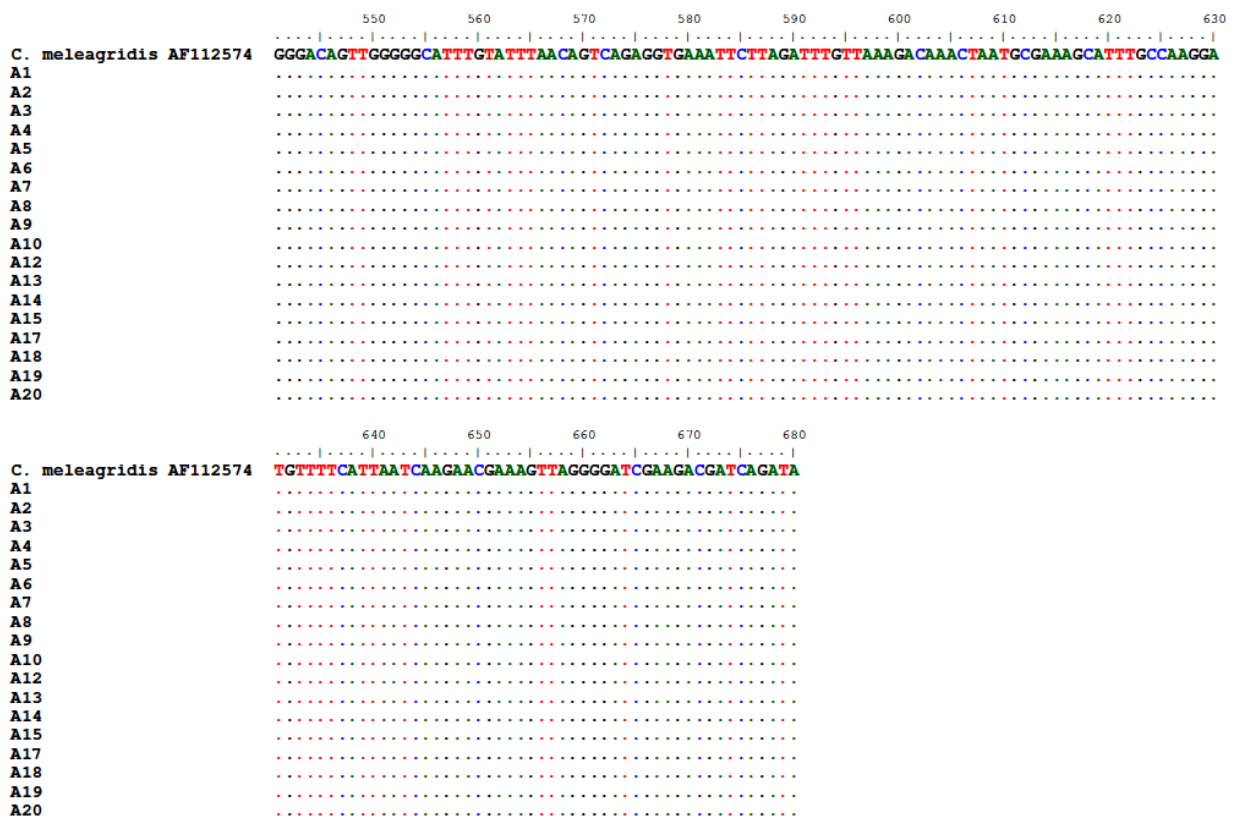
NOME DAS SEQUENCIAS	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS QUE AMPLIFICARAM	IDENTIFICAÇÃO DA SEQUENCIA	TAMANHO DO FRAGMENTO
C1	01	TCB11 (F) e TCB12 (R)	739pb
C2	02	TCB13 (F) e TCB14 (R)	734pb
C3	03	TCB 15 (F) e TCB16 (R)	731pb
C4	04	TCB17 (F) e TCB18 (R)	731pb
C5	06	TCB19 (F) e TCB20 (R)	724pb
C6	07	TCB23 (F) e TCB24 (R)	732pb
C7	08	TCB25 (F) e TCB26 (R)	733pb



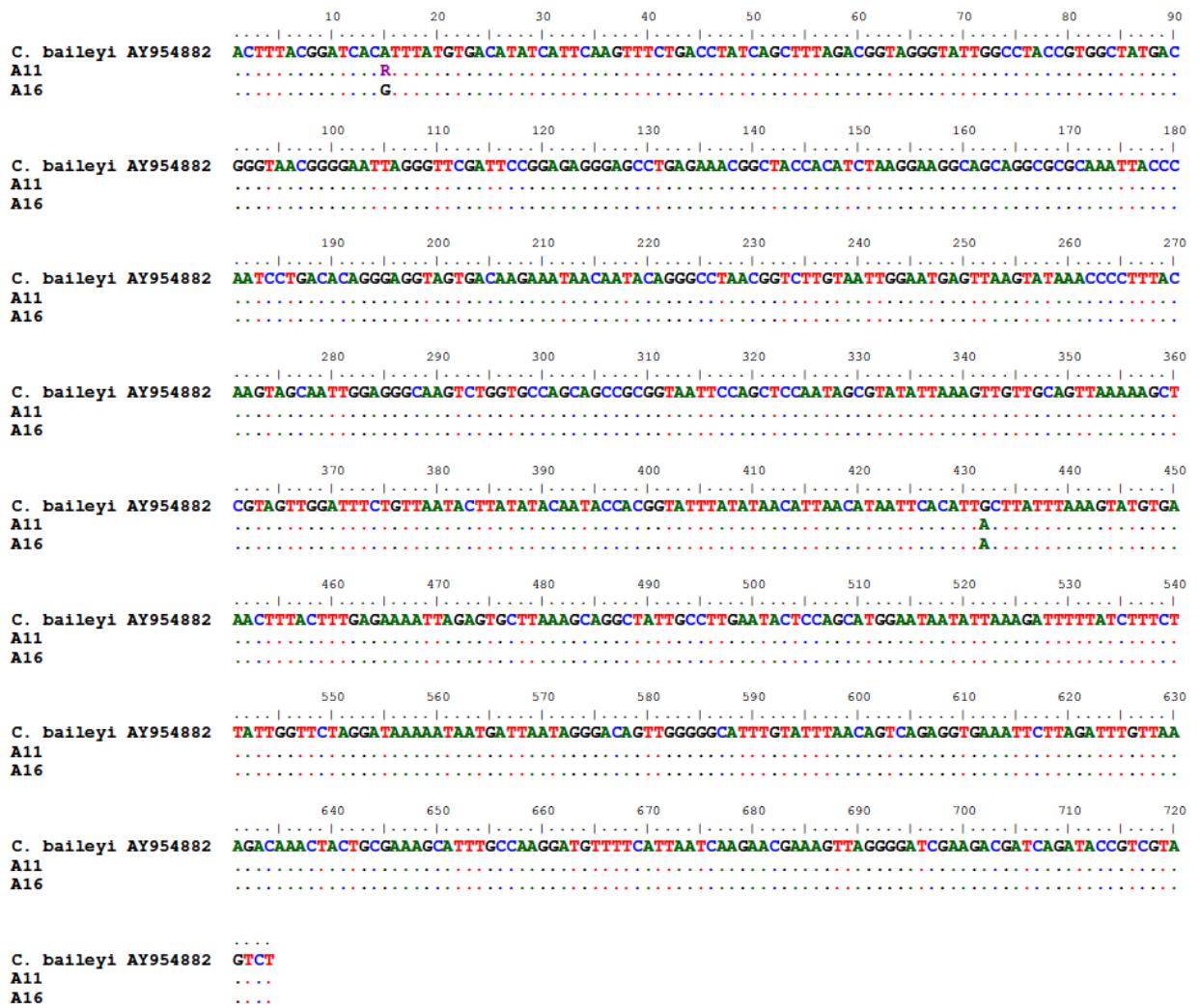
**Figura 7.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área A comparando com sequência completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ).



**Figura7.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área A comparando com sequência completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.) (Continuação).

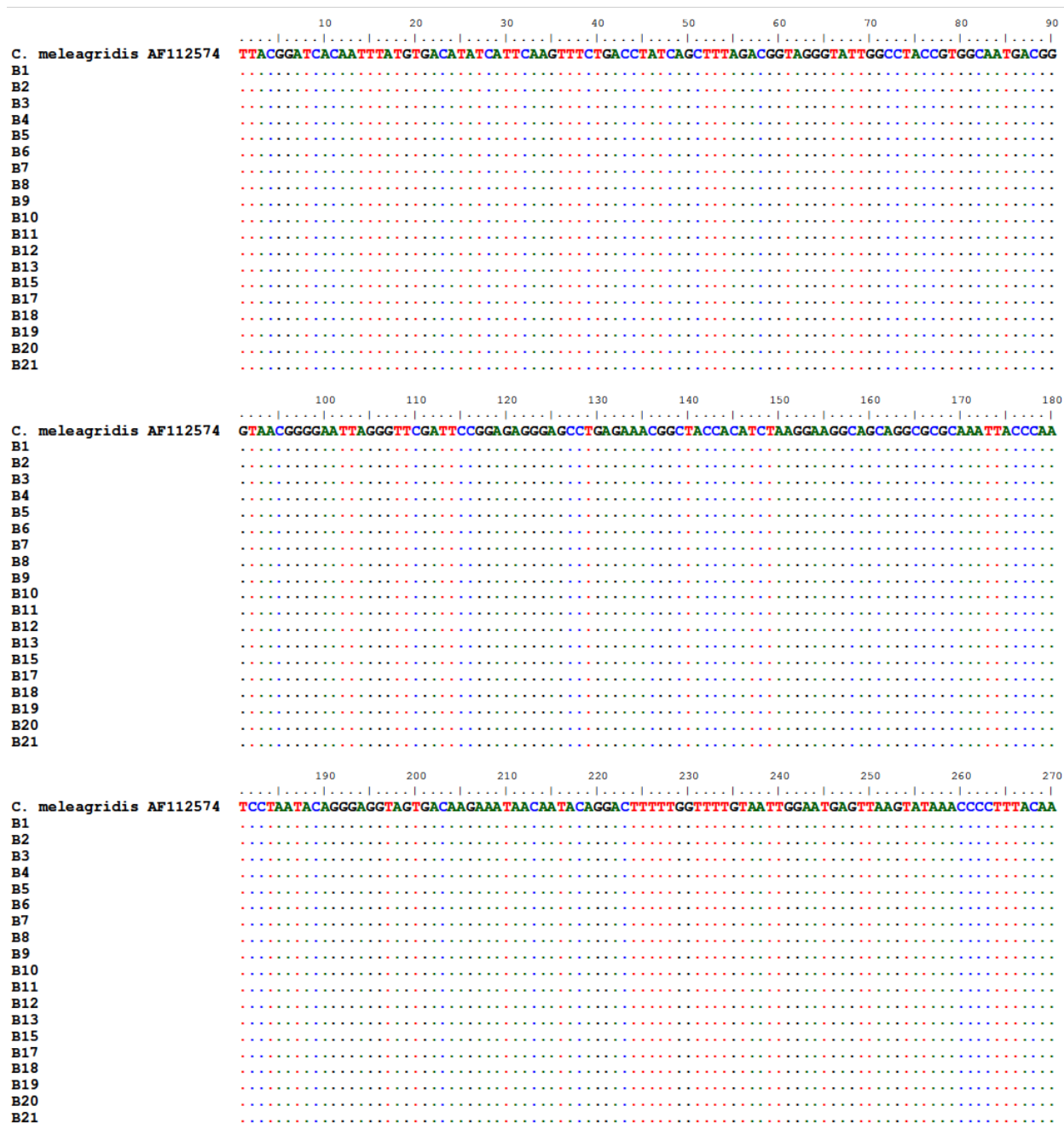


**Figura 7.** Alinhamento das seqüências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área A comparando com seqüência completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ) (Continuação).

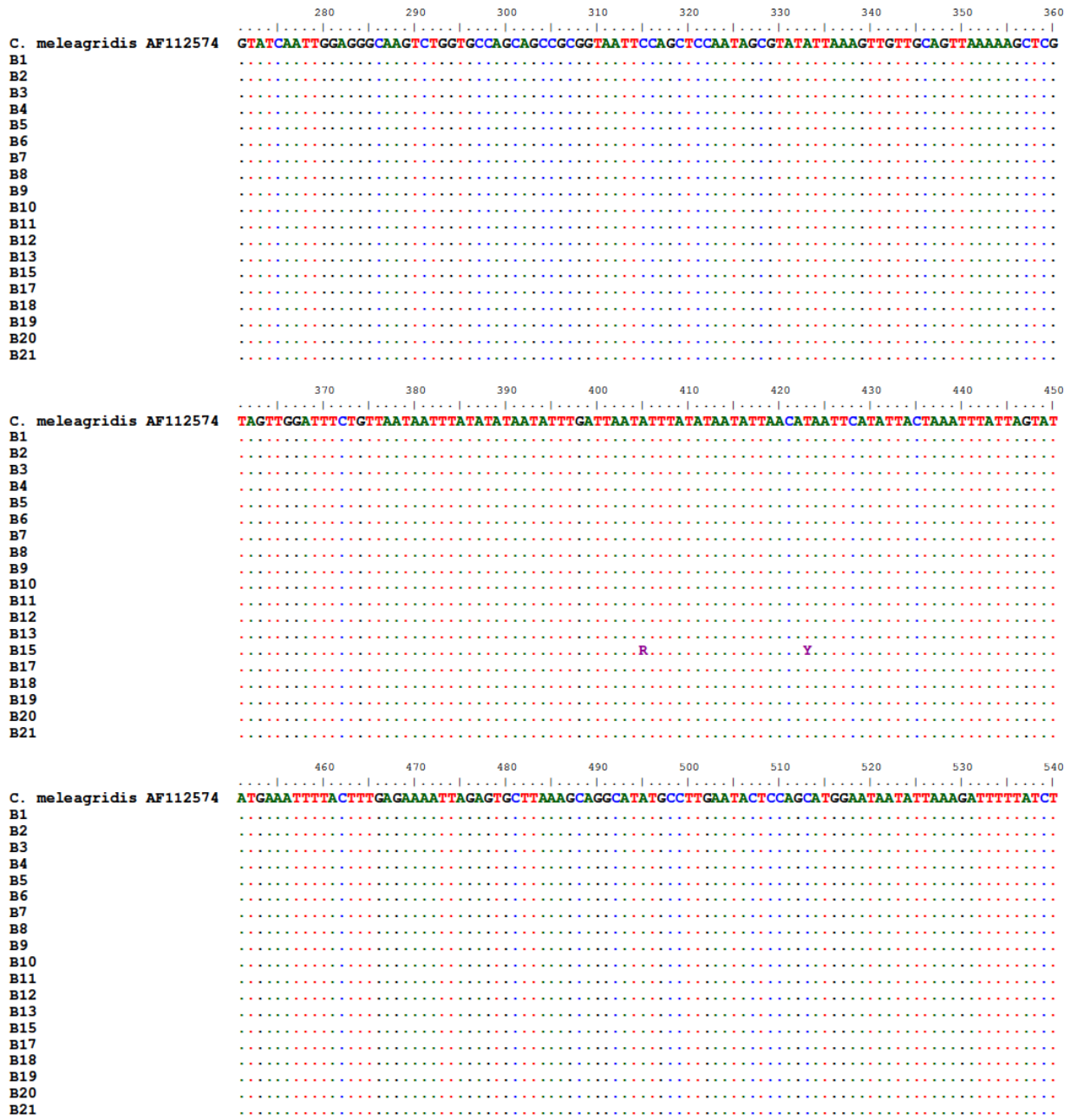


**Figura 8.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área A comparando com sequência completa de *Cryptosporidium baileyi*, evidenciando que há nucleotídeos idênticos ( . ).

