

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

DISSERTAÇÃO

**“*Cryptosporidium* GENÓTIPO AVIAN III DIAGNOSTICADO EM AVES CRIADAS
EM CATIVEIRO NO RIO DE JANEIRO”**

RICARDO SILVA NOVAES

2016



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

**“*Cryptosporidium* GENÓTIPO AVIAN III DIAGNOSTICADO EM AVES CRIADAS
EM CATIVEIRO NO RIO DE JANEIRO”**

RICARDO SILVA NOVAES

Sob a Orientação da Professora
Teresa Cristina Bergamo do Bomfim

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

Seropédica, RJ

Março de 2016

598.098153

N935c

T

Novaes, Ricardo Silva, 1973-

Cryptosporidium genótipo Avian III
diagnosticado em aves criadas em cativeiro no
Rio de Janeiro / Ricardo Silva Novaes - 2016.
84 f.: il.

Orientador: Teresa Cristina Bergamo do
Bomfim.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 67-81.

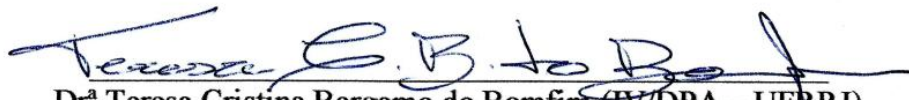
1. Ave - Rio de Janeiro (RJ) - Teses. 2. Ave
- Criação - Rio de Janeiro (RJ) - Teses. 3.
Cryptosporidium - Teses. 4. Diagnóstico
molecular - Teses. I. Bomfim, Teresa Cristina
Bergamo do. II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

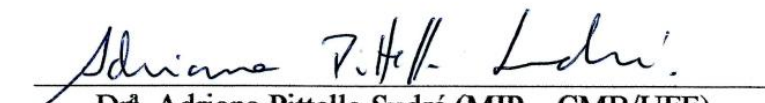
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**


RICARDO SILVA NOVAES


Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Dissertação Aprovada em 28/03/2016.


Dr^a. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim (IV/DPA – UFRRJ)
(Orientadora)


Dr^a. Adriana Pittella Sudré (MIP – CMB/UFF)


Dr. Valmir Lourentino Silva (ENSP – FIOCRUZ/RJ)


Dr^a. Daniela Leles de Sousa (MIP – CMB/UFF)

RESUMO

NOVAES, Ricardo Silva. *Cryptosporidium* genótipo Avian III diagnosticado em aves criadas em cativeiro no Rio de Janeiro. 2016. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal. Rio de Janeiro, Brasil, 2016.

Atualmente, apenas três espécies de *Cryptosporidium* são reconhecidas como válidas tendo como hospedeiros as aves, sendo estas, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium galli*. Em adição têm sido relatados 13 genótipos com status de espécies desconhecidas, sendo estes os genótipos Avian I-VI, o genótipo pato preto, o genótipo da galinhola da Eurásia, genótipos de gansos I-V. O trabalho teve por objetivos: diagnosticar microscopicamente a presença de *Cryptosporidium* em aves, provenientes de um criadouro comercial, localizado na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro; caracterizando genotipicamente espécies e/ou genótipos do gênero de *Cryptosporidium* e realizar o sequenciamento e análises filogenéticas, comparando com as sequencias obtidas com aquelas sequencias depositadas no GenBank. Como metodologia foram coletadas amostras fecais de aves silvestres criadas em cativeiro, totalizando 85 amostras, sendo 48 da família Psittacidae e 37 da Ramphastidae. Inicialmente foi realizada a pesquisa de oocistos *Cryptosporidium* sp., para tal, as fezes foram processadas através da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar e avaliadas microscopicamente. No diagnóstico microscópico, somente 24.32 % das amostras da família Ramphastidae apresentaram-se positivas. Nestas amostras, foi realizada a extração de DNA utilizando metodologias para o diagnóstico molecular tendo como alvo o 18S, posteriormente, foram realizados o sequenciamento e análise filogenética. Neste estudo, foi diagnosticado o genótipo de *Cryptosporidium* Avian III, apresentando-se mais estreitamente relacionado às espécies gástricas. Sendo o primeiro registro de *Cryptosporidium* genótipo Avian III na ordem Piciformes e na família Ramphastidae, onde três espécies de hospedeiros (*Ramphastus toco*, *Ramphastus tucanus* e *Pteroglossus bailloni*) foram positivos para o agente etiológico.