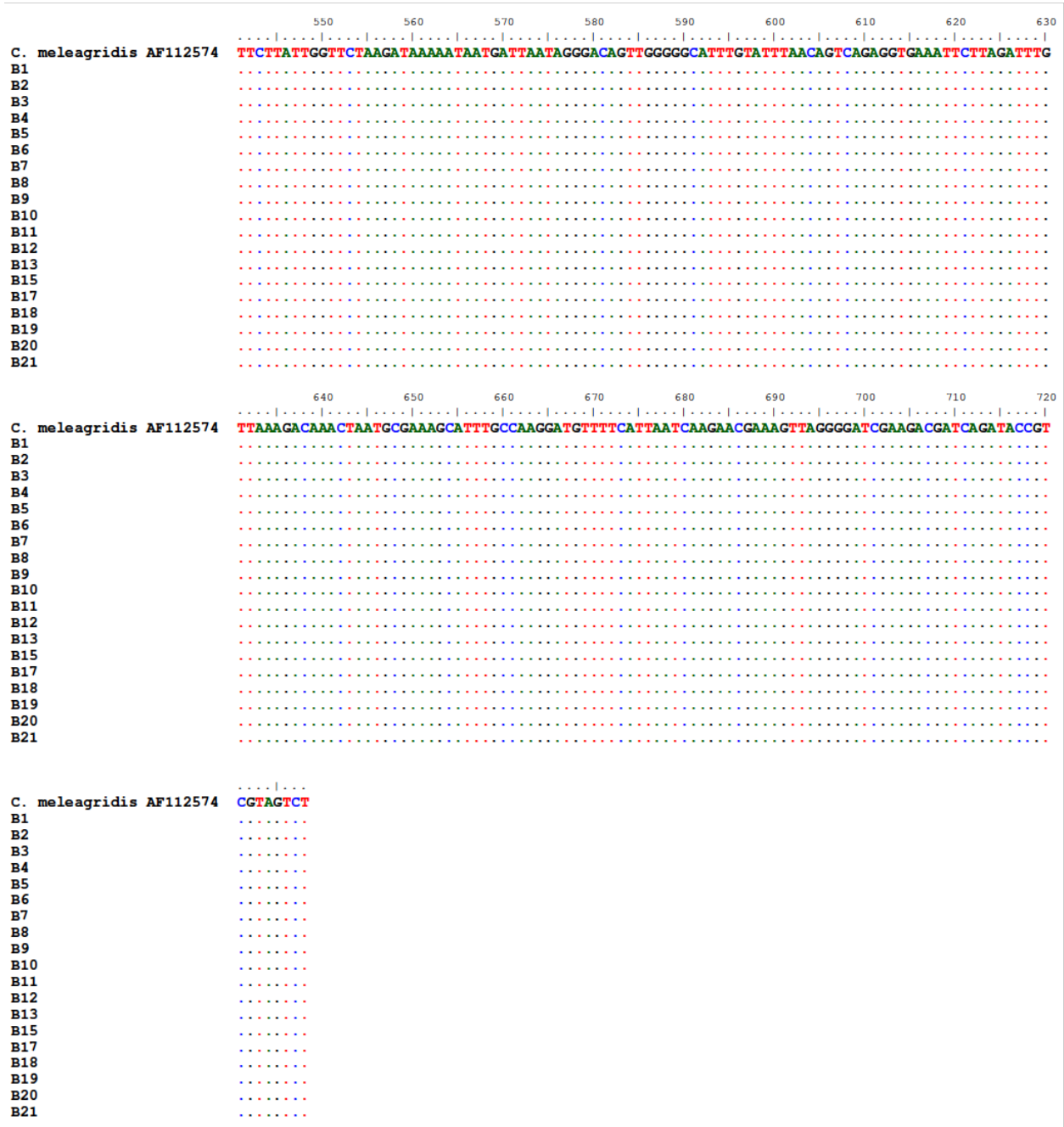




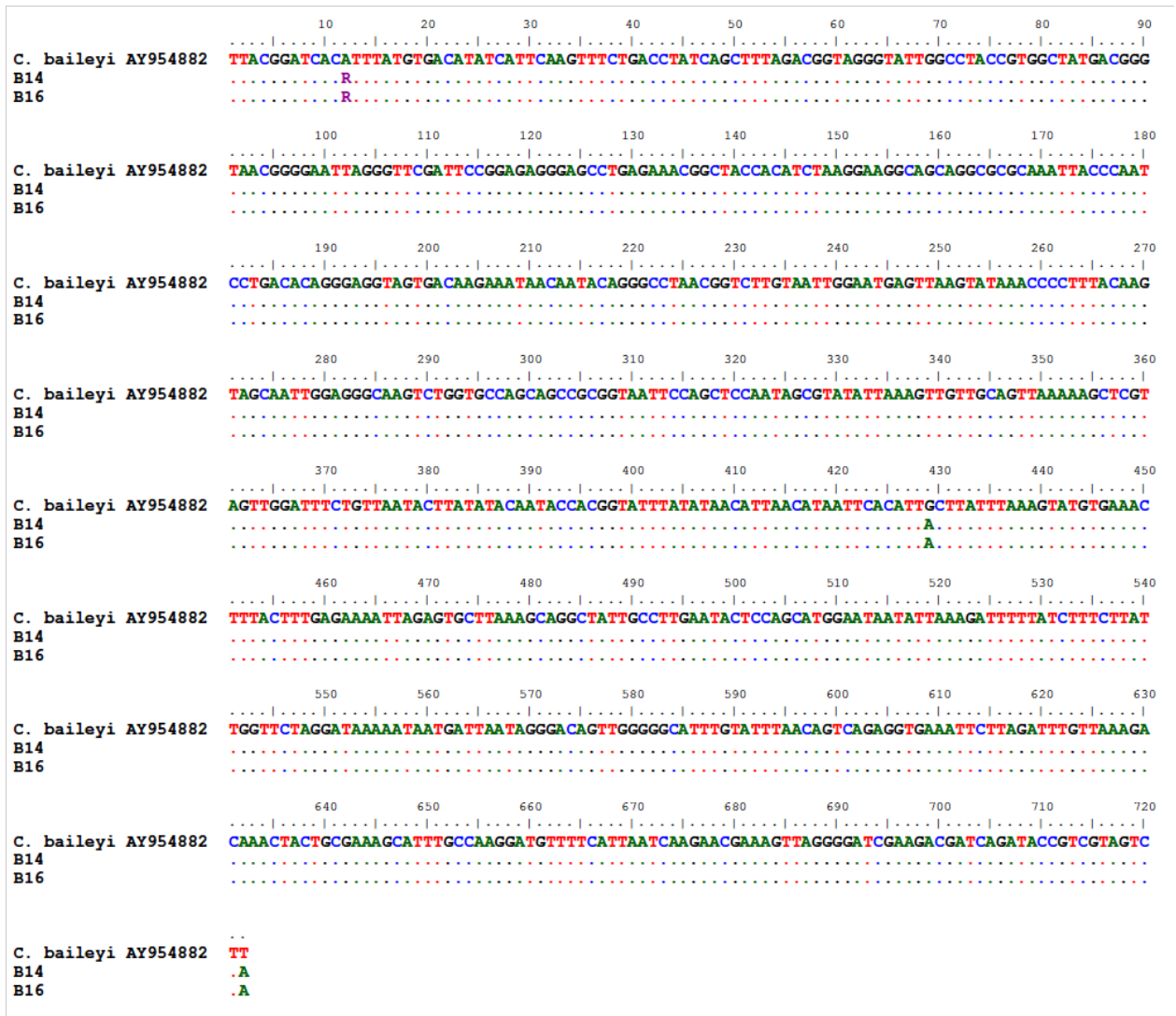
**Figura 9.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área B comparando com sequência completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ).



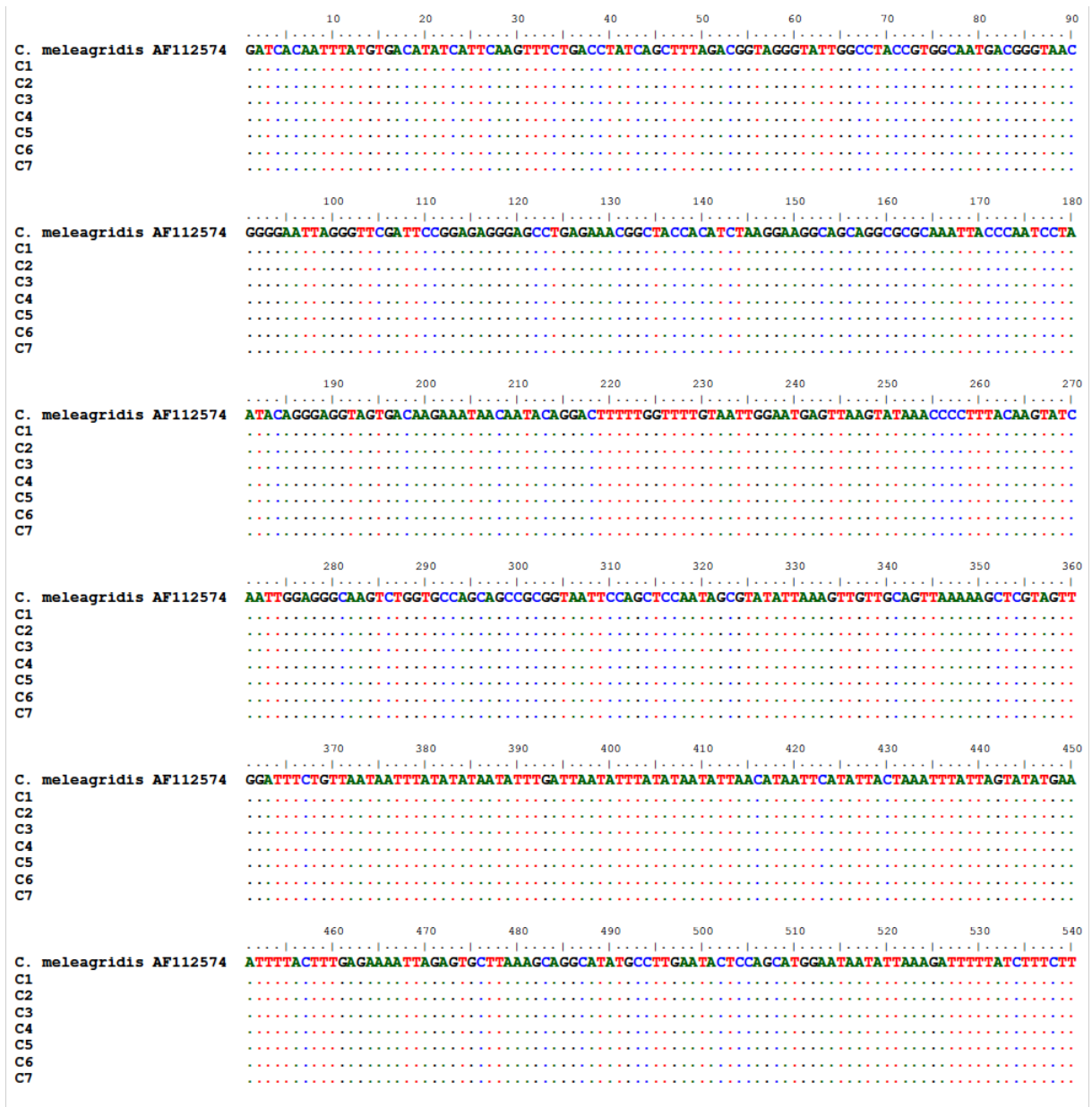
**Figura 9.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área B comparando com sequencia completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ) (continuação).



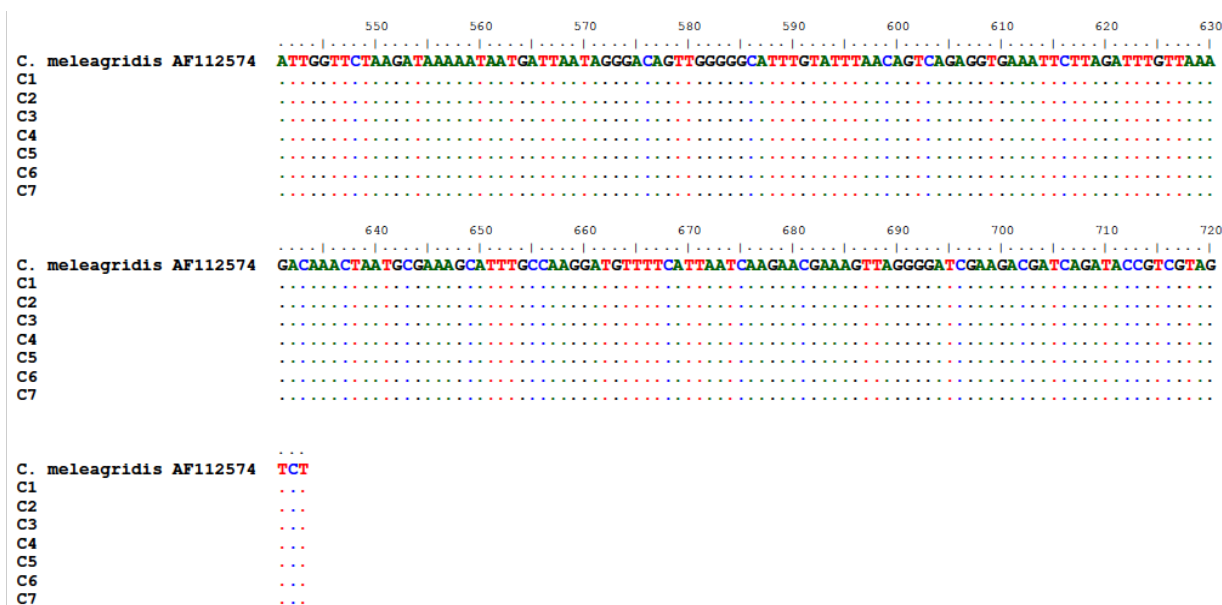
**Figura 9.** Alinhamento das seqüências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área B comparando com sequencia completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ) (continuação).



**Figura 10.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da área B comparando com sequencia completa de *Cryptosporidium baileyi*, evidenciando que há nucleotídeos idênticos ( . ).



**Figura 11.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área C comparando com sequencia completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ).



**Figura 11.** Alinhamento das seqüências obtidas neste estudo provenientes dos pombos da Área C comparando com seqüência completa de *Cryptosporidium meleagridis*, evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ) (continuação).

**Tabela 9.** Total de amostras total amplificadas, número de amostras analisadas e espécies de *Cryptosporidium* diagnosticadas de acordo com as áreas de coleta de amostras de fezes de pombos (*Columba livia*).

LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS	NÚMERO DE AMOSTRAS AMPLIFICADAS	NÚMERO DE SEQUÊNCIAS ANALISADAS	ESPÉCIE DIAGNOSTICADA / NÚMERO DE AMOSTRAS	
			<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	<i>Cryptosporidium baileyi</i>
A	23	20	18 (90%)	02 (10%)
B	21	21	19 (90,47%)	02 (9,53%)
C	09	07	07 (100%)	0 (0%)
Total	53	48	44 (91,67%)	04 (8,33%)

Foi observada identidade entre as seqüências obtidas nas áreas deste estudo (Áreas A, B e C), com aquelas publicadas no GenBank, para a espécie *C. meleagridis* (quadro 7) e *C. baileyi* (quadro 8).

A comparação dos fragmentos obtidos das seqüência provenientes deste estudo, com as seqüências do gene 18S de *C. meleagridis* e *C. baileyi*, espécies que apresentam o gene completamente sequenciado depositada no Genbank, tendo os números de acesso: AF112574 e AY954882, respectivamente, permitiu localizar o fragmento de pares de base e as posições nucleotídicas de acordo com cada área do estudo.

**Quadro 7.** Sequências obtidas do GenBank da espécie *Cryptosporidium meleagridis* utilizadas como comparação das sequencias obtidas neste estudo (áreas A, B e C), com as suas respectivas similaridades.

SEQUENCIA (Acesso /origem)	IDENTIDADE			QUERY COVER (Cobertura da sequencia)			REFERENCIA	LOCAL
	Áreas			Áreas				
	A	B	C	A	B	C		
<b>KJ469967</b> Gorilas ( <i>Gorilla beringei beringei</i> )	100%	100%	100%	100%	99%	100%	Sak et al., 2014	Ruanda
<b>JX548300</b> Frangos de corte ( <i>Gallus gallus</i> )	100%	100%	100%	100%	99%	100%	Wang et al., 2014	China
<b>HM485432</b> Humanos ( <i>Homo sapiens</i> )	100%	100%	100%	100%	99%	100%	Elwin et al., 2012	Inglaterra e Países de Gales
<b>HM116382</b> Pombos ( <i>Columba livia</i> )	100%	100%	100%	100%	99%	100%	Qi et al., 2012	China
<b>DQ067565</b> Humanos ( <i>Homo sapiens</i> )	100%	100%	100%	100%	99%	100%	Muthusamy et al., 2006	Índia
<b>AF112574</b> Perus ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	100%	100%	100%	100%	99%	100%	Xiao et al., 1999a	Estados Unidos da América

Na área A, utilizou-se para comparação (alinhamento) entre os isolados de *C. meleagridis* 680pb e *C. baileyi* 724pb. A comparação das amostras A11-A16 com a sequência completa do 18S de *C. baileyi*: a posição nucleotídica do fragmento de 724pb analisado foi de 200-923. A comparação das amostras A1-A10, A12-A15, A17-A20 com sequência completa do 18S de *C. meleagridis* teve a posição nucleotídica do fragmento de 680pb e foi analisado: 284-963pb. O tamanho do fragmento usado para construção da árvore filogenética foi de 712pb (figura 12).

Na área B, o tamanho da sequência utilizada para comparação (alinhamento) entre os isolados para *C. meleagridis* foi de 728pb e para *C. baileyi* de 722pb. A comparação das amostras B14-B16 com sequência completa do 18S de *C. baileyi*: posição nucleotídica do fragmento de 722pb analisado foi de 203-924. A comparação das amostras B1-B13, B15 e B17-B21 com sequência completa do 18S de *C. meleagridis* teve a posição nucleotídica do fragmento de 728pb analisado: 248-975pb. A sequência B15 teve pico duplo em duas regiões, ao analisar no BLAST separadamente continuou sendo a espécie *C. meleagridis*. O tamanho do fragmento usado para construção da árvore filogenética foi de 733pb (Figura 13).

Já na área C, o tamanho da sequência utilizada para comparação (alinhamento) entre os isolados para *C. meleagridis* foi de 723pb. Comparando as amostras com sequência completa do 18S de *C. meleagridis* a posição nucleotídica do fragmento foi de 723pb e analisado de 253-975pb. O tamanho do fragmento usado para construção da árvore filogenética foi de 751pb (Figura 14).