Palavras-chave: Aves silvestres, Ramphastidae, Psittacidae, *Cryptosporidium*, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

NOVAES, Ricardo Silva. *Cryptosporidium* genotype Avian III diagnosed in birds raised in captivity in Rio de Janeiro. 2016. 84p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Rural Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Veterinary Medicine, Department of Parasitology Animal. Rio de Janeiro, Brazil, 2016.

Currently, only three species of *Cryptosporidium* are recognized as valid as hosts by birds, which are *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium galli*. *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium galli*. In addition 13 genotypes have been reported with unknown status of species, such as Avian I-VI genotypes, the black duck genotype, woodcock genotype from Eurasia, geese genotypes I-V. The study aimed to: diagnose microscopically the presence of *Cryptosporidium* in birds, from a commercial hatchery, located in the west area of the city of Rio de Janeiro; featuring genotypically species and/or *Cryptosporidium* gender genotypes and perform the sequencing and phylogenetic analysis, comparing the sequences obtained with those sequences deposited in GenBank. As for methodology, fecal samples from wild birds bred in captivity were collected, totaling 85 samples, 48 of the Psittacidae family and 37 of Ramphastidae. First survey was carried out of oocysts *Cryptosporidium* sp. For this, the feces were processed by centrifugation technique and floating in saturated sugar solution and evaluated microscopically. In the microscopic diagnosis, only 24.32% of Ramphastidae family samples were positive. In these samples, DNA extraction was performed using methodologies for the molecular diagnosis targeting the 18S. Later were performed the sequencing and phylogenetic analysis. In this study, it was diagnosed *Cryptosporidium* Avian III genotype, which presented more closely related to gastric species. This was the first record of *Cryptosporidium* Avian III genotype in order Piciforms and Ramphastidae family, where three host species (*Ramphastus toco*, *Ramphastus tucanus* and *Pteroglossus bailloni*) were positive for the etiologic agent.

Key words: Wild birds, Ramphastidae, Psittacidae, *Cryptosporidium*, molecular diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem do ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*, demonstrando todas as fases endógenas no epitélio intestinal (Modificado de CHEN et al., 2002). 09
- Figura 2.** Imagem geral do fundo das instalações das aves com o plástico no fundo para as coletas das amostras fecais. 35
- Figura 3.** Imagem das instalações das aves representantes da família Ramphastidae. 35
- Figura 4.** Imagem das instalações das aves representantes da família Psittacidae. 36
- Figura 5.** 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 aves da família Ramphastidae de um criadouro localizado no Rio de Janeiro(— = 10 µm). 44
- Figura 6.** Imagem de aves de vida livre representantes da ordem Columbiformes, família Columbidae (A e B = *Patagioenas picazuro* - Pombão, asa branca, C= *Columbina* (○), C= um exemplar da família Psittacidae (Δ) que comumente são observadas no entorno e no interior das instalações das aves do estudo. 46
- Figura 7.** Espécies da família Ramphastidae analisadas neste estudo: A= *Ramphastus toco* (Tucano toco), B= *Ramphastus tucanus* (Tucano grande de papo branco), C= *Ramphastus dicolorus* (Tucano de bico verde), D= *Pteroglossus bailloni* (Araçari banana) e E= *Selenidera maculirostris* (Araçari poca). 49
- Figura 8.** Espécies da família Psittacidae analisadas neste estudo: A= *Psittacus eritachus* (Exótica) (Papagaio do Congo), B= *Ecletus roratus* (Exótica) (Papagaio ecletus), C= *Ara macao* (Arara Macau), D= *Ara ararauna* (Arara canindé), E= *Amazona aestiva* (Papagaio verdadeiro), F= *Pionites leucogaster* (Marianinha da cabeça amarela). 50
- Figura 9.** Amplificação pela Nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* sp. provenientes de M = marcador de peso molecular, C+ = controle positivo (*C. parvum*) e C - = controle negativo. 54
- Figura 10.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes da três espécies de tucanos evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.), tamanho da sequencia utilizada para comparação: 652pb. 55
- Figura 11.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes 59

da três espécies de tucanos comparando com sequências de *Cryptosporidium* genótipo Avian III, evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.).

Figura12. Relação genética entre os isolados de *Cryptosporidium* sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 633pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura - 2 parâmetros com análise de "bootstrap com 1000 réplicas. As sequências obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo da família Rhamphastidae (T1, T4, T6, T7, e T9 = *Rhamphastus toco*; T2 e T3 = *Ramphastus tucanus*; T8 = *Pteroglossus bailloni*).

61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> utilizando amostras fecais.	14
Tabela 2. Lista dos genes alvos com as técnicas moleculares utilizadas no diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> , com o tipo de ensaio e principal uso da sua amplificação.	20
Tabela 3. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> e genótipos identificados na classe das aves, de acordo com as ordens e sítios de localização da infecção, confirmados por análise molecular.	28
Tabela 4. Número total de amostras por espécies da família Psittacidae e seus diagnóstico parasitológico, utilizando a técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar.	48
Tabela 5. Número total de amostras por espécies da família Rhamphastidae e seus diagnóstico parasitológico, utilizando a técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar.	48
Tabela 6. Tamanho da sequência obtidas após análise da qualidade dos cromatogramas de acordo com as espécies de hospedeiros.	54
Tabela 7. Sequências obtidas do GenBank de <i>Cryptosporidium</i> sp. do Genótipo Avian III utilizadas como comparação das sequências obtidas neste estudo, com as suas respectivas similaridades.	58

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Espécie de *Cryptosporidium* consideradas como válidas, confirmadas por análises moleculares, destacando o hospedeiro de origem e relato de infecção humano. **10**
- Quadro 2.** Sequências utilizadas para o gene alvo 18S, foram comparadas com as obtidos no estudo para a construção da árvore filogenética. **41**

LISTA DE ABREVIACOES

IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
IUCN	<i>“International Union for Conservation of Nature” – União Internacional para a Conservao da Natureza.</i>
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservao da Biodiversidade.
AIDS	<i>“Acquired Immune Deficiency Syndrome” – Sindrome da Imunodeficiência Adquirida.</i>
RNA	Ácido Ribonucleico.
DNA	Ácido Dexossirribonucleico.
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal.
rDNA	Ácido Dexossirribonucleico Ribossomal.
SSUrRNA	Subunidade menor do ácido ribonucleico..
PCR	“Polimerase Chain Reaction” – Reao em Cadeia da Polimerase.
ND	Não Definido.
sp.	Espécie.
Spp.	Espécies.
m	Metro.
mL	Mililitro.
g/mL	Gramas por mililitro.
µM	Micromol.
mM	Milimol.
C	Celsius.
pb	Pares de Base.
M	Marcador de Peso Molecular.
C+	Controle Positivo Bovino.
C-	Controle Negativo.
°	Graus.
xg	“vezes a força da gravidade”.
%	Por cento.
<	Menor que