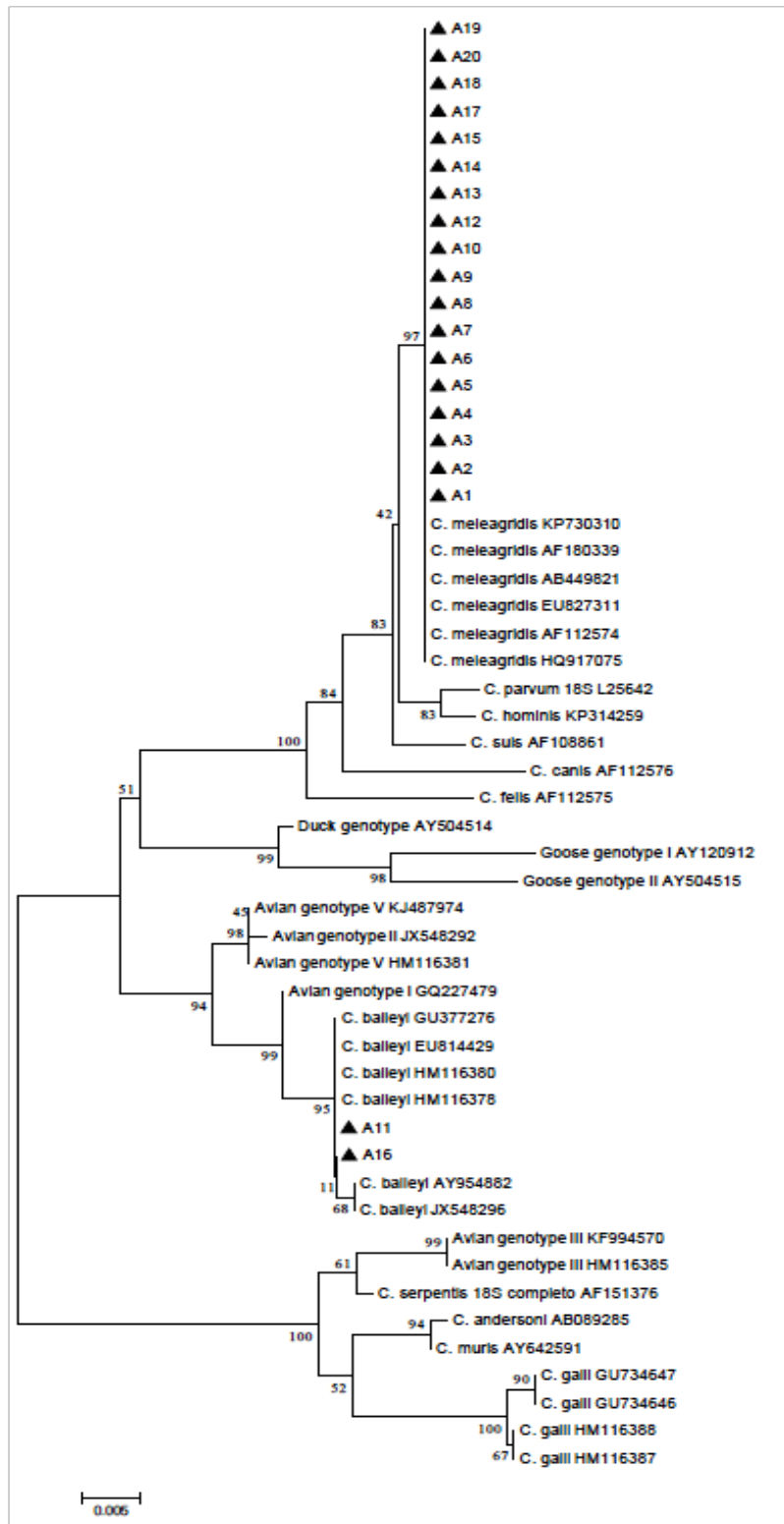
As análises filogenéticas de *Cryptosporidium* spp., suportam a estrutura genética geral do gênero, com as espécies gástricas e as intestinais, formando grupos monofiléticos distintos, o que está de acordo com as características biológicas e especificidade de cada hospedeiro. No estudo da posição taxonômica dos isolados obtidos no presente estudo, podemos observar que *Cryptosporidium meleagridis* se agrupa no clade das espécies intestinais e *C. baylei*, ficando em um ramo abaixo das intestinais.

Na figura 15, está representada a árvore filogenética com as respectivas amostras de acordo com cada espécie diagnosticada neste trabalho, que foram consideradas contendo alguns nucleotídeos diferentes, destas as sequências obtidas foram depositadas no Genbank: *Cryptosporidium meleagridis* (A1= KY561382, B1= KY561383, B15=KY561384 e C1= KY561385) e *C. baylei* (A11= KY561379, A16= KY561380 e B14= KY561381).

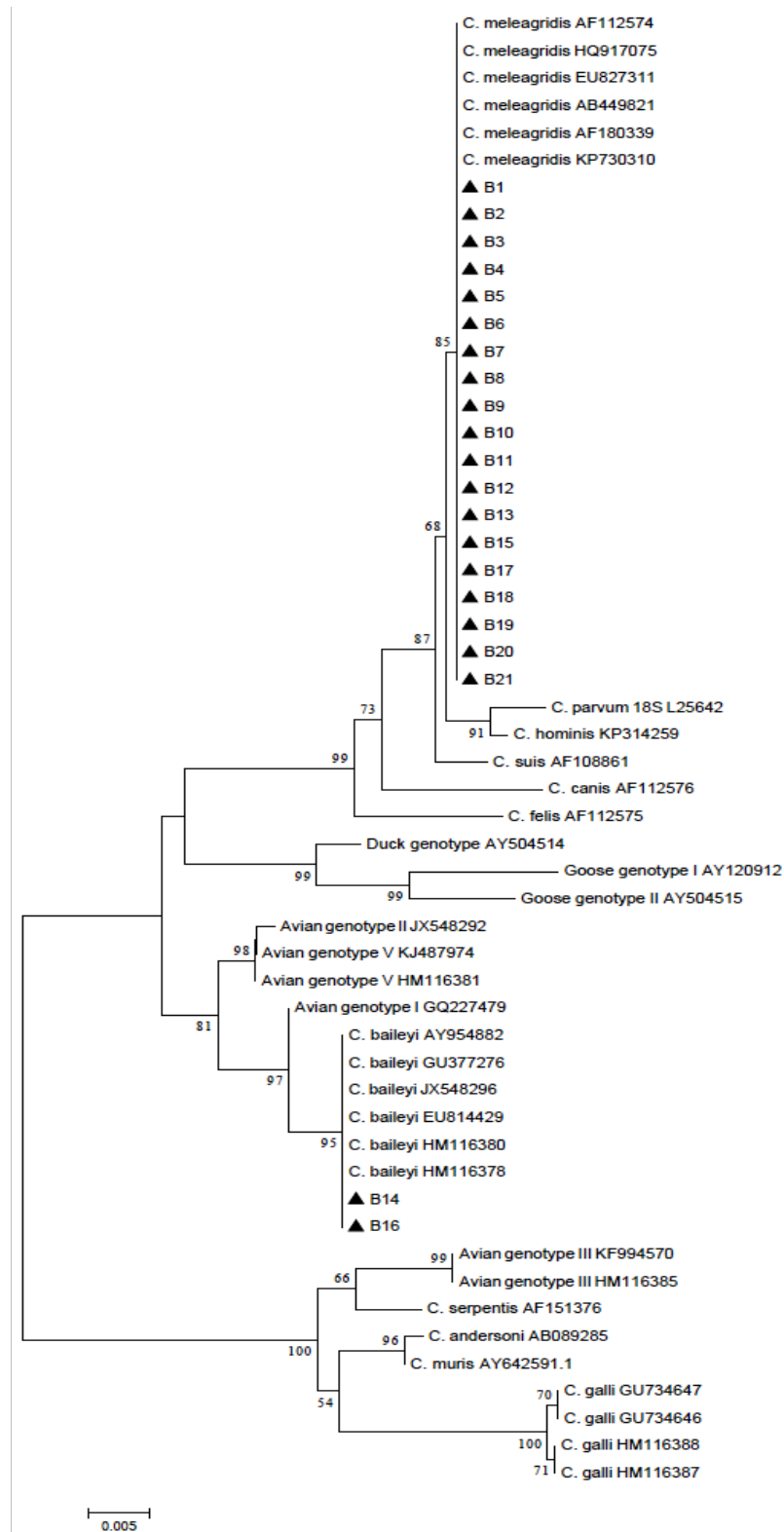
**Quadro 8.** Sequências obtidas do GenBank da espécie *Cryptosporidium baileyi* utilizadas como comparação das sequencias obtidas neste estudo (áreas A, B e C), com as suas respectivas similaridades.

SEQUENCIA (Acesso /origem)	IDENTIDADE		QUERY COVER (Cobertura da sequência)		REFERENCIA	LOCAL
	Áreas		Áreas			
	A	B	A	B		
<b>KY012352</b> Ganso africano ( <i>Anser cygnoides</i> )	99%	99%	100%	99%	Cunha et al., 2016	Brasil
<b>GQ426096</b> Falcão ( <i>Falco cherrug</i> )	99%	99%	99%	99%	Bougiouklis et al., 2013	Estados Unidos da América
<b>KF994585</b> <i>Cryptosporidium</i> sp. (águas superficiais)	99%	99%	99%	99%	Prystajecy et al., 2014	Canadá
<b>JX548294</b> Frango de corte ( <i>Gallus gallus</i> )	99%	99%	99%	99%	Wang et al., 2014	China
<b>GU377276</b> Avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> )	99%	99%	99%	99%	Wang et al., 2010	China
<b>GQ227475</b> canário-da-terra ( <i>Sicalis flaveola</i> )	99%	99%	99%	99%	Nakamura et al., 2009	Brasil

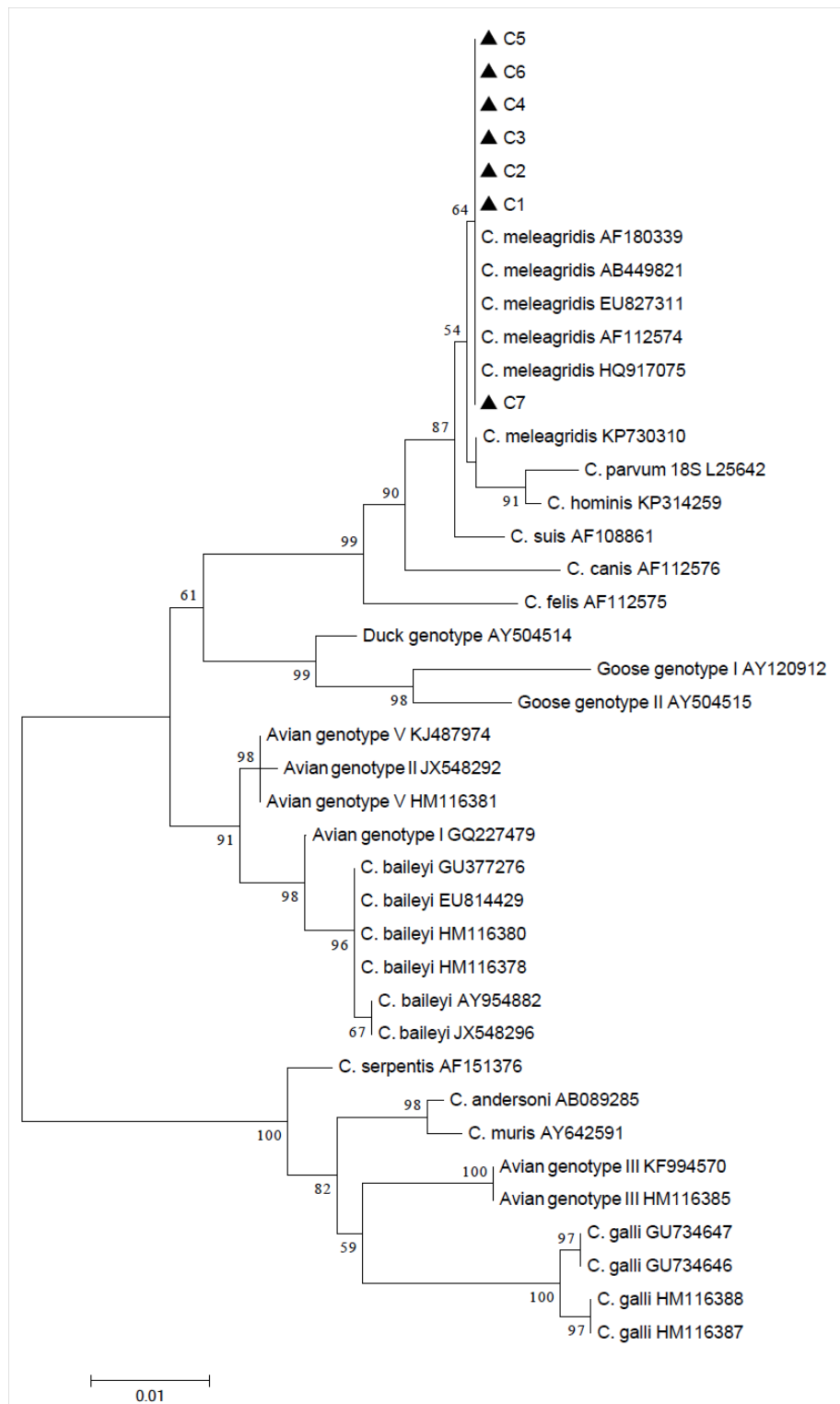




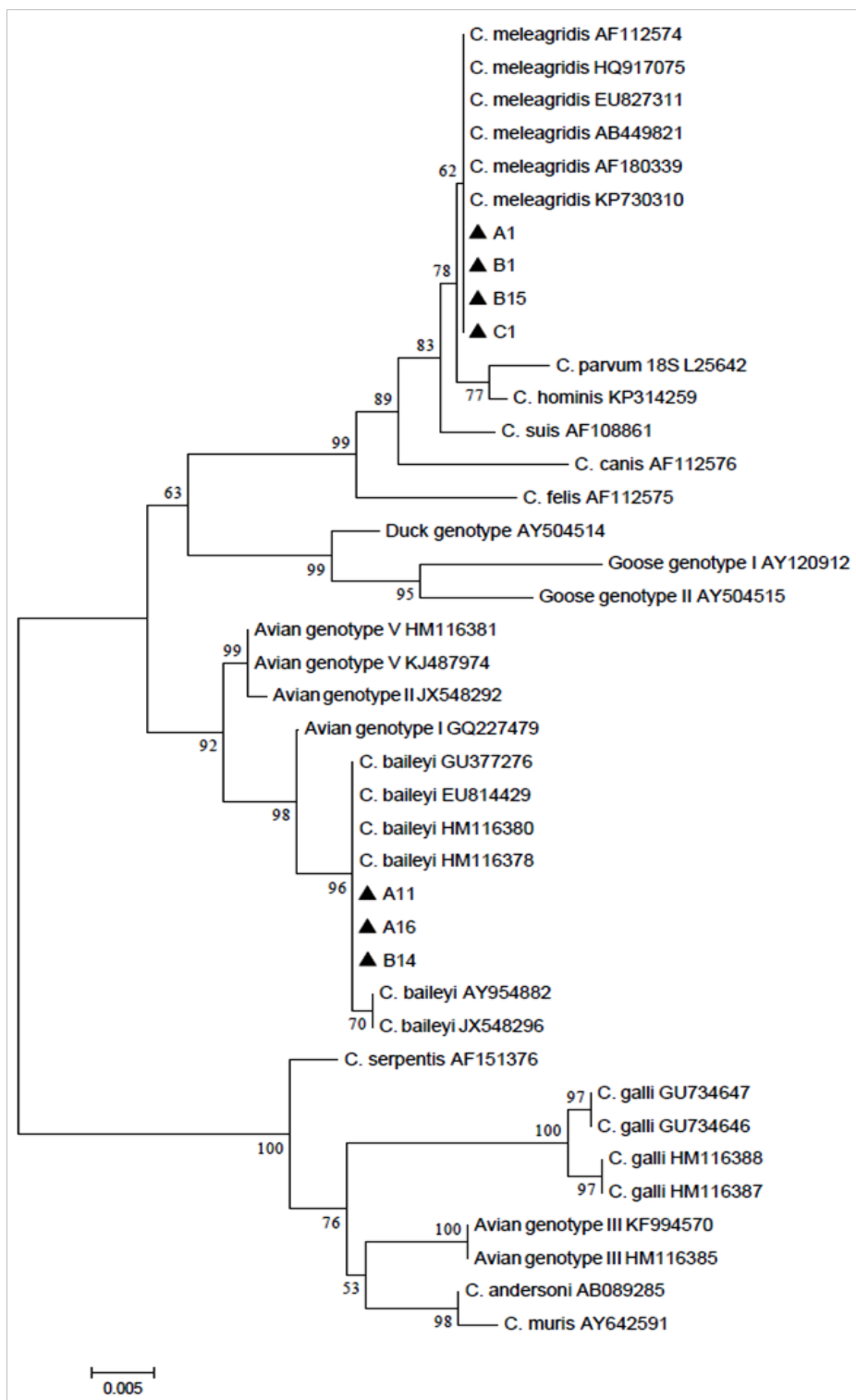
**Figura 12.** Análise filogenética entre os isolados de *Cryptosporidium* spp. baseada no sequenciamento total do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 712pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura-2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequencias obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pombos da área A.