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Criação de animais silvestres no Brasil.	03
2.2 Aves da família Ramphastidae.	04
2.3 Aves da família Psittacidae.	05
2.4 Disseminação da Criptosporidiose através da comercialização de aves.	06
2.5 Taxonomia das espécies e genótipos do gênero <i>Cryptosporidium</i> .	08
2.6 Diagnóstico da criptosporidiose.	13
2.6.1 Diagnóstico através da microscopia.	14
2.6.2 Diagnóstico por ensaio imunoenzimático.	16
2.6.3 Diagnóstico através da ferramentas moleculares.	17
2.7 Espécies de <i>Cryptosporidium</i> parasitando aves.	19
2.7.1 <i>Cryptosporidium meleagridis</i> – Slavin, 1955.	21
2.7.2 <i>Cryptosporidium baileyi</i> – Current, Upton and Haynes, 1986.	22
2.7.3 <i>Cryptosporidium galli</i> – Pavlasek, 1999.	24
2.8 Genótipos de <i>Cryptosporidium</i> parasitando aves.	25
2.8.1 Genótipos Avian I – VI.	25
2.8.2 Genótipo da Galinhola Euroasiática.	26
2.8.3 Genótipo Pato Preto.	27
2.8.4 Genótipo Ganso I – V.	27
2.9 Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> em aves.	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Local e procedimentos de coleta das amostras fecais.	34
3.2 Descrição do criatório.	34
3.3 Processamento das amostras fecais e diagnóstico microscópico.	37
3.4 Extração do DNA.	38
3.5 Reação da PCR Primária e Nested PCR para o Gene Alvo 18S.	38
3.6 Sequenciamento e Análise Filogenética.	39
3.6.1 Purificação dos produtos obtidos da Nested-PCR e Sequenciamento.	39
3.6.2 Análise do sequenciamento.	40
3.6.3 Análises filogenéticas.	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Diagnóstico microscópico de <i>Cryptosporidium</i> em aves das famílias Ramphastidae e Psittacidae.	43
4.2 Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> em aves da família Ramphastidae e Psittacidae.	47
4.3 Diagnóstico Molecular: PCR primária e Nested-PCR.	53
4.4 Análise das sequências e Filogenia.	53
6. CONCLUSÃO	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
7. ANEXOS	82

1. INTRODUÇÃO

O contínuo aumento da introdução de animais silvestres como animais de companhia, tem preocupado tanto os órgãos ambientais quanto os setores de saúde pública, isto porque esses animais podem hospedar uma variabilidade de patógenos que são pouco estudados, promovendo a chamada “poluição patogênica”, a qual tem ocasionado surtos de enfermidades e inclusive de caráter zoonótico (SCHLOEGEL et al., 2005). Dentre esses animais, tem se dado destaque a várias espécies de aves, tanto as silvestres quanto as exóticas que estão sendo criadas legalmente e destinadas como animais de companhia e para ornamentação, principalmente por serem dóceis e pela sua beleza promovida pela coloração de algumas estruturas córneas, penas e plumagem.

Na natureza, esses animais vivem em grandes áreas e têm conseqüentemente, uma baixa resistência genética contra infecções parasitárias por causa da pequena concentração de animais expostos ao patógeno. Quando são mantidos em cativeiro ou em zoológicos, algumas infecções podem agravar e representarem ameaça de espécies, causando súbitos e inesperados declínios de exemplares.

As infecções parasitárias têm sido sempre um problema em animais que são normalmente mantidos em cativeiro. Estas podem se disseminar entre animais na própria instalação, por estarem em contato próximo com outros indivíduos que podem ser da mesma espécie ou de espécies diferentes, ou entre estes animais do cativeiro e animais de vida livre, que muitas das vezes vivem no entorno das instalações ou até mesmos se aproximam das mesmas em busca de alimentos.

As aves podem ser acometidas por uma variedade de endoparasitos e nem sempre os parasitos encontrados em necropsias são os causadores do óbito. Os danos causados ao hospedeiro e sintomatologia dependem da virulência, intensidade da infecção e do estado geral do animal. O grau de virulência de parasitos pode variar de acordo com o tipo de práticas de manejo, profilaxia e administração de tratamento.