**Figura 13.** Análise filogenética entre os isolados de *Cryptosporidium* sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 733pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura - 2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequencias obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pombos da área B.



**Figura 14.** Análise filogenética entre os isolados de *Cryptosporidium* sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 751 pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura - 2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequencias obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pombos da área C.



**Figura 15.** Análise filogenética entre os isolados de *Cryptosporidium* sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 713 pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura-2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequencias obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pombos das áreas A, B e C. Área A: *C. meleagridis* (A1-A10, A12-A15, A17-A20, são idênticas); Área B, *C. meleagridis* (B1-B13, B17-B21, são idênticas); *C. baileyi* (B14 e B16 são idênticas). Área C (C1 a C7, são idênticas).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Diagnóstico Microscópico

Até o presente momento no Brasil foram realizados treze estudos envolvendo a detecção de *Cryptosporidium* spp. em aves, porém nenhum destes envolvendo o hospedeiro pombo (*Columba livia*). Neste trabalho, foram analisadas 387 amostras fecais de pombos, com uma positividade de 20,93% utilizando o diagnóstico microscópico. Esta metodologia é utilizada na maioria dos laboratórios para realização da triagem de amostras clínicas suspeitas do parasitismo, desta forma, permitindo a identificação da forma infectante (oocisto) em amostras fecais. A utilização do diagnóstico parasitológico de fezes, apresenta a facilidade do procedimento laboratorial além de baixo custo, quando comparado com outras metodologias (ARROWOOD, 1997).

Estudos demonstraram que aves infectadas com o *Cryptosporidium* spp., eliminam oocistos nas fezes em torno de quatro a seis dias após a infecção. E nos dias seguintes esta concentração aumenta, podendo o hospedeiro eliminar oocistos por vários meses (CURRENT et al., 1991; SRÉTER; VARGA, 2000; FAYER, 2008). Desta forma, com auxílio da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar, é possível aumentar a concentração dos oocistos nas amostras, facilitando a visualização destes na microscopia óptica (HUBER et al. 2004; FAYER, 2008; IGNATIUS et al., 2016).

Mundialmente, *Cryptosporidium* spp. parasitando pombos é assinalado apenas em quatro países: Turquia, China, Irã e Tailândia, totalizando nove descrições e todas estas utilizaram a técnica de microscopia como triagem.

O resultado encontrado neste trabalho, em três bairros populosos do município do Rio de Janeiro, revelou que 20,93% das amostras de fezes de pombos analisados, apresentaram positividade para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Este percentual foi considerado elevado (quando comparados as descrições encontradas nos outros países) e preocupante, por serem áreas onde há uma quantidade acentuada da população animal e humana, que possivelmente facilitariam a dispersão e contaminação ambiental. A densidade demográfica do município do Rio de Janeiro é de 5.265 habitantes/km<sup>2</sup>, sendo a 5ª maior capital brasileira neste quesito (IBGE, 2016), sendo que os bairros de Campo Grande e Bangu são respectivamente os bairros mais populosos do município (IBGE, 2016).

Neste contexto, alguns fatores contribuem significativamente para o sucesso de *Cryptosporidium* spp. como um parasito, tais como, a eliminação de alto número de oocistos no ambiente pelo hospedeiro infectado; o oocisto já é eliminado através das fezes esporulado; baixa dose infectante; baixa especificidade de algumas espécies por hospedeiros; grande diversidade de hospedeiros para uma única espécie; oocistos pequenos que favorece a sua dispersão e a resistência do oocisto às adversidades ambientais e aos tratamentos de águas convencionais (XIAO et al., 2004b). Estes bairros de coleta de amostra, Campo Grande e Bangu estão localizados na zona Oeste e o de Madureira na zona Norte da capital fluminense, nestes bairros abrigam um comércio diversificado, atrativo para várias pessoas de outras regiões do município, podendo ser risco para a transmissão entre os hospedeiros humano e animais. Além do que, em algumas localidades dessas áreas do estudo, não há saneamento básico, favorecendo a proliferação de pombos que consequentemente se estiverem infectados irão contribuir para uma maior dispersão do oocisto.

## 5.2. Diagnóstico Molecular: PCR, Nested-PCR e Sequenciamento

Nesta pesquisa, envolvendo pombos no município do Rio de Janeiro, daquelas 81 amostras positivas na triagem, 53 foram amplificadas e submetidas à extração do DNA. As 28 amostras restantes não foram utilizadas, pois provavelmente havia inibidores ou excesso de material genético.

Após sequenciamento foi possível, diagnosticar duas espécies: *C. meleagridis* em 44 amostras e *C. baileyi* em quatro amostras. As espécies *C. parvum*, *C. meleagridis* possui uma grande variedade de hospedeiros, e tem sido diagnosticadas em várias espécies da classe das aves (O'DONOGHUE, 1995; MORGAN et al., 2000; SRETER; VARGA, 2000; DARABUS; OLARIU, 2003; ABE; ISEKI, 2004; HUBER et al., 2007; PAGÈS-MANTÉ et al., 2007; SOLTANE et al., 2007). Estudos de transmissão experimentais têm demonstrado que *C. meleagridis* pode infectar frangos de corte, patos, perus, bezerros, suínos, coelhos, ratazanas e ratos (O'DONOGHUE, 1995; AKIYOSHI et al., 2003; DARABUS; OLARIU, 2003; HUANG et al., 2003). Em geral, a taxa de infecção e virulência de *C. meleagridis* para a espécie de mamíferos foi semelhante a *C. parvum* (AKIYOSHI et al., 2003). Desta forma, *C. meleagridis* tem uma especificidade de hospedeiros relativamente baixa, incluindo tanto a classe das aves quanto a dos mamíferos.

Sendo que, *C. meleagridis* apresenta subtipos que já foram diagnosticados tanto em aves quanto humanos; podendo ocorrer rotas transmissão antropozoonótica quanto a zoonotrófica, adquirindo a sua importância em saúde pública (CAMA et al., 2003; ELWIN et al., 2012; SILVERLÅS et al., 2012). Mas também não podemos descartar a sua importância como um agente patogênico para as aves, como neste trabalho foi diagnosticado no hospedeiro pombo, estes podem disseminar o patógeno entre os pombos e outras espécies de aves de vida livre, assim como também entre aves de cativeiro, aumentando desta forma a amplitude de disseminação ambiental do patógeno e de seus hospedeiros.

Naqueles trabalhos anteriores mencionados utilizando pesquisa de *Cryptosporidium* spp. com pombos, na China, Irã e Tailândia, apenas nos países asiáticos foram realizadas análise molecular das amostras. Dos quatro artigos publicados no Irã, nenhum deles foram feitos análises genéticas.

No trabalho de Koompaong et al. (2014) desenvolvido na Tailândia, a única amostra positiva encontrada foi diagnosticada como *C. meleagridis*. Nesta pesquisa, os pombos eram de vida livre tendo contato com diversos ambientes e outras espécies animais, aumentando a chance de se infectarem com o patógeno, além da dispersão de oocisto no ambiente.

Nos três trabalhos realizados na China com pombos pesquisando *Cryptosporidium* spp., as aves utilizadas nas pesquisas, não eram de vida livre. Ou eram de Pet Shop ou de cativeiro, o que pode justificar os baixos números de amostras positivas encontradas. Todos conseguiram realizar o sequenciamento e obter a espécie do *Cryptosporidium* spp. No trabalho de Qi et al., 2011, das 21 amostras fecais de pombos de Pet Shops analisadas, apenas uma foi positiva e diagnosticada como *C. meleagridis*. Os autores não discutiram especificamente este resultado pois neste trabalho, envolviam outras aves de cativeiro. Embora ressaltassem do risco desta espécie com potencial zoonótico.

Por sua vez, na pesquisa de Li et al., 2015, as amostras fecais de pombos eram de criatórios voltados para consumo humano da ave. Houve baixo número de positivos (2/244), e destas uma foi diagnosticada como *C. meleagridis* e a outra como *C. baileyi*. Os autores ressaltaram que estas espécies são comuns em aves e que o resultado era justificado por serem aves presas no criatório, sem contato com outras aves. Embora também tenham deixado claro o risco do potencial zoonótico de *C. meleagridis*, uma vez que estes pombos são criados para consumo humano.

Em outra pesquisa (LI et al., 2016) utilizando aves de Pet Shops, em quatro amostras fecais analisadas para pombo, apenas uma foi positiva, sendo identificada a espécie *C. baileyi*. Os autores afirmaram que esta espécie é comumente diagnosticada em aves em todo o mundo e também relataram que foi a espécie mais encontrada na sua pesquisa envolvendo outras espécies da classe das aves. Como estas aves eram mantidas em gaiolas umas próximas as outras nos Pet Shops, os autores relatam o risco da infecção cruzada entre as aves.

*Cryptosporidium baileyi* da mesma forma que a espécie anterior, infecta várias espécies da classe das aves, sendo que é considerada uma espécie generalista entre a classe das aves, infectando uma ampla variedade de aves selvagens, de companhia e de produção (GOODWIN, 1989; LINDSAY; BLAGBURN, 1990; PAVLÁSEK, 1993; RYAN et al., 2003b; ABE; ISEKI, 2004; JELLISON et al., 2004; KIMURA et al., 2004; CHVALA et al., 2006; HUBER et al., 2007; VAN ZEELAND et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009; QI et al., 2011). Infecções experimentais já foram conduzidas entre aves, incluindo codornas japonesas, patos domésticos, gansos, faisões, perdizes e perus e foram bem sucedidos com a exceção de codornizes (CURRENT et al., 1986; LINDSAY et al., 1987, 1989b; LINDSAY et al., 1990; CARDOSO et al., 2005). A sua prevalência é variável, dependendo da localidade do estudo. A infecção pode ser manifestada por sinais clínicos associados com o desenvolvimento do parasita no aparelho digestivo e vias respiratórias (GOODWIN, 1989). É importante ressaltar que esta espécie não apresenta potencial zoonótico, mas tem a sua relevância na saúde animal, especificamente para a classe das aves. Assim como na espécie *C. meleagridis*, pombos podem disseminar o patógeno entre várias espécies de aves cativas ou de vida livre, ampliando a disseminação do patógeno no ambiente.

As análises filogenéticas de *Cryptosporidium* spp., suportam a estrutura genética geral do gênero, com as espécies gástricas e as intestinais, formando grupos monofiléticos distintos, o que está de acordo com as características biológicas e especificidade de cada hospedeiro. Desta forma, *Cryptosporidium* spp. formaram dois clados. A colocação de *C. baileyi* ainda é incerta, nas análises utilizando os genes 18S e actina, esta espécie se agrupa com as espécies intestinais, já nas árvores construídas com o HSP-70, ela se agrupa com as espécies gástricas (XIAO et al., 2004c).

### **5.3. Importância do pombo como hospedeiro e transmissor de patógenos**

A disseminação de patógenos por pombos em ambientes urbanos têm sido descritos há muito tempo, principalmente assinalando os riscos para a população humana. O contato direto ou indireto entre esta ave e humanos normalmente ocorre em praças, jardins públicos, parques, mercados, estações ferroviárias ou em outros ambientes onde haja disponibilidade de alimentos e água. Em diversas regiões do mundo, esta ave é considerada como praga por causar destruição ao patrimônio arquitetônico, danos à agricultura, e também são incriminadas como transmissoras de patógenos não só para humanos, mas também para animais. Estudos epidemiológicos em populações de pombos selvagens detectaram pelo menos 110 agentes patogênicos para a população humana, incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários (HAAG-WACKERNAGEL; MOCK, 2004; MAGNINO, et al., 2009; CANO-TERRIZA et al., 2015; EBANI et al., 2016).

Após a Segunda Guerra Mundial, a população dos pombos veio aumentando exponencialmente, sobretudo nas áreas urbanas e periurbanas, devido a oferta de locais favoráveis para sua nidificação, juntamente com fontes de alimentos abundantes que vinham com o crescimento da população humana nas cidades. Além disso, a ação reduzida de fatores naturais seletivos, tais como, invernos mais brandos e ausência de predadores (DOBEIC et al., 2011), elevaram à densidade populacional aceitável destas aves, que é de 300 a 400 aves por

km<sup>2</sup> (AMORUSO et al., 2014). As áreas periurbanas e urbanas são muitas vezes o lar de aves de vida livre, particularmente pombos, e durante as últimas décadas, atingiu densidades superiores a 2.000 pombos/km<sup>2</sup> em diversas cidades europeias, como Florença, Milão (SACCHI et al., 2002) e Barcelona (SENAR et al., 2009) (CANO-TERRIZA et al., 2015).

Historicamente, a interação entre pombos e humanos trouxe benefícios recíprocos, porém nos últimos tempos os pombos têm sido cada vez mais percebidos apenas como uma ameaça e um incômodo. Em muitas cidades em todo o mundo, o controle de sua população em ambientes urbanos tem sido difícil (HAAG-WACKERNAGEL; MOCH, 2004; AMORUSO et al., 2014).

Devido as características de urbanização e a alta densidade de pombos encontradas no estado Rio de Janeiro, Brasil, o potencial desta ave albergar e transmitir oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente com risco de infecção à população humana é grande. Principalmente em áreas com baixas condições socio-econômicas e saneamento básico deficitário.

O município do Rio de Janeiro, de acordo com o último censo em 2010, havia uma população de 6.320.446 (IBGE, 2016), que estão distribuídos em 33 regiões administrativas e 160 bairros. A divisão política oficial da cidade leva em conta características histórico-culturais para a divisão destes bairros, sendo que a maioria de sua população está concentrada nos bairros de Campo Grande, Santa Cruz, Bangu, Tijuca, Realengo, Jacarepaguá, Copacabana e Barra da Tijuca. Neste trabalho, foram utilizadas amostras fecais provenientes de pombos obtidos nas regiões de Campo Grande, Bangu e Madureira, que possuem de acordo com o censo oficial respectivamente 328.300, 243.100 e 50.106, totalizando 621.506, ou seja 9,83% da população do município do Rio de Janeiro. Além de serem áreas com grande população, ocorre também uma circulação intensa de pessoas de outros bairros, além de um comércio bem diversificado e muito movimentado. Todos estes atributos demonstram que pombos vivendo em estreito contato com humanos e animais, podem ser considerados um reservatório e transmissor de agentes potencialmente patogênicos e zoonóticos (HAAG-WACKERNAGEL; MOCH, 2004; CABALLERO et al., 2015).

Neste sentido, algumas pesquisas foram realizadas em grandes cidades, tendo como foco os pombos em ambientes urbanos densamente povoados. Caballero et al. (2015), utilizaram 22 amostras fecais de pombos (obtidas em “pool”) em parques da capital do Peru, Lima. Nestas amostras foram diagnosticadas *Campylobacter jejuni* e em 7% deste total, uma variante virulenta da *Escherichia coli*, representando primeiro relato de agentes potencialmente patogênicos isolados de pombos urbanos nesta região, indicando que estas aves, encontradas em áreas públicas, funcionam como reservatório de zoonoses, enfatizando que a capital do Peru, possui uma população de aproximadamente 8.900.000 (PERU TRAVEL, 2016), com características urbanas, de densidade demográfica e saneamento muito semelhante ao município do Rio de Janeiro.

Em outro estudo, com similaridades da pesquisa anterior, foi desenvolvido em Montreal, Canadá por Gabriele-Rivet et al. (2016), utilizando pombos em parques e áreas de grande circulação nesta cidade. Foi utilizado um total de 187 aves que foram capturadas e suas fezes analisadas para pesquisa de *Campylobacter jejuni*, onde foram diagnosticadas 9,1% de positividade. Os autores afirmaram que os pombos são potenciais fontes de disseminação do patógeno em áreas urbanas, além do fato de também eliminarem patógenos pelas suas fezes infectantes para outras espécies de aves de vida livre. Os pombos urbanos constituem um risco potencial para a saúde humana, devido a patógenos que são disseminados no ambiente através das fezes, sendo estes causadores de patogenicidade mais graves em indivíduos imunocomprometidos, crianças e idosos (BADIAGA et al., 2008; GABRIELE-RIVET et al., 2016). Embora Montreal possua um clima diferente e uma estrutura de



saneamento mais desenvolvida, sua densidade demográfica se assemelha ao Rio de Janeiro e a presença de parques públicos acaba atraindo moradores e turistas que oferecendo alimentação aos pombos, além de aumentar a sua população, interação indiretamente com suas fezes, principalmente devido a formação de aerossóis pelo ressecamento das mesmas.

#### 5.4. *Cryptosporidium* como um agente etiológico de zoonose

*Cryptosporidium* spp. é responsável por cerca de 6% dos casos de diarreia que atingem indivíduos imunocompetentes nos países em desenvolvimento (CHEN et al., 2002). *C. hominis* e *C. parvum* são os principais agentes causadores da criptosporidiose humana tanto em imunocompetentes como em imunocomprometidos, com sua prevalência variando em diferentes regiões do mundo. Análises epidemiológicas mostraram que *C. hominis* é mais prevalente nas Américas, Austrália e África, enquanto que *C. parvum* provoca infecções mais humanas na Europa, especialmente no Reino Unido. *C. meleagridis* até o momento, continua sendo a única espécie reconhecida por infectar duas classes de vertebrados (aves e mamíferos) (STENSVOLD et al., 2014), tendo sido associado como um patógeno emergente de humanos, e diagnosticado em diversas regiões. Na Costa do Marfim (BERRILLI et al., 2012); em Shanghai na China (FENG et al., 2012), na Índia (SHARMA et al., 2013); na Tailândia (GATEI et al., 2002) e no Peru (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2008). Porém, a infecção por *C. meleagridis* ocorre não só em pacientes HIV positivos, mas também na população imunocompetente. De fato, entre 16.883 casos investigados criptosporidiose entre 1985 e 2008 no Reino Unido, 131 casos de infecção por *C. meleagridis* foram identificados, principalmente em indivíduos imunocompetentes (LEONI et al., 2006; CHALMERS et al., 2009; ELWIN et al., 2012). Na Suécia, esta espécie é a terceira mais diagnosticada associada com criptosporidiose humana e representando cerca de 6% dos casos (INSULANDER et al., 2013). Além destes locais, ainda existem registros desta espécie de origem aviária em humanos em diversos outros países

Em pombos, *C. meleagridis* foi diagnosticada em apenas dois países do mundo: Tailândia e China. Na pesquisa realizada na Tailândia (KOOMPAPONG et al., 2014), *C. meleagridis* foi encontrado em 14,28% das amostras analisadas. Os autores enfatizaram que como os pombos são as aves mais disseminadas e encontradas no mundo, seu potencial como transmissor de doenças é mundial, e, além disso, foi ressaltado que as áreas utilizadas para obtenção das amostras fecais eram de grande circulação de moradores e turistas (parques e locais com presença de fontes de água) na capital do país, Bangcoc, aumentando o risco de transmissão do protozoário.

Na China, houve duas descrições do *C. meleagridis* em pombos, a primeira em 2011, e a outra 2015. Os autores, afirmaram que a ocorrência deste parasito em aves de estimação tem implicações importantes da saúde pública, especialmente para as crianças e idosos, que tem mais frequentemente contato com aves de estimação. Devido ao grande número de aves de estimação na China e do grande comércio que estas aves apresentam, tanto para o mercado interno como o externo (pelo menos, um milhão de aves de estimação por ano para os países do Sudeste Asiático) (WEI, 2003; LI et al., 2011; LI et al., 2015).

Chuah et al. (2016), desenvolveram uma pesquisa para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em águas de rios que abasteciam diversas regiões na Tailândia, que eram destinadas principalmente ao consumo humano. Estes autores obtiveram 52 amostras, coletadas em diversos pontos; no período mais seco do ano e diagnosticaram a presença de *Cryptosporidium* em 13,8% dessas amostras, enquanto no período chuvoso do ano 14,5%.

A contaminação fecal ambiental vem sendo bastante estudada para avaliar os principais patógenos e suas vias de disseminação e o potencial de risco a saúde pública. Neste

contexto, o gênero *Cryptosporidium* spp. apresenta a sua relevância na contaminação da água de consumo, águas residuais, alimentos e o solo principalmente por possuir a forma infectante resistente as adversidades ambientais (HONG et al., 2014). Em Madrid, na Espanha Dado et al. (2012) relataram que 6% dos solos de parques examinados, estavam contaminados por *Cryptosporidium* spp., indicando que as crianças ao brincarem nestes ambientes, podem ser infectadas pela ingestão acidental de solo contaminado.

A transmissão pelo consumo de água contaminada sejam aquelas tratadas ou não também é avaliada em diversas regiões. Em um estudo, conduzido em 66 estações de tratamento de água em 14 locais dos Estados Unidos e em uma província canadense, teve como resultado que 97% das amostras de água não tratada positivas para *Cryptosporidium* spp., já na água tratada, 22% das amostras (REZENDE et al., 2016).

O pombo doméstico (*Columba livia*) não é uma ave migratória, mas é capaz de disseminar patógenos no meio ambiente através das fezes, sejam estes causadores de danos à saúde animal ou humana. No Brasil, ainda são poucos os estudos realizados sobre o risco que esta ave representa quanto à disseminação de patógenos no ambiente e é ausente no que se refere ao diagnóstico de pombos infectados com *Cryptosporidium* spp.

Até o momento a relação do *Cryptosporidium* spp. com os pombos ainda é pouco estudada, sendo que dos oito trabalhos presentes na literatura desta temática, apenas em três as amostras fecais de pombos analisadas, eram de aves de vida livre. Neste estudo realizado, com amostras fecais de três regiões do município do Rio de Janeiro, duas espécies foram diagnosticadas, sendo que *C. meleagridis* pode apresentar o caráter zoonótico, dependendo do subtipo. Desta forma, conclui-se que esta pesquisa não deve ser negligenciada com o hospedeiro pombo doméstico, já que onde há água, alimentos e abrigo, haverá a sua presença e assim aumentando o risco de dispersão de patógenos na natureza.

## 6. CONCLUSÃO

- Através do diagnóstico parasitológico de amostras fecais de pombos (*Columba livia*) foi possível diagnosticar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp.
- Após a utilização de técnicas Nested-PCR e sequenciamento nas amostras que foram positivas na microscopia óptica para *Cryptosporidium* spp., utilizando como gene alvo o 18S, foi identificado duas espécies: *C. meleagridis* e *C. baileyi*.
- Das duas espécies diagnosticadas *C. meleagridis* (91,67%), apresentou-se em maior percentual de ocorrência neste estudo em comparação com *C. baileyi* (8,33%). Estes dados refletem preocupação em saúde pública, sendo que a primeira espécie pode apresentar potencial zoonótico.
- Este é o primeiro registro no Brasil de parasitismo por *Cryptosporidium* em pombos (*Columba livia*), assim como também o diagnóstico de duas espécies; contribuindo para traçar a epidemiologia molecular deste agente etiológico no país.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAL-FABEIRO, J.L.; MASIDE, X.; BELLO, X.; LLOVO, J.; BARTOLOME, C. Multilocus patterns of genetic variation across *Cryptosporidium* species suggest balancing selection at the gp60 locus. *Molecular Ecology*, v. 22, p. 4723–4732, 2013.
- ABBASSI, H.; DAMBRINE, G.; CHÉREL, Y.; COUDERT, F.; NACIRI, M. Interaction of Marek's disease virus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Avian Disease*, v. 44, n. 4, p. 776–789, 2000.
- ABE, N.; ISEKI, M. Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology Research*, v. 92, n. 6, p. 523–526, 2004.
- ABE, N. Genotype analysis of *Cryptosporidium meleagridis* isolates from humans in Japan. *Japan Journal of Infections Disease*, v. 63, n. 3, p. 214–215, 2010.
- ABE, N.; MAKINO, I. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels in Japan. *Parasitology Research*, v. 106, p. 14916–21497, 2010.
- ADANG, K.L.; ONIYE, S.J.; EZEALOR, A.U.; ABDU, P.A.; AJANUSI, O.J. Ectoparasites of Domestic Pigeon (*Columba livia domestica*, Linnaeus) in Zaria, Nigeria. *Reserch Journal Parasitology*, v. 3, p. 79–84, 2008.
- 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, n. 4, p. 1828–1832, 2003.
- AKIYOSHI, D.E.; TUMWINE, J.K.; BAKEERA-KITAKA, S.; TZIPORI, S. Subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from children in Uganda. *Journal of Parasitology*, v. 92, p. 1097–1100, 2006.
- ALMEIDA, J.A.; MARTINS, F.D.; NETO, J.M.; SANTOS, M.M.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; KURODA, E.K.; FREIRE, RL. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 24, n. 3, p. 303–308, 2015.
- AMBIENTE BRASIL. *Ambientes Urbanos: Pragas Urbanas*. Pombos (*Columba livia*). Disponível em: <[http://ambientes.ambientebrasil.com.br/urbano/pragas\\_urbanas/pombos\\_\(Columba\\_livia\).html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/urbano/pragas_urbanas/pombos_(Columba_livia).html)>. Acesso em: 10 de junho de 2016.
- AMORUSO, A.; FABBRIS, L.; MAZZA, M.; CARAVELLO, G. Estimation of Feral Pigeon (*Columba livia*) population size using a novel Superimposed Urban Strata (SUS) method. *Urban Ecosystems*, v. 17, p. 597–612, 2014.
- ANTUNES, R.G.; SIMÕES, D.C.; NAKAMURA, A.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, n. 4, p. 702–705, 2008.

ARAÚJO, A.J.U.S.; KANAMURA, H.Y.; ALMEIDA, M.A.; GOMES, A.H.S.; PINTO T.H.L.; 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, n. 3, p. 139–143, 2008.

ARROWOOD, M. J. Diagnosis. IN: FAYER, R. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC Press: Washington, p. 43-60, 1997.

ASANO, Y., KARASUDANI, T., OKUYAMA, M., TAKAMI, S., OSETO, M., INOUE, H., YAMAMOTO, K., AOKAGE, J., SAIKI, N., FUJIWARA, M., SHIRAISHI, M., UCHIDA, K., SAIKI, H., SUZUKI, M., YAMAMOTO, T., UDAKA, M., KAN, K., MATSUURA, S., KIMURA, M. An outbreak of gastroenteritis associated with *Cryptosporidium meleagridis* among high school students of dormitory in Ehime, Japan. *Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environment Science*, v. 9, p. 21–25, 2006.

ASSIS, D.C.; RESENDE, D.V.; CABRINE-SANTOS, M.; CORREIA, D.; OLIVEIRA-SILVA, M.B. - Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 55, n. 3, p. 149–54, 2013.

BADIAGA, S.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Preventing and controlling emerging and reemerging transmissible diseases in the homeless. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 9, p. 1353-1359, 2008.

BADPARVA, E.; EZATPOUR, B.; AZAMI, M.; BADPARVA, M. First report of birds infection by intestinal parasites in Khorramabad, west Iran. *Journal of Parasitology Diseases*, doi:10.1007/s12639-014-0427-5, 2014.

BAHRAMI, A.M.; MONFARED, A.L.; RAZMJOO, M. Pathological study of parasitism in racing pigeons: an indication of its effects on community health. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, p. 12364–12370, 2012.

BAINES, D.; NEWBORN, D.; RICHARDSON, M. Spread of *Cryptosporidium baileyi* in red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Veterinary Record*, v. 175, n. 6, p. 149–151, 2014.

BALDERRAMA-CARMONA, A.P.; GORTÁRES-MOROYOQUI, P.; ÁLVAREZ-VALENCIA, L.H.; CASTRO-ESPINOZA, L.; MONDACA-FERNÁNDEZ, I.; BALDERAS-CORTÉS, J.D.E.; CHAIDEZ-QUIROZ, C.; MEZA-MONTENEGRO, M.M. Occurrence and quantitative microbial risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in soil and air samples. *International Journal Infectious Diseases*, v. 26, p. 123–127, 2014.

BANGKOK. *Bangkok Information*. Disponível em: <<http://www.bangkok.com/information/#>>. Acesso em: 18 de junho de 2016.

- BANISH, D.M.; EL-BADRY, A.; KLINNERT, J.V.; IGNATIUS, R.; EL-DIB, N. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidia* by immunochromatographic assay in stool samples from patients living in the Greater Cairo Region, Egypt. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 31, p. 1251–1258, 2015.
- BAROUDI, D.; KHELEF, D.; GOUCEM, G.; ADJOU, K.T.; ADAMU, H.; ZHANG, H.; XIAO, L. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Veterinary Parasitology*, v. 196, n. 23, p. 334–340, 2013.
- BENCKE, G, A. *Pombos Domésticos: Sugestões para o controle em Escolas Públicas Estaduais de Porto Alegre*. Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 2007.
- BERRILLI, F.; D’ALFONSO, R.; GIANGASPERO, A.; MARANGI, M.; BRANDONISIO, O.; KABORE, Y.; GLE, C.; CIANFANELLI, C.; LAURO, R.; DI CAVE, D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Cote d’Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. *Transactions of Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, p. 191–195, 2012.
- BLACKBURN, B.G.; MAZUREK, J.M.; HLAVSA, M.; PARK, J.; TILLAPAW, M.; PARRISH, M.; SALEHI, E.; FRANKS, W.; KOCH, E.; SMITH, F.; XIAO, L.; ARROWOOD, M.; HILL, V.; DA SILVA, A.; JOHNSTON, S.; JONES, J.L. Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, p. 684–686, 2006.
- BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S.; GIAMBRONE, J.J.; SUNDERMANN, C.A.; HOERR, F.J. Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. *Poultry Science*, v. 66, n. 3, p. 442–449, 1987.
- 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. 25–28, 1991.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; NOORDAA, J. Rapid and simple Method for purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.
- BOUGIOUKLIS, P.A.; WERISSENBOCK, H.; WELLS, A.; MILLER, W.A.; PALMIERI, C.; SHIVAPRASAD, H.L. Otitis media associated with *Cryptosporidium baileyi* in a Saker falcon (*Falco cherrug*). *Journal of Comparative Pathology*, v. 148, n. 4, p. 419–423, 2013.
- BRANTLEY, R.K.; WILLIAMS, K.R.; SILVA, T.M.J.; SISTROM, M.; THIELMAN, N.M.; WARD, H.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. AIDS-associated diarrhea and wasting in northeast Brazil is associated with subtherapeutic plasma levels of antiretroviral medications and with both bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 7, n. 1, p. 16–22, 2003.

BUSHEN, O. Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R. C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; 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, n. 4, p. 378–384, 2007.

BYNUM, K.; EISEMANNY, J.D.; WEAVERZ, G.C.; YODER, C.A.; FAGERSTONEYY, K.A.; MILLER, L.A. Nicarbazin ovocontrol G bait reduces hatchability of eggs laid by resident Canada geese in Oregon. *Journal of Wildlife Management*, v. 71, n. 1, p. 135–143, 2007.

CABALLERO, M.; RIVERA, I.; JARA, L.M.; ULLOA-STANOJLOVIC, F.M.; SHIVA, C. Isolation and molecular identification of potentially pathogenic *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in feral pigeons from an urban area in the city of Lima, Peru. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 57, n. 5, p. 393–396, 2015.

CACCIO, S.M. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*, v. 47, p. 185–192, 2005.

CALABRESE, E.J.; BARNES, R.; STANEK, E.J.; PASTIDES, H.; GILBERT, C.E.; VENEMAN, P.; WANG, X.R.; LASZTITY, A.; KOSTECKI, P.T. How much soil do young children ingest: an epidemiologic study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 10, n. 2, p. 123–137, 1989.

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

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.

CAMPBELL, A.T.; ROBERTSON, L.J., SMITH, H.V. Effects of Preservatives on Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 12, p. 4361–4362, 1993.

CANO-TERRIZA, D.; GUERRA, R.; LECOLLINET, S.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; CABEZÓN, O.; ALMERÍA, S.; GARCÍA-BOCANEGRA, I. Epidemiological survey of zoonotic pathogens in feral pigeons (*Columba livia* var. *domestica*) and sympatric zoo species in Southern Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 43, p. 22–27, 2015.

CARDOZO, S.V.; 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, n. 3, p. 119–124, 2005.

CHALMERS, R.M. Advances in diagnosis: Is microscopy still the benchmark? IN: ORTEGA-PIERRES, M.G.; CACCIÒ, S.; FAYER, R.; MANK, T.; SMITH, H.; THOMPSON, R.C.A. (Eds). *Giardia and Cryptosporidium from molecules to disease*. Oxfordshire: CABI, p. 147–157, 2009.

CHALMERS, R.M.; FERGUSON, C.; CACCIÒ, S.; GASSER, R.B.; ABS EL-OSTA, Y.G.; HEIJNEN, L.; XIAO, L.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; SINCLAIR, M.; STEVENS, M. Direct comparison of selected methods for genetic categorization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *International Journal of Parasitology*, v. 35, p. 397–410, 2005.

CHALMERS, R.M.; ELWIN, K.; THOMAS, A.L.; GUY, E.C.; MASON, B. Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the etiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Euro Surveillance*, v. 14, n. 2, pii 19086, 2009.

CHECKLEY, W.; WHITE, A.C.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M.J.; CHALMERS, R.M.; CHEN, X.M.; FAYER, R.; GRIFFITHS, J.K.; GUERRANT, R.L.; HEDSTROM, L.; HUSTON, C.D.; KOTLOFF, K.L.; KANG, G.; MEAD, J.R.; MILLER, M.; PETRI, W.A.; PRIEST, J.W.; ROOS, D.S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R.C.; WARD, H.D.; VAN VOORHIS, W.A.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUP, E.R. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, p.85–94, 2015.

CHELLADURAI, J.J.; CLARK, M.E.; KVÁČ, M.; HOLUBOVÁ, N.; KHAN, E.; STENGER, B.L.; GIDDINGS, C.W.; MCEVOY, J. *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium avian* genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Parasitology Research*, v. 115, n. 5, p. 1901–1906, 2016.

CHEN, X.M.; KEITHLY, J.S.; PAYA, C.V.; LARUSSO, N.F. Cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine*, v. 346, p.1723–1731, 2002.

CHEN, Y.T. Present situation, investment benefit and market trends analysis of pigeon breeding industry in China. *China Poultry*, v. 34, p. 8–11, 2012.