As criações intensivas de animais produzem condições que facilitam a propagação de parasitos gastrointestinais; como estresse, o que pode causar debilidade imunológica, além disso, o estado nutricional dos animais em cativeiro que pode melhorar ou diminuir sua resistência às infecções. Outro fator é que animais silvestres e exóticos são transportados para o mercado interno, em particular para o interior do domicílio principalmente como animal de

companhia, podendo gerar problemas de saúde tanto para o animal quanto para a população humana onde estará inserido.

É importante identificar e controlar as infecções parasitárias capazes de produzir lesões em aves cativas, no entanto, apesar de haver registro na literatura em medicina aviária, pouco tem sido documentado sobre a epidemiologia de parasitos em aves que serão utilizadas como animais de estimação e ornamentação, principalmente com relação à criptosporidiose.

Uma atenção especial deve ser dada às espécies de *Cryptosporidium*, devido o seu possível envolvimento em saúde pública. Até o momento, três espécies são consideradas como válidas parasitando aves (*Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baylei* e *Cryptosporidium galli*) e 13 genótipos como possíveis agentes da criptosporidiose aviária. Tanto as espécies quanto os genótipos, apresentam a capacidade de infectar várias espécies de aves pertencentes a várias ordens.

As espécies *C. baylei* e *C. galli*, não apresentam importância em saúde pública, mas *C. meleagridis* é considerada como uma espécie generalista com uma ampla variedade de hospedeiros, prontamente transmissível entre os mamíferos e aves, sendo a terceira espécie do gênero *Cryptosporidium* mais comumente parasitando seres humanos, desta forma apresentando caráter zoonótico.

Portanto, devido à escassez de dados no Brasil e principalmente no Rio de Janeiro referente ao estudo de *Cryptosporidium*, tendo o foco aves criadas em cativeiro, o presente estudo teve por objetivos: diagnosticar microscopicamente a presença de *Cryptosporidium* em duas famílias de aves: Ramphastidae e Psittacidae, provenientes de um criadouro comercial legalizado localizado na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro; Caracterizar genotipicamente espécies e/ou genótipos do gênero de *Cryptosporidium* e realizar o sequenciamento e análises filogenéticas, comparando com as sequências obtidas com aquelas sequências depositadas no GenBank.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criação de animais silvestres no Brasil

No Brasil, os animais silvestres são definidos como “aqueles pertencentes às espécies nativas, migratórias e quaisquer outras, aquáticas ou terrestres, que tenham a sua vida ou parte ocorrendo naturalmente dentro dos limites do Território Brasileiro e suas águas jurisdicionais” (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, 2005).

A manutenção de animais silvestres em cativeiro domiciliar como animal de estimação, em sua maioria não legalizada, tem sido bastante comum no Brasil, embora seja considerado crime contra a fauna brasileira (IBAMA, 2006).

A manutenção de um animal de companhia pode estar associada tanto a benefícios físicos como emocionais para os seus proprietários. A ligação entre humanos e animais é reconhecida há muitos anos, tendo sido largamente aceita que os animais de companhia trazem estabilidade emocional, amor e continuidade à vida, e alguns estudos indicam que os “pets” podem ter uma influência positiva na qualidade de vida (SPENCER, 1992).

Apesar dos animais de estimação aumentar substancialmente a qualidade de vida dos seres humanos, existe também a preocupação de constituírem riscos à sua saúde, pois podem albergar uma série de patógenos de caráter zoonótico (BAHR, MORAIS, 2001; HEMSWORTH, PFIZER, 2006).

Existem muitas espécies da classe das aves que estão sendo utilizadas como animais de estimação, algumas são criadas em gaiolas, outras em viveiros e até mesmo soltas. Um dos maiores problemas no diagnóstico de infecções aviárias é que a maioria das doenças não apresenta sintomatologia clínica (TURNER, 1987). A maioria das doenças aviárias não são perigosas, mas os proprietários de aves devem ser alertados acerca das mesmas à procurarem auxílio médico veterinário, quando necessário (JACOB et al., 2005).

Algumas medidas de prevenção de zoonose incluem manter rígido controle da higiene nas instalações, evitando o contato principalmente, com excrementos das aves sem uso de luvas de borracha, lavar e desinfetar as mãos e braços após ter tido contato com aves, não levar a mão à boca e ter assistência veterinária constante (CUBAS, 2006; NASPHV, 2004). O comportamento e as ações dos humanos estão significativamente relacionados ao risco de infecção.

2.2 Aves da família Ramphastidae

Aves da família Ramphastidae, ordem Piciformes, são vulgarmente denominados de tucanos, araçaris e saripocas. Esta Família é composta por cinco gêneros (*Aulacorhynchus*, *Andigena*, *Selenidera*, *Pteroglossus* e *Ramphastos*), sendo estes intimamente relacionados, compondo 34 espécies e 78 subespécies (SHORT, HORNE, 2001). Possuem pouca resistência para voos a longa distância, não apresentam hábitos migratórios, porém, dentro de sua região, estão sempre em deslocamento acompanhando a sazonalidade de frutificação das árvores.

Nesse grupo encontram-se aves arborícolas, tipicamente de florestas, a maior quantidade de espécie pode ser observada nas florestas do oeste amazônico, onde se concentram sete espécies (HAFFER, 1974; HOFLING, 1995). Os representantes desta família são facilmente reconhecidos devido a seus longos bicos (5 a 23 cm) achatados lateralmente e com tômias serrilhadas, apresentam um exuberante colorido e de áreas nuas em torno dos olhos. O bico apesar de resistente é bem leve devido aos ossos esponjosos de seu interior que são entremeados por cavidades pneumáticas que também servem de caixa de ressonância e dispersor de calor, por ser muito vascularizado. Possuem as clavículas separadas, sem formar a fúrcula. Tem o palato totalmente fechado (tipo desmognato) e língua fina, longa e queratinizada. São frutívoros, complementando sua dieta predando pequenos vertebrados e ninhegos de outras aves (SHORT, HORNE, 2001; CUBAS, 2006; HOFLING, 1995).

Contrabalançam o peso do corpo com a cauda longa e o auxílio de dedos robustos em disposição zigodáctila (dedos dois e três para frente e o um e quatro, para trás). Dormem com o bico escondido sob as asas e a cauda dobrada sobre o dorso, cobrindo a cabeça. Vivem em bandos no topo das florestas, cerrados e caatinga de todo o país, são consideradas aves neotropicais, ocorrendo do México central até o sul do Brasil. Atravessam rios e espaços abertos em voos de trajetória ondulada, usualmente em fila indiana. Nidificam em ocos de árvores e diversas cavidades naturais. Os ovos são brancos, quase arredondados, o período de incubação varia entre as espécies, de quinze a dezoito dias. O casal se reveza na construção (ampliação da cavidade), no choco e cuidado com a prole (CUBAS, 2006).

2.3 Aves da família Psittacidae

Aves da família Psittacidae, ordem psittaciformes apresentam vasta distribuição geográfica, ocupando regiões quentes e temperadas de todos os continentes. A maior

diversidade do grupo encontra-se na Oceania, América central e América do Sul. O Brasil possui 72 espécies pertencentes a esta família, sendo o país com maior riqueza do mundo, seguido pela Colômbia com 51 e pela Venezuela com 49 espécies (SICK, 1997). As fêmeas e os machos são dotados igualmente de um colorido exuberante, formam casais monogâmicos, apesar de andarem em bandos (SICK, 1997).

Nesta família encontramos os papagaios, araras e periquitos que se distribuem em quase todos os biomas brasileiros, é uma das famílias com maior número de endemismo na Mata Atlântica (GALETTI et al., 2006; SIGRIST, 2009).

A principal característica compartilhada pelos táxons pertencentes ao grupo é a forma do bico, cuja maxila superior é curva e envolve a maxila inferior, esta forma de bico é uma adaptação à alimentação à base de sementes e frutos (SMITH, 1975; FORSHAW, 1989).