CHUAH, C.J.; MUKHAIDIN, N.; CHOY, S.W.; SMITH, G.J.; MENDENHALL, I.H.; LIM, Y.H.; ZIEGLER, A.D. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the water resources of the Kuang River catchment, Northern Thailand. *Science of the Total Environment*, v. 562, p. 701–713, 2016.

CHVALA, S.; FRAGNER, K.; HACKL, R.; HESS, M.; WEISSENBOCK, H. *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser f. domestica*) detected by in-situ hybridization. *Journal of Comparative Pathology*, v.134, n. 2-3, p. 211–218, 2006.

COUTO, M.C.M.; SUDRE, A.P.; LIMA, M.F.; BOMFIM, T.C.B. Comparison of techniques for DNA extraction and agarose gel staining of DNA fragments using samples of *Cryptosporidium*. *Veterinarni Medicina*, v. 58, n. 10, p.535–542, 2013.



COKLIN, T.; UEHLINGER, F.D.; FARBER, J.M.; BARKEMA, H.W.; O'HANDLEY, R.M.; DIXON, B.R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, v. 160, n. 3-4, p. 323–326, 2009.

COLDWELL, L.; CALDOW, G.; HOLLIMAN, A.; MEARNES, R.; ERRINGTON, H.; GILES, M.; WILLOUGHBY, K.; WOOD A. *Cryptosporidium baileyi* in wild red grouse with 'bulgy eye'. *Veterinary Record*, v. 170, n. 23, p.603–604, 2012.

CUNHA, M.J.; CURY, M.C.; SANTÍN, M. Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds. *Parasitology Research*, v. 116, n. 2, p. 487–493., 2016.

CURRENT, W.L.; UPTON, S.J.; HAYNES, T.B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi*, n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) infecting chickens. *Journal of Protozoology*, v. 33, p. 289-296, 1986.

CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiological Reviews*, v.7, 325-358, 1991.

DADO, D.; IZQUIERDO, F.; VERA, O.; MONTOYA, A.; MATEO, M.; FENOY, S.; GALVÁN, A.L.; GARCÍA, S.; GARCIA, A.; ARÁNQUEZ, E.; DEL ÁQUILA, C.; MIRÓ, G. Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. *Zoonoses Public Health*, v. 59, n. 1, p. 23–28, 2012.

DANIELS, M.E.; SHRIVASTAVA, A.; SMITH, W.A.; SAHU, P.; ODAQIRI, M.; MISRA, P.R.; PANIGRAHI, P.; SUAR, M.; CLASEN, T.; JENKINS, M.W. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Humans, Domestic Animals, and Village Water Sources in Rural India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 3, p. 596–600, 2015.

DARABUS, G.; OLARIU, R. The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 6, n. 3, p. 225-228, 2003.

DAS, G.; CHANGKIJA, B.; SARKAR, S.; DAS, P. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* isolates in bovine population in Kolkata and characterization of new bovine genotypes. *Research Veterinary Science*, v. 91, p. 246–250, 2011.

DE MAN, H.; VAN DEN BERG, H.H.; LEENEN, E.J.; SCHIJVEN, J.F.; SCHETS, F.M.; VAN DER VLIET, J.C.; VAN KNAPEN, F.; RODA HUSMAN, A.M. Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater. *Water Research*, v. 48, p. 90–9, 2014.

DOBEIC, M.; PINTARIČ, Š.; VLAHOVIĆ, K.; DOVČ, A. Feral pigeon (*Columba livia*) population management in Ljubljana. *Veterinaski Arhiv*, v. 81, n. 2, p. 285–298, 2011.

DONELEY, R.J.T. Bacterial and parasitic diseases of parrots. *Veterinary Clinic North American Exotic Animals Practice*, v. 12, n. 3, p. 417–432, 2009.

- DOYLE, J.R.; BLAIS, J.M.; HOLMES, R.D.; WHITE, P.A. A soil ingestion pilot study of a population following a traditional lifestyle typical of rural or wilderness areas. *Science Total Environment*, v. 1, n. 424, p.110–120, 2012.
- DREELIN, E.A.; IVES, R.L.; MOLLOY, S.; ROSE, J.B. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Surface Water: A Case Study from Michigan, USA to Inform Management of Rural Water Systems. *International Journal Environment Research Public Health*, v. 11, p. 10480–10503, 2014.
- EBANI, V.V.; BERTELLONI, F.; MANI, P. Molecular survey on zoonotic tick-borne bacteria and chlamydiae in feral pigeons (*Columba livia domestica*). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 4, p. 324–327, 2016.
- EHSAN, A.M.; GEURDEN, T.; CASAERT, S.; PARVIN, S.M.; ISLAM, T.M.; AHMED, U.M.; LEVECKE, B.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Assessment of Zoonotic Transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* between Cattle and Humans in Rural Villages in Bangladesh. *PLoS ONE*, v. 10, n. 2, p. 245–254, 2015.
- ELADL, A.H.; HAMED, H.R.; KHALIL, M.R. Consequence of Cryptosporidiosis on the immune response of vaccinated broiler chickens against Newcastle disease and/or avian influenza. *Veterinary Research Communication*, v. 38, n.3, p.237–247, 2014.
- ELWIN, K.; HADFIELD, S.J.; ROBINSON, G.; CHALMERS, R.M. The epidemiology of sporadic human infections with unusual *Cryptosporidia* detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008. *Epidemiology and Infection*, v. 140, n. 4, p.673–683, 2012.
- FAYER, R.; UNGAR, B.L. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, v. 50, n. 4, p. 458-483, 1986.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12-13, p. 1305–1322, 2000.
- FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology*, v. 126, p. 37–56, 2004.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, v. 145, n. 3-4, p. 260-266, 2007.
- FAYER, R. General biology. IN: FAYER, R., XIAO, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, second edition. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1–42, 2008.
- FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 90–97, 2010.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; DARGATZ, D. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Veterinary Parasitology*, v. 170, n. 3-4, p. 187–192, 2010.

FEDERAÇÃO COLUMBÓFILA BRASILEIRA. Pesquisa Técnica - *Artigos*. Ribeirão Preto, SP. Disponível em: <<http://www.fcb.org.br/index.php>>. Acesso em: 08 de março de 2016.

FENG, Y.; ALDERISIO, K.A.; YANG WET, A.L. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Applied Environmental Microbiology*, v.73, p. 6475–6483, 2007.

FENG, Y.; LI, N.; DUAN, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n.1, p. 153–157, 2009.

FENG, Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Experimental Parasitology*, v. 124, n. 1, p. 128-37, 2010.

FENG, Y.; LAL, A.A.; LI, N.; XIAO, L. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Experimental Parasitology*, v. 127, p.238–242, 2011.

FENG, Y.; WANG, L.; DUAN, L.; GOMEZ-PUERTA, L.A.; ZHANG, L.; ZHAO, X.; HU, J.; ZHANG, N.; XIAO, L. Extended outbreak of cryptosporidiosis in a pediatric hospital, China. *Emerging Infectious Disease*, v. 8, p. 312–314, 2012.

FERGUSON, C.; DEERE, D.; SINCLAIR, M.; CHALMERS, R. M.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; XIAO, L.; RYAN, U.; GASSER, R.; EL-OSTA, Y. A.; STEVENS, M. Meeting report: Application of genotyping methods to assess risks from *Cryptosporidium* in watersheds. *Environmental Health Perspectives*, v. 114, n. 3, p. 430–434, 2006.

FERRI, M.; FERRARESI, M.; GELATI, A.; ZANNETTI, G.; UBALDI, A.; CONTIERO, B.; BURSI, E. Use of nicarbazine in the control of urban pigeon colonies in Italy in 1990-2007. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, v. 29, p. 91–102, 2009.

FREITAS, D.A.; PAIVA, A.L.; FILHO, J.A.; PEREIRA CABRAL, J.J.; ROCHA, F.J. Occurrence of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. And other pathogenic intestinal parasites in the Beberibe River in the State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 1, 220–223, 2015.

GABRIELE-RIVET, V.; FAIRBROTHER, J.; TREMBLAY, D.; HAREL, J.; CÔTÉ, N.; ARSENAULT, J. Prevalence and risk factors for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Coxiella burnetii*, and Newcastle disease virus in feral pigeons (*Columba livia*) in public areas of Montreal, Canada. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 80, p. 81–85, 2016.

GASSER, R. B. Molecular tools – advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology*, v. 136, n. 1, p. 69–89, 2006.

GATEI, W.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; WAYWA, D.; ASHFORD, R.W.; BAILEY, J.W.; GREENSILL, J.; BEECHING, N.J.; HART, C.A. Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Annuary Tropical Medical Parasitology*, v. 96, p. 797–802, 2002.

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, n. 4, p. 1458–1462, 2003.

GERTLER, M.; DURR, M.; RENNER, P.; POPPERT, S.; ASKAR, M.; BREIDENBACH, J.; FRANK, C.; PREUßEL, K.; SCHIELKE, A.; WERBER, D.; CHALMERS, R.; ROBINSON, G.; FEUERPFEL, I.; TANNICH, E.; GROGER, C.; STARK, K.; WILKING, H. Outbreak of *Cryptosporidium hominis* following river flooding in the city of Halle (Saale), Germany, August 2013. *BMC Infectious Diseases*, v. 22, n. 15, p. 88–97, 2015.

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

GIBBS, D.; BARNES, E.; COX, J. *Pigeons and Doves: A guide to pigeons and doves of the world*. New Haven, Connecticut, United States: Yale University Press, 2001.

GIBNEY, K.B.; O'TOOLE, J.; SINCLAIR, M.; LEDER, K. Disease burden of selected gastrointestinal pathogens in Australia. *International Journal of infectious diseases*, v. 28, p. 176–85, 2010.

GIUNCHI, D.; BALDACCINI, N.E.; SBRAGIA, G.; SOLDATINI, C. On the use of pharmacological sterilisation to control feral pigeon populations. *Wildlife Reserch*, v. 34, n. 4, p. 306–318, 2007.

GLABERMAN, S.; SULAIMAN, I.M.; BERN, C.; LIMOR, J.; PENG, M.M.; MORGAN, U.; GILMAN, R.; LAL, A.A.; XIAO, L. A multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium meleagridis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 48, p. 19–22, 2001.

GLABERMAN, S.; MOORE, J.E.; LOWERY, C.J.; CHALMERS, R.M.; SULAIMAN, I.; ELWIN, K.; ROONET, P.J.; MILLAR, B.C.; DOOLEY, J.S.; LAL, A.A.; XIAO, L. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 6, p. 631–633, 2002.

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

GODOI, F.S.L. *Toxoplasma gondii*: diagnostico da infecção experimental e natural em pombos (*Columba livia*) por tecnicas sorológicas, biológicas e moleculares 2009. 66f.

Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

GOMES, R.S.; BOMFIM, T.C.; HUBER, F. Infecção natural por *Cryptosporidium* sp. em aves domésticas comercializadas em mercados municipais do Estado do Rio de Janeiro. *Ciência Rural*, v. 39, n. 7, p. 2128–2134, 2009.

GOMES, R.S.; HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T.C. *Cryptosporidium* spp. parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries, and pet shops. *Parasitology Research*, v. 110, n. 4, p. 1363–1370, 2012.

GONÇALVES, E.M.; SILVA, A.J.; EDUARDO, M.B.; UEMURA, I.H.; MOURA, I.N.; CASTILHO, V.L.; CORBETT, C.E. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. *Clinics*, v. 61, n. 2, p. 119–126, 2006.

GOÑI, P.; ALMAGRO-NIEVAS, D.; CIELOSZYK, J.; LÓBEZ, S.; NAVARRO-MARÍ, J.M.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, J. Cryptosporidiosis outbreak in a child day-care center caused by an unusual *Cryptosporidium hominis* subtype. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 33, n. 10, p. 651–655, 2015.

GOODWIN, M.A. Diarrhea associated with 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.; RESURRECCION, R.S.; SMITH, J.A. Respiratory coccidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) among northern Georgia broilers in one company. *Avian Diseases*, v. 40, p. 572–575, 1996.

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

GRACZYK, T.K.; MAJEWSKA, A.C.; SCHWAB, K.J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends in Parasitology*, v. 24, n. 2, p. 55–59, 2008.

GU, Y.; WANG, X.; ZHOU, C. LI, P.; XU, Q.; ZHAO, C.; LIU, W.; XU, W. Investigation on *Cryptosporidium* infections in wild animals in a zoo in Anhui Province. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 47, n. 3, p. 846–854, 2016.

GUY, J.S.; LEVY, M.G.; LEY, D.H.; BARNES, H.J.; GERIG, T.M. Interaction of reovirus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Avian Diseases*, v. 32, n. 3, p. 381–390, 1988.

HAAG-WACKERNAGEL, D.; MOCH, H. Health hazards posed by feral pigeons. *The Journal of Infection*, v. 48, p. 307–313, 2004.

HAJDUŠEK, O.; DITRICH, O.; ŠLAPETA, J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, v. 122, n. 3, p. 183-192, 2004.

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.

HAMIDINEJAT, H.; JALALI, M.H.; JAFARI, R.A.; NOURMOHAMMADI, K. Molecular determination and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in fecal and respiratory samples of industrial poultry in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 1, p. 517–520, 2014.

HAO, Y.X.; YANG, J.M.; HE, C.; LIU, Q.; McALLISTER, T.A. Reduced serologic response to avian influenza vaccine in specific-pathogen-free chicks inoculated with *Cryptosporidium baileyi*. *Avian Diseases*, v. 52, n. 4, p. 690–693, 2008.

HARDER-LAURIDSEN, N.M.; KUHN, K.G.; ERICHSEN, A.C.; MOLBAK, K.; ETHELBERG, S. Gastrointestinal illness among triathletes swimming in non-polluted versus polluted seawater affected by heavy rainfall, Denmark, 2010–2011. *PLoS One*, v.8, n.11, e78371, 2013.

HARLIN, R.W. Pigeons. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 24, 157–173, 1994.

HAWASH, Y.; DORGHAM, L.S.H.; AL-HAZMI, A.S.; AL-GHAMDI, M.S. Prevalence of *Cryptosporidium*-associated diarrhea in a high altitude-community of Saudi Arabia detected by conventional and molecular methods. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 52, n. 5, p. 479–485, 2014.

HEINE, J. A simple technic for the demonstration of cryptosporidia in feces. *Zentralbl Veterinarmed Bulletin*, v. 29, n. 4, p. 324–327, 1982.

HELMY, Y.A.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; NOCKLER, K.; ZESSIN, K.H. Frequencies and spatial distributions of *Cryptosporidium* in livestock animals and children in the Ismailia province of Egypt. *Epidemiology and Infection*, v. 143, n. 6, p. 1208–1218, 2015.

HIKOSAKA, K.; NAKAI, Y. A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitology Research*, v. 97, n. 5, p. 373–379, 2005.

HINNEY, B.; EDERER, C.; STENGL, C.; WILDING, K.; STRKOLCOVA, G.; HARL, J.; FLECHL, E.; FUEHRER, H.; JOACHIM, A. Enteric protozoa of cats and their zoonotic potential—a field study from Austria. *Parasitology Research*, v. 114, p. 2003–2006, 2015.

HOLSBACK, L.; CARDOSO, M.; FAGNANI, R.; PATELLI, T.H. Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, p. 302–306, 2013.

HONG, S.; KIM, K.; YOON, S.; PARK, WY.; SIM, S.; YU, JR. Detection of *Cryptosporidium parvum* in Environmental Soil and Vegetables. *Journal Korean Medicine Science*, v. 29, n. 10, p. 1367–1371, 2014.

HORNOK, S.; BITAY, Z.; SZÉLL, Z.; VARGA, I. Assessment of maternal immunity to *Cryptosporidium baileyi* in chickens. *Veterinary Parasitology*, v. 79, n. 3, p. 203–212, 1998.

HUANG, K.; AKIYOSHI, D.E.; FENG, X.; TZIPORI, S. Development of patent infection in immunosuppressed C57Bl/6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *The Journal of Parasitology*, v. 89, n. 3, p. 620–622, 2003.

HUBER, F.; BOMFIM, T.C.; GOMES, R.S. Comparação da eficiência da coloração pelo método da safranina a quente e da técnica de centrifugo-flutuação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 2, p. 81–84, 2004.

HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T.C.; TEIXEIRA, K.R.; BELLO, A.R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 150, p. 65–74, 2007.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Instrução Normativa n.141, 9 de dezembro de 2006. *Diário Oficial da União, Brasília*, 20 de dezembro de 2006.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Anuário estatístico*. Brasília: IBGE, 2016. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 13 de julho de 2016.

IGNATIUS, R.; KLEMM, T.; ZANDER, S.; GAHUTU, J.B.; KIMMIG, P.; MOCKENHAUPT, F.P.; REGNATH, T. Highly specific detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in human stool samples by undemanding and inexpensive phase contrast microscopy. *Parasitology Research*, v. 115, p. 1229–1234, 2016.

INSULANDER, M.; SILVERLAS, C.; LEBBAD, M.; KARLSSON, L.; MATTSSON, J.; SVENUNGSSON, B. Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. *Epidemiology and Infections*, v. 141, p. 1009–1020, 2013.

IQBAL, A.; GOLDFARB, D.M.; SLINGER, R.; DIXON, B.R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in diarrhoeic patients in the Qikiqtani Region, Nunavut, Canada. *International Journal of Circumpolar Health*, v. 19, n. 74, p. 277–283, 2015.