Os psitacídeos, devido a sua inteligência e habilidade em imitar sons humanos, assim como pela beleza de sua plumagem são muito procurados como animais de estimação, além de serem perseguidos para comercialização. Este grupo de aves que representa o maior número de espécies listadas na Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (SICK, 1997). São as que mais sofrem com o tráfico de fauna silvestre, movimentando milhões de dólares por ano. Quando esses animais são caçados para a venda, as árvores que possuem ninhos costumam ser derrubadas. Isso prejudica a reprodução de diversas espécies que utilizam o mesmo ninho em épocas reprodutivas diferentes. Além da caça para a comercialização, sofrem com a contínua destruição do seu *habitat* (SICK, 1997).

O gênero *Amazona* apresenta 31 espécies com grande diversificação de padrões de coloração, de habitat e de distribuição, dessas, 18 estão listadas como vulneráveis, em perigo ou criticamente ameaçada (RUSSELLO, AMATO, 2004; MARTINEZ, PRESTES, 2006).

Esforços estão sendo realizados por instituições de pesquisa e organizações não governamentais para a conservação de espécies desse gênero na Mata Atlântica (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, 2011).

2.4 Disseminação da *Cryptosporidium* spp. através da comercialização de aves

O comércio global de animais silvestres favorece o mecanismo de transmissão de doenças que causam não somente surtos em humanos, mas ameaçam os animais de produção, o comércio internacional, os meios de subsistência no campo, as populações nativas de animais e a própria saúde dos ecossistemas (KARESH et al. 2005).

As aves silvestres, particularmente, correspondem a cerca de 90% dos animais apreendidos no comércio ilegal, e podem servir de reservatórios ou vetores mecânicos de inúmeros agentes causadores de doenças tanto para humanos quanto para os animais (REED et al. 2003; TSIODRAS et al. 2008).

A regulamentação do comércio de espécies silvestres e a tentativa de coibir o comércio ilegal diminuiriam o risco de transmissão de zoonoses entre humanos, os animais domésticos, silvestres e a sua disseminação nos ecossistemas (KARESH et al. 2005). Programas de vigilância e monitoramento são importantes para entender o status de saúde de populações de vida livre, assim como dos ecossistemas em que vivem. Isso inclui o manejo de populações, o controle do comércio e de translocações e a proteção da biodiversidade, fazendo com que eventos de mortalidade e epizootias sejam detectados, salvaguardando desta maneira a saúde coletiva (MÖRNER et al. 2002; CHOMEL et al. 2007).

Em geral, alguns fatores contribuem significativamente para o sucesso de *Cryptosporidium* como um parasito (RYAN et al., 2014): grande número de oocistos são eliminados para o ambiente por hospedeiros infectados; os oocistos que são resistentes às adversidades ambientais podendo ser infectantes por muitos meses em clima temperado e condições úmidas; a infecção pode ser iniciada com um pequeno número de oocistos, teoricamente um único oocisto poderia causar infecção em um hospedeiro susceptível (OKHUYSEN et al., 1999; CHAPPELL et al., 2006). A falta de uma terapêutica para o tratamento humano e animal com criptosporidioses, também permitiu uma alta prevalência e ampla distribuição do parasito (RYAN et al., 2014). Embora centenas de fármacos tenham sido testados para a profilaxia e tratamento de criptosporidiose em animais e humanos (FAYER et al., 1997), um único fármaco foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA Nitazoxanida (Alinia®), (No Brasil com o nome comercial de Anita®) e indicado para o tratamento da diarreia causada por *Giardia* e *Cryptosporidium* (No Brasil indicada para as diarreias ocasionadas por helmintos e uma série de microrganismos). Contudo, Alinia® não mostrou ser melhor do que o placebo para o tratamento da criptosporidiose em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (AIDS) ou pacientes com outras imunodeficiências (RYAN et al., 2014).

Espécies de *Cryptosporidium* de humanos e animais são onipresentes no ambiente e podem ser adquiridas através de várias rotas (ROBERTSON e FAYER, 2013). A infecção por *Cryptosporidium* sp. ocorre através do oocisto pela rota fecal-oral que pode ser diretamente ou indiretamente. Para humanos; a transmissão pode ser de um indivíduo para outro,

principalmente devido à falta de higiene pessoal ou entre os membros do agregado familiar, entre os frequentadores de creches, centros de saúde, ou de outras instituições; ou de animais a humanos, tais como trabalhadores agrícolas, proprietários de animais, veterinários e visitantes agrícolas. A maioria das transmissões indiretas ocorre através da ingestão de água contaminada ou águas de recreação (especialmente em piscinas). Ingestão de alimentos contaminados pode ser uma fonte de transmissão, a partir de locais de produção onde as culturas podem ser contaminadas através da adubação orgânica por esterco, a partir da contaminação de água de irrigação, ou através das mãos de trabalhadores agrícolas (ROBERTSON e FAYER, 2013).

Os alimentos podem ser contaminados por oocistos de *Cryptosporidium* sp. em qualquer ponto, durante a distribuição, preparação, por manipulação do alimento, água de lavagem, superfícies de preparação, equipamentos ou utensílios de cozinha. Embora os alimentos primários implicados na transmissão sejam frutas e vegetais crus, a transmissão associada com leite não pasteurizado, carne crua e molho também foram documentados. Embora a transmissão tenha sido relatada a partir de solo contaminado, praticamente nada se sabe da prevalência de infecções de “camping” ou atividade de jardinagem. Como a profilaxia e o tratamento terapêutico são opções limitadas na criptosporidiose, a prevenção e controle da infecção parecem ser a melhor conduta (RYAN et al., 2014).

Uma vez que os oocistos de *Cryptosporidium* sp. são basicamente indistinguíveis uns dos outros em termos de morfologia, métodos moleculares são essenciais para a identificação de espécies, genótipos e subtipos para que se possa identificar especificamente o organismo responsável por determinada infecção e a origem e rotas de transmissão tanto para humanos quanto para os animais (XIAO, FAYER, 2008).

2.5 Taxonomia e ciclo biológico do gênero *Cryptosporidium*

Segundo a classificação de Levine (1980) *Cryptosporidium* apresenta a seguinte posição sistemática: Filo Apicomplexa Levine, 1970; Classe Sporozoea Leuckart, 1879; Subclasse Coccidia Leuckart, 1879; Ordem Eucoccidiida Léger & Duboscq, 1910; Sub-ordem Eimeriina Léger, 1911; Família Cryptosporidiidae Léger, 1911; Gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907.

Cryptosporidium spp. possuem um ciclo monoxeno, tendo seis estágios de desenvolvimento, todos estes infectando a célula do hospedeiro e localizando-se em vacúolo

parasitóforo. A localização do protozoário é intracelular extracitoplasmática encontrando-se nas microvilosidades de células epiteliais (SMITH, 1993).

Após o desencistamento os esporozoítos são liberados do oocisto e parasitam as células epiteliais do trato gastrointestinal ou respiratório (Figura 1). Nessas células, o parasito sofre multiplicação assexuada (esquizogonia ou merogonia) e depois a multiplicação sexuada (gametogonia), produzindo microgametas e macrogametas. Em seguida da fecundação do macrogameta pelo microgameta, oocistos se desenvolvem e esporulam no próprio local de infecção. Dois tipos diferentes de oocistos são produzidos, depois da esporogonia: um de parede espessa, que é comumente excretado pelo hospedeiro e um de parede fina, que é envolvido na autoinfecção interna (FAYER, 2007).

Os avanços aplicados as técnicas moleculares, levou a uma melhor compreensão da taxonomia e da filogenia de *Cryptosporidium* (RYAN et al., 2014). Devido a similaridades morfológicas dos oocistos observados na microscopia tanto de espécies quanto de genótipos, não sustentando uma classificação correta de espécie, estes avanços foram cruciais