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, n. 1, p. 452–458, 2004.

JIANG, Y.; REN, J.; YUAN, Z.; LIU, A.; ZHAO, H.; LIU, H.; CHU, L.; PAN, W.; CAO, J.; LIN, Y.; SHEN, Y. *Cryptosporidium andersoni* as a novel predominant *Cryptosporidium* species in outpatients with diarrhea in Jiangsu Province, China. *BMC Infectious Diseases*, v. 25, n. 14, 555–560, 2014.

JULIAN, T.R. Environmental transmission of diarrheal pathogens in low and middle income countries. *Environmental Science: Processes & Impacts*, in press, 2016. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2016/em/c6em00222f>>. Acesso em: 10 de julho de 2016.

KAWATA, K. Water and other environmental interventions--the minimum investment concept. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 31, p. 2114–2123, 1978.

KIANG, K.M.; SCHEFTEL, J.M.; LEANO, F.T.; TAYLOR, C.M.; BELLE-ISLE, P.A.; CEBELINSKI, E.A.; DANILA, R.; SMITH, K.E. Recurrent outbreaks of cryptosporidiosis associated with calves among students at an educational farm programme, Minnesota, 2003. *Epidemiology and Infection*, v. 134, p. 878–886, 2006.

KILANI, R.T.; WENMAN, W.M. Geographical variation in 18S rRNA gene sequence of *Cryptosporidium parvum*. *International Journal for Parasitology*, v. 24, n. 2, p. 303–306, 1994.

KIMBELL, L.M.; MILLER, D.L.; CHAVEZ, W.; ALTMAN, N. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism- based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 65, n. 12, p. 5345–5349, 1999.

KIMURA, A.; SUZUKI, Y.; MATSUI, T. Identification of the *Cryptosporidium* isolate from chickens in Japan by sequence analyses. *The Journal of Medical Science*, v. 66, n. 7, p. 879–881, 2004.

KOKEN, E.; DARNAULT, C.J.; JACOBSON, A.R.; POWELSON, D.; HENDRICKSON, W. Quantification of *Cryptosporidium parvum* in natural soil matrices and soil solutions using Qpcr. *Journal of Microbiological Methods*, v. 92, n. 2, p. 135–44, 2013.

KOOMPAPONG, K.; MORI, H.; THAMMASONTHIJARERN, N.; PRASERTBUN, R.; PINTONG, A.R.; POPRUK, S.; ROJEKITTIKHUN, W.; CHAISIRI, K.; SUKTHANA, Y.; MAHITTIKORN, A. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. *Parasite*, v. 21, n. 52, p. 1–7, 2014.

KOTLOFF, K.L.; NATARO, J.P.; BLACKWELDER, W.C.; NASRIN, D.; FARAG, T.H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S.O.; SUR D.; BREIMAN, R.F. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, v. 382, p. 209–222, 2013.



- KOYAMA, Y.; SATOH, M.; MAEKAWA, K.; HIKOSAKA, K.; NAKAI, Y. Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. *Veterinary Parasitology*, v. 30, n. 130 (3-4), p. 323–326, 2005.
- KUNDZEWICZ, Z.W.; PINSKWAR, I.; BRAKENRIDGE G.B. Large floods in Europe, 1985–2009. *Hydrological Science Journal*, v. 58, p. 1–7, 2013.
- KVÁČ, M.; MCEVOY, J.; STENGER, B.; CLARK, M. Cryptosporidiosis in other vertebrates. IN: CACCIÒ, S.M.; WIDMER, G. (eds) *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer Vienna, Vienna, Austria, p. 237–323, 2014.
- KVÁČ, M.; HAVRDOVÁ, N.; HLÁSKOVÁ, L.; DANKOVÁ, T.; KANDERA, J.; JEZKOVÁ, J.; VITOVEC, J.; SAK, B.; ORTEGA, Y.; XIAO, L.; MODRÝ, D.; CHELLADURAI, J.R.; PRANTLOVÁ, V.; McEVOY, J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and Biological Evidence of Cryptic Species within Gastric *Cryptosporidium* of Mammals. *PLoS One*, v. 11, n. 1, e0147090, 2016.
- LANATA, C.F.; FISCHER-WALKER, C.L.; OLASCOAGA, A.C.; TORRES, C.X.; ARYEE, M.J.; BLACK, R.E. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*, v. 8, e72788, 2013.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.
- LAXER, M.A.; TIMBLIN, B.K.; PATEL, R.J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.46, n. 6, p. 688–694, 1991.
- LEE, S.C.; NGUI, R.; TAN, T.K.; ROSLAN, M.A.; ITHOI, I.; LIM, Y.A. Aquatic biomonitoring of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in peninsular Malaysia. *Environmental Science Pollution Research International*, v. 21, n. 1, p. 445–453, 2014.
- LEONI, F.; AMAR, C.; NICHOLS, G.; PEDRAZA-DIAZ, S.; MCLAUCHLIN, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, p. 703–707, 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.; HUNTER, L.; CORBETT, W.; BARNES, H.J. Experimental cryptosporidiosis and infectious bursal disease virus infection of specific-pathogen-free chickens. *Avian Diseases*, v. 32, p. 803–811, 1988.
- LEY, D.H.; MORESCO, A.; FRASCA, S.J. Conjunctivitis, rhinitis, and sinusitis in cliff swallows (*Petrochelidon pyrrhonota*) found in association with *Mycoplasma sturni* infection and cryptosporidiosis. *Avian Pathology*, v. 41, n. 4, p. 395–401, 2012.

- LI, N.; XIAO, L.; WANG, L.; ZHAO, X.; DUAN, L.; GUO, M.; LIU, L.; FENG, Y. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 9, e1809, 2012.
- LI, J.; LIN, X.; ZHANG, L.; QI, N.; LIAO, S.; LV, M.; WU, C.; SUN, M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in Guangdong Province, Southern China. *Parasitology Research*, v. 114, n. 6, p. 2237–2241, 2015.
- LI, Q.; LI, L.; TAO, W.; JIANG1, Y.; WAN, Q.; LIN, Y.; LI, W. Molecular investigation of *Cryptosporidium* in small caged pets in northeast China: host specificity and zoonotic implications. *Parasitology Research*, v. 115, p. 2905–2911, 2016.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; SUNDERMANN, C.A.; HOERR, F.J.; ERNEST, J.A. Experimental *Cryptosporidium* infection in chickens. *American Journal of Veterinary Research*, v. 47, p. 876–879, 1986.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; SUNDERMANN, C.A.; HOERR, F.J.; GIAMBRONE, J.J. *Cryptosporidium baileyi*: effects of intra-abdominal and intravenous inoculation of oocysts on infectivity and site of development in broiler chickens. *Avian Diseases*, n. 31, v. 4, p. 841-843, 1987.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; SUNDERMANN, C.A. Morphometric comparison of the oocysts of *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* from birds. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, v. 56, p. 91–92, 1989a.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; SUNDERMAN, C.A.; HOERR, F.J. Experimental infections in domestic ducks with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. *Avian Diseases*, v. 33, n. 1, p. 69-73, 1989b.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; HOERR, F.J. Small intestinal cryptosporidiosis in cockatiels associated with *Cryptosporidium baileyi*-like oocysts. *Avian Diseases*, v. 34, n.3, 791–793, 1990.
- LIU, X.; XIE, N.; LI, W.; ZHOU, Z.; ZHONG, Z.; SHEN, L. SUIZHONG, C.; XINGMING, Y.; YANCHUAN, H.; WEIGANG, C.; PENG, G. Emergence of *Cryptosporidium hominis* Monkey Genotype II and Novel Subtype Family Ik in the Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*) in China. *PLoS One*, v. 28, n. 10. e0141450, 2015.
- LUCCA, P.; GASPARI, E.N.; BOZZOLI, L.M.; FUNADA, M.R.; SILVA, S.O.S.; IULIANO, W.; SOARES, R.M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from an urban area of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 51, n. 6, p. 341-343, 2009.

MÁCA, O.; PAVLÁSEK, I. First finding of spontaneous infections with *Cryptosporidium baileyi* and *C. meleagridis* in the red-legged partridge *Alectoris rufa* from an aviary in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, v. 209, p.164–168, 2015.

MÁCA, O.; PAVLÁSEK, I. *Cryptosporidium* infections of ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*) from an intensive artificial breeding programme in the Czech Republic. *Parasitology Research*, v. 115, p. 1915–1922, 2016.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, v. 21, n. 331 (3), p. 161-167, 1994.

MAGNINO, S.; HAAG-WACKERNAGEL, D.; GEIGENFEIND, I.; HELMECKE, S.; DOVC, A.; PRUKNER-RADOVCIC, E.; RESIDBEGOVIĆ, E.; ILIESKIG, V.; LAROUCAU, K.; DONATI, M.; MARTINOV, S.; KALETA, E.F. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. *Veterinary Microbiology*, v. 135, n. 1-2, p. 54–67, 2009.

MAHAT, M. S. *Cryptosporidium* among bird handlers in Zoo Negara Kuala Lumpur. In: LIM, Y.A.L.; VYTHILINGAM, I. (Eds.). *Parasites and their vectors*. New York: Springer, 2006, p. 77-102.

MAKINO, I.; ABE, N.; REAVILL, D.R. *Cryptosporidium avian* genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). *Avian Diseases*, v. 54, p. 1102–1107, 2010.

MASON, R.W.; HARTLEY, W.J. Respiratory cryptosporidiosis in a peacock chick. *Avian Diseases*, v. 24, n. 3, p. 771–776, 1980.

MASON, R.W. Conjunctival cryptosporidiosis in a duck. *Avian Diseases*, v. 30, n. 3, p. 598–600, 1986.

McKERR, C.; ADAK, G.K.; NICHOLS, G.; GORTON, R.; CHALMERS, R.M.; KAFATOS, G.; COSFORD, P.; CHARLETT, A.; REACHER, M.; POLLOCK, K.G.; ALEXANDER, C.L.; MORTON, S. An Outbreak of *Cryptosporidium parvum* across England & Scotland Associated with Consumption of Fresh Pre-Cut Salad Leaves, May 2012. *PLoS One*, v. 10, n. 5, e0125955, 2015.

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, n. 1, p. 37–42, 1999.

MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M.; SANTOS, M.M.; GENNARI, S.M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *Journal of Parasitology*, v. 92, n. 3, p. 623–626, 2006.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 4, p. 197–204, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria MS nº 2914 de 12/12/2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

MIRZAGHAVAMI, M.; SADRAEI, J.; FOROUZANDEH, M. Detection of *Cryptosporidium* spp. in free ranging animals of Tehran, Iran. *Journal of Parasitology Diseases*, v. 40, n. 4, p. 1528–1531, 2016.

MOLINA-LÓPEZ, R.A.; RAMIS, A.; MARTÍN-VÁZQUEZ, S.; GÓMEZ-COUSO, H.; ARES-MAZÁS, E.; CACCIÒ, S.M.; LEIVA, M.; DARWICH, L. *Cryptosporidium baileyi* infection associated with an outbreak of ocular and respiratory disease in otus owls (*Otus scops*) in a rehabilitation centre. *Avian Pathology*, v. 39, p. 171–176, 2010.

MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. PCR detection of *Cryptosporidium*: The way forward? *Parasitology Today*, v. 14, n. 6, p. 241–245, 1998.

MORGAN, U.M.; BUDDLE, J.R.; ARMSON, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C. Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. *Australian Veterinary Journal*, v. 77, n. 1, p. 44–447, 1999.

MORGAN, U.M.; XIAO, L.; MONIS, P.; SULAIMAN, I.; PAVLASEK, I.; BLAGBURN, B.; OLSON, M.; UPTON, S.J.; KHRAMTSOV, N.V.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. *Parasitology*, v. 120, p. 457–464, 2000.

MORGAN, U.M.; MONIS, P.T.; XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.; O'DONOGHUE, P.; GASSER, R.; MURRAY, A.; FAYER, R.; BLAGBURN, B.L.; LAL, A.A.; THOMPSON, R.C.A. Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from avians. *International Journal of Parasitology*, v. 31, p. 289–296, 2001.

MOSS, J.A.; GORDY, J.; SNYDER, R.A. Effective Concentration and Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and the *Microsporidia* from Environmental Matrices. *Journal of Pathogens*, p. 1–10, 2014.

MOUSA, N.; ABDEL-RAZIK, A.; EL-NAHAS, H.; EL-SHAZLY, A.; ABDELAZIZ, M.; NABIH, M.; HAMED, M.; EISSA, M.; EFFAT, N.; ELDARS, W. Cryptosporidiosis in patients with diarrhea and chronic liver diseases. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 12, p.1584–1590, 2014.

MUR, D, R. La Paloma casera silvestre. IN 3º *Simpósio Internacional de Controle Epidemiológico de Vetores*, Buenos Aires, 1999.

MUTHUSAMY, D.; RAO, S.S.; RAMANI, S.; MONICA, B.; BANERJEE, I.; ABRAHAM, O.C.; MATHAI, D.C.; PRIMROSE, B.; MULIYIL, J.; WANKE, C.A.; WARD, H.D.;

- KANG, G. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 632–634, 2006.
- NAKAMURA, A.A.; SIMÕES, D.C.; ANTUNES, R.G.; DA SILVA, D.C.; MEIRELES, M.V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 166, p. 476–551, 2009.
- NAKAMURA, A.A.; HOMEM, C.G.; SILVA, A.M.; MEIRELES, M.V. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. *Veterinary Parasitology*, v. 205, p. 7–13, 2014.
- NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infections in birds — a review. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 24, p. 253–267, 2015.
- NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 7548–7553, 2006.
- NGUYEN, S.T.; FUKUDA, Y.; TADA, C.; HUYNH, V.V.; NGUYEN, D.T.; NAKAI, Y. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in ostriches (*Struthio camelus*) on a farm in central Vietnam. *Experimental Parasitology*, v. 133, p. 8–11, 2013.
- NILI, H.; ASASI, K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathology*, v. 31, n. 3, p. 247–252, 2002.
- NUNES, V.F.P. Pombos urbanos: o desafio de controle. *Biológico*, v. 65, n. 1-2, p. 89–92, 2003.
- O'DONOGHUE, P.J.; THAM, V.L.; DE SARAM, W.G.; PAULL, K.L.; McDERMOTT, S. *Cryptosporidium* infections in birds and mammals and attempted cross-transmission studies. *Veterinary Parasitology*, v. 26, n. 1-2, p. 1–11, 1987.
- O'DONOUGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 2, p. 139–195, 1995.
- OIE (Office International des Epizooties). Cryptosporidiosis Chapter. IN: *Terrestrial Manual*. 1192–1211, 2008.
- OLIVEIRA, F.C.; EDERLI, N.B.; EDERLI, B.B.; ALBUQUERQUE, M.C.; DOS SANTOS, M.D. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) em avestruzes, *Struthio camelus* L., 1758 (Aves, Struthionidae) criadas nas regiões norte e baixada litorânea do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 322–325, 2008.
- OZKUL, I.A.; AYDIN, Y. Small-intestinal cryptosporidiosis in a young pigeon. *Avian Pathology*, v. 23, n. 2, p. 369–372, 1994.

PADORI, E.S.M. *Manual: Manejo de Pombos Urbanos*. Prefeitura do Município de São Paulo. Secretaria Municipal de Saude. Centro de Controle de Zoonoses. Divisão Técnica de Controle de Vetores e Roedores de Culicídeos. Disponível em: <[http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/vigilancia\\_saude/ccz/0028/PombosUrbanos.pdf](http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/vigilancia_saude/ccz/0028/PombosUrbanos.pdf)>. Acesso em: 15 de junho de 2016.

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

PAOLETTI, B.; TRAVERSA, D.; IORIO, R.; BERARDINIS, A.; BARTOLINI, R.; SALINI, R.; CESARE, A. Zoonotic parasites in feces and fur of stray and private dogs from Italy. *Parasitology Researches*, v. 114, p. 2135–2141, 2015.

PAPINI, R.; GIRIVETTO, M.; MARANGI, M.; MANCIANTI, F.; GIANGASPERO, A. Endoparasite infections in pet and zoo birds in Italy. *The Scientific World Journal Article*, p. 1–9, 2012.

PARSONS, M.B.; GILLESPIE, T.R.; LONDORF, E.V.; TRAVIS, D.; LIPENDE, I.; GILAGIZA, B.; KAMENYA, S.; PINTEA, L.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G.M. Global Positioning System Data-Loggers: A Tool to Quantify Fine-Scale Movement of Domestic Animals to Evaluate Potential for Zoonotic Transmission to an Endangered Wildlife Population. *PLoS One*, v. 9, n. 11, e110984, 2014.

PAVLÁSEK, I. The black-headed gull (*Larus ridibundus* L.), a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Veterinarni Medicina*, v. 38, n. 10, p. 629-638, 1993.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum specificity and the environment. *Klinika Mikrobiologie a Infekcni Lekarstvi*, v. 3, p. 290–301, 1999.

PAVLÁSEK I. Findings of cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. *Veterinářství*, v. 51 p. 103–108, 2001.

PENG, M.M.; WILSON, M.L.; HOLLAND, R.E.; MESHNICK, S.R.; LAL, A.A.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitology Research*, v. 90, n. 3, p. 175-180, 2003.

PERALTA, R.H.; VELÁSQUEZ, J.N.; CUNHA, F.S.; PANTANO, M.L.; SODRÉ, F.C.; SILVA, S.; ASTUDILLO, O.G.; PERALTA, J.M.; CARNEVALE, S. Genetic diversity of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 1, p. 30-36, 2016.

PERU TRAVEL. *Sobre Peru – Lima*. Disponível em: <<http://www.peru.travel/pt-br/>>. Acesso em: 08 de julho de 2016.

- PREISER, G.; PREISER, L.; MADEO, L. An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. *Journal of American Collegie Health* v. 51, n. 5, p. 213–215, 2003.
- PRYSTAJECKY, N.; HUCK, P.M.; SCHREIER, H.; ISAAC-RENTON, J.L. Assessment of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. as a microbial source tracking tool for surface water: application in a mixed-use watershed. *Applied Environmental Microbiology*, v. 80, n. 8, p. 2328–2336, 2014.
- PUTIGNANI, L.; MENICHELLA, D. Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 10, 1–39, 2010.
- QI, M.; WANG, R.; NING, C.; LI, X.; ZHANG, L.; JIAN, F.; SUN, Y.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Experimental Parasitology*, v. 128, p. 336–340, 2011.
- QUAH, J.X.; AMBU, S.; LIM, Y.A.; MAHDY, M.A.; MAK, J.W. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* from avian hosts. *Parasitology*, v. 138, p. 573–577, 2011.
- RADFAR, M.H.; ASL, E.N.; SEGHINSARA, H.R.; DEHAGHI, M.M.; FATHI, S. Biodiversity and prevalence of parasites of domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in a selected semiarid zone of South Khorasan, Iran. *Tropical Animal Health and Production*, v. 44, n. 2, p. 225–229, 2012.
- RAMIREZ, N. E.; SREEVATSAN, S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Veterinary Parasitology*, v. 136, n. 1, p. 201–213, 2006.
- RANDALL, C.J.; BYGRAVE, A.C.; McLACHLAN, I.; BICKNELL, S.R. Retinal detachment in the pheasant (*Phasianus colchicus*). *Avian Pathology*, v. 15, n. 4, p. 687–695, 1986.
- RANJBAR, R.; BAGHAEI, K.; NAZEMALHOSSEINI E.M. Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. among patients with gastrointestinal complaints. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, v. 9, n. 4, p. 301-307, 2016.
- RAVICH, M.L.; REAVILL, D.R.R.; HESS, L.; CHILDRESS, A.L.; WELLEHAN JR., J.F.X. Gastrointestinal Cryptosporidiosis in Captive Psittacine Birds in the United States: A Case Review. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 28, n. 4, p. 297–303. 2014.
- REBOREDO-FERNÁNDEZ, A.; ARES-MAZÁS, E.; CACCIÒ, S.M.; GÓMEZ-COUSO, H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology*, v. 142, n. 7, p. 917–925, 2015.
- REZENDE, N.C.; BEZERRA, C.L.; ALMEIDA, J.J.; FERNANDES, T.U.; LUZ, K.G. Secondary transmission of cryptosporidiosis associated with well water consumption: two

case studies. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 2, p. 260–262, 2016.

RHEE, J.K.; KIM, H.C.; PARK, B.K. Effect of *Cryptosporidium baileyi* infection on antibody response to sRBC in chickens. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 36, n. 1, p. 33–36, 1998.

RICHARDSON, A.J.; FRANKENBERG, R.A.; BUCK, A.C.; SELKON, J.B.; COLBOURNE, J.S.; PARSONS, J.W.; MAYON-WHITE, R.T. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. *Epidemiology Infectious*, v. 107, n. 3, p. 485–495, 1991.

ROHELA, M.; LIM, Y.A.; JAMAIAH, I.; KHADIJAH, P.Y.; LAANG, S.T.; NAZRI, M.H.; NURULHUDA, Z. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in Wrinkled Hornbill and other birds in the Kuala Lumpur National Zoo. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 36, n. 4, p. 34–40, 2005.

ROLANDO, R.F.; SILVA, S.; PERALTA, R.H.; SILVA, A.J.; CUNHA, F.S.; BELLO, A.R.; PERALTA, J.M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 476–479, 2012.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I.M.; MONIS, P.; LAL, A.A.; FAYER, R. PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *The Journal of Parasitology*, v. 89, n. 4, p. 809–813, 2003a.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A.A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied Environment Microbiology*, v. 69, p. 4302–4307, 2003b.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology*, v. 124, n. 1, p. 113–120, 2010.

RYAN, U.; POWER, M. *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology*, v. 139, n. 13, p. 1673–1688, 2012.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, v. 141, p. 1667–1685, 2014.

RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. *International Journal Parasitology*, v. 45, n. 6, p. 367–373, 2015.

SACCHI, R.; GENTILLI, A.; RAZZETTI, E.; BARBIERI, F. Effects of building features on density and flock distribution of feral pigeons *Columba livia* var. *domestica* in an urban environment. *Canadian Journal of Zoology*, v. 80, p. 48–54, 2002.

SAK, B.; PETRZELKOVA, K.J.; KVETONOVA, D.; MYNAROVA, A.; POMAJBIKOVA, K.; MODRY, D.; CRANFIELD, M.R.; MUDAKIKWA, A.; KVAC, M.



Diversity of *Microsporidia*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in Mountain Gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Volcanoes National Park, Rwanda. *PLoS ONE* v. 9, n. 11, e109751, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

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 Poultry Science*, v. 7, p. 1136–2117, 2005.

SCHULLER, V.P. *Pesquisa de protozoários e helmintos de interesse médico presentes nas excretas de pombo-doméstico (Columba livia domestica)*. 2004. 103f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SCORZA, A. V.; BREWER, M. M.; LAPPIN, M. R. Polymerase Chain Reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. In cat feces. *Journal of Parasitology*, v. 89, n. 2, p. 423–426, 2003.

SCOTT, T.R. Our current understanding of humoral immunity of poultry. *Poultry Science*, v. 83, n. 4, p.574–579, 2004.

SENAR, J.C.; CARRILLO, J.; ARROYO, L.; MONTALVO, T.; PERACHO, V. Estima de la abundancia de palomas (*Columba livia* var.) de la ciudad de Barcelona y valoración de la efectividad del control por eliminación de individuos. *Arxius de Miscellània Zoològica*, v. 7, p. 62–71, 2009.

SEVÁ, A.P.; FUNADA, M.R.; RICHTZENHAIN, L.J.; GUIMARÃES, M.B.; SOUZA, S.O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J.A.; DUARTE, V.V.; SOARES, R.M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 175, p. 276–332, 2011.

SHARMA, P., SHARMA, A.; SEHGAL, R.; MALLA, N.; KHURANA, S. Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *International Journal of Infectious Disease*, v. 17, p. 601–605, 2013.

SHEATHER, A.L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. *Journal of Comparative Therapy*, v. 36, p. 266-275, 1923.

SHIRLEY, D.A.; MOONAH, S.N.; KOTLOFF, K.L. Burden of disease from Cryptosporidiosis. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 25, n. 5, p. 555–563, 2012.

SICK, H. *Ornitologia Brasileira*, Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVA, A.S.; ZANETTE, R.A.; LARA, V.M.; GRESSLER, L.T.; CARREGARO, A.B.; SANTURIO, J.M.; MONTEIRO, S.G. Gastrointestinal parasites of owls (Strigiformes) kept in captivity in the Southern region of Brazil. *Parasitology Research*, v. 104, p. 485–487, 2009.

- SILVA, D.C.; HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; TEIXEIRA, W.F.; PERRI, S.H.; MEIRELES, M.V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. *Parasitology Research*, v. 107, p. 2716–3277, 2010.
- SILVA, R.C.R.; MACIEL, W.C.; TEIXEIRA, R.S.C.; SALLES, R.P.R. O pombo (*Columba livia*) como agente carreador de *Salmonella* spp. e as implicações em saúde pública. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v. 81, n. 2, p. 189–194, 2014.
- SILVERLAS, C.; MATTSSON, J.G.; INSULANDER, M.; LEBBAD, M. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. *International Journal of Parasitology*, v. 42, n. 11, p. 963–967, 2012.
- SILVERLAS, C.; BLANCO-PENEDO, I. *Cryptosporidium* spp. in calves and cows from organic and conventional dairy herds. *Epidemiology and Infection*, v. 141, n. 3, p. 529–539, 2013.
- SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *International Journal of Parasitology*, v. 43, n. 12-13, p. 957–970, 2013.
- SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, v. 65, p. 262–266, 1955.
- SMITH, K.E.; STENZEL, S.A.; BENDER, J.B.; WAGSTROM, E.; SODERLUND, D.; LEANO, F.T.; TAYLOR, C.M.; BELLE-ISLE, P.A.; DANILA, R. Outbreaks of enteric infections caused by multiple pathogens associated with calves at a farm day camp. *Pediatric Infectious Diseases Journal*, v. 23, p. 1098–1104, 2004.
- SMITH, H. V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; McLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R.C. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 4, p. 160–167, 2006.
- SMITH, H. Diagnostics. IN: FAYER, R.; XIAO, L. (Eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Florida: CRC Press, p. 173–208, 2007.
- SNYDER, D.B.; CURRENT, W.L.; RUSSEK-CHEN, E.; GORHAM, S.L.; MALLINSON, E.T.; MARQUARDT, W.W.; SAVAGE, P.K. Serologic incidence of *Cryptosporidium* in Delarva broiler flocks. *Poultry Science*, v. 67, p. 730–735, 1988.
- SOLTANE, R.; GUYOT, K.; DEI-CAS, E.; AYADI, A. *Cryptosporidium parvum* (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in calves: results of a longitudinal study in a dairy farm in Sfax, Tunisia. *Parasite*, v. 14, n. 4, p. 309-312, 2007.
- SRETER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds — A review. *Veterinary Parasitology*, v. 87, p. 261–279, 2000.
- STANEK, E.J.; CALABRESE, E.J.; BARNES, R.; PEKOW, P. Soil ingestion in adults--results of a second pilot study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 36, n. 3, p. 249–257, 1997.

- STENSVOLD, C.R.; BESER, J.; AXÉN, C.; LEBBAD, M. High Applicability of a Novel Method for gp60-Based Subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 7, p. 2311–2319, 2014.
- SULAIMAN, I.M.; HIRA, P.R.; ZHOU, L.; AL-ALI, F.M.; AL-SHELAKHI, F.A.; SHWEIKI, H.M.; IQBAL, J.; KHALID, N.; XIAO, L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 2805–2809, 2005.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 5: Molecular evolutionary genetics analyses using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.
- TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*, v. 24, n. 4, p. 184–189, 2008.
- UKWAH, B.N.; EZEONU, I.M.; EZEONU, C.T.; ROELLIG, D.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and subtypes in diarrheal children and HIV-infected persons in Ebonyi and Nsukka, Nigeria. *Journal of Infectious in Developing Countries*, v. 28, n. 11 (2), p. 173-179, 2017.
- UPTON, S.J; CURRENT, W.L. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of Parasitology*, v. 71, n. 5, p. 625–629, 1985.
- VALADARES, I, T. *Pombos - da história de Cher Ami à realidade portuária*. Salvador, 2004.
- VAN ZEELAND, Y.R.; SCHOEMAKER, N.J.; KIK, M.J.; VAN DER GIESSEND, J.W. Upper respiratory tract infection caused by *Cryptosporidium baileyi* in three mixed-bred falcons (*Falco rusticolus* x *Falco cherrug*). *Avian Diseases*, v. 52, n 2, p. 357–363, 2008.
- VERMEULEN, E.T.; ASHWORTH, D.L.; ELDRIDGE, M.D.; POWER, M.L. Diversity of *Cryptosporidium* in brush-tailed rock-wallabies (*Petrogale penicillata*) managed within a species recovery programme. *International Journal for Parasitology, Parasites and Wildlife*, v. 4, n. 2, 190-196, 2015.
- WAGNER, E.G.; LANOIX, J.N. Excreta Disposal for Rural Areas and Small Communities. *Monograph Series – World Health Organization*, v. 31, p. 1–132, 1958.
- WANG, R.; JIAN, F.; SUN, Y.; HU, Q.; ZHU, J.; WANG, F.; NING, C.; ZHANG, L.; XIAO L. Large-scale survey of *Cryptosporidium* spp. in chickens and Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Henan, China: prevalence and molecular characterization. *Avian Pathology*, v. 39, n. 6, p. 447-451, 2010.
- WANG, R.; QI, M.; JINGJING, Z.; SUN, D.; NING, C.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; XIAO, L. Prevalence of *Cryptosporidium baileyi* in ostriches (*Struthio camelus*) in Zhengzhou, China. *Veterinary Parasitology*, v. 10, n. 175 (1-2), p. 151–154, 2011.

- WANG, R.; WANG, F.; ZHAO, J.; QI, M.; NING, C.; ZHANG, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Henan, China: molecular characterization and public health significance. *Veterinary Parasitology*, v. 187, p. 534–537, 2012.
- WANG, L.; ZHANG, H.; ZHAO, X.; ZHANG, L.; ZHANG, G.; GUO, M.; LIU, L.; FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic *Cryptosporidium* species and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in HIV-positive patients on antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 557–563, 2013.
- WANG, L.; XUE, X.; LI, J.; ZHOU, Q.; YU, Y.; DU, A. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. *Parasite*, v. 21, p. 36–44, 2014.
- WARD, L.A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 41, n. 1-2, p. 37–42, 2001.
- WEI, X.H. Pet birds breeding: low cost and high profit. *Shandong Agriculture: Financial Resources*, v. 3, p. 9–15, 2003.
- WIDMER, G.; LIN, L.; KAPUR, V.; FENG, X.; ABRAHAMSEN, M. S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 1081–1090, 2002.
- YANG, Y.; ZHOU, Y.B.; XIAO, P.L.; SHI, Y.; CHEN, Y.; LIANG, S.; YIHUO, W.L.; SONG, X.X.; JIANG, Q.W. Prevalence of and risk factors associated with *Cryptosporidium* infection in a underdeveloped rural Community of southwest China. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 6, n. 1, p. 2-10, 2017.
- XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J.; FAYER, R.; LAL, A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 4, p. 1578–1583, 1999a.
- XIAO, L.; 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. *American Society for Microbiology*, v. 65, n. 8, p. 3386–3391, 1999b.
- XIAO, L.; MORGAN, U. M.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* systematics and Implications for Public Health. *Parasitology Today*. v. 16, n. 7, p. 297-295, 2000.
- XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R.H.; LAL, A.A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal Infection Diseases*, v. 183, p. 492–497, 2001.

- XIAO, L.; BERN, C.; ARROWOOD, M.; SULAIMAN, I.; ZHOU, L.; KAWAI, V.; VIVAR, A.; LAL, A.A.; GILMAN, R.H. Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *Journal of Infectious Disease*, v. 185, p. 1846–1848, 2002.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Review*, v. 17, p. 72–97, 2004a.
- XIAO, L.; LAL, A.A.; JINAG, J. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* oocysts in water by PCR-RFLP. *Methods in Molecular Biology*, v. 268, p. 163–176, 2004b.
- XIAO, L.; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion Infectious Disease*, v. 17, p. 483–490, 2004c.
- XIAO, L.; RYAN, U.M. Molecular epidemiology. IN: FAYER, R.; XIAO, L. (Eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Florida: CRC Press, p. 119–172, 2007.
- XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal Parasitology*, v. 38, n. 11, p. 1239–1255, 2008.
- XIAO, L.; FENG Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 309–323, 2008.
- XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 80–89, 2010.
- XIAO, S.; AN, W.; CHEN, Z.; ZHANG, D.; YU, J.; YANG, M. The burden of drinking water-associated cryptosporidiosis in China: the large contribution of the immunodeficient population identified by quantitative microbial risk assessment. *Water Research*, v. 46, n. 13, p. 4272–4280, 2012.
- XIAO, G.; QIU, Z.; QI, J.; CHEN, J.A.; LIU, F.; LIU, W.; LUO, J.; SHU, W. Occurrence and potential health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the Three Gorges Reservoir, China. *Water Research*, v. 47, n. 7, p. 2431–2445, 2013.
- ZAHEDI, A.; PAPANINI, A.; JIAN, F.; ROBERTSON, I.; RYAN, U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. *International Journal Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 5, n. 1, p. 88–109, 2016.
- ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, v. 101, n. 1, p. 215–230, 2001.
- ZHANG, W.; YANG, F.; LIU, A.; WANG, R.; ZHANG, L.; SHEN, Y.; CAO, J.; LING, H. Prevalence and genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. In pre-weaned and post-weaned piglets in Heilongjiang Province, China. *PLoS One*, v. 8, n. 7, e67564, 2013.

ZHOU, L.; KASSA, H.; TISCHLER, M.L.; XIAO, L. Host-Adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada Geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology*. v. 70, n. 7, p. 4211–4215, 2004.

ZILBERMAN, A.; ZIMMELS, Y.; STAROSVETSKY, J.; ZUCKERMAN, U.; ARMON, R. A two-phase separation method for recovery of *Cryptosporidium* oocysts from soil samples. *Water Air Soil Pollution*, v. 203, p. 325–334, 2009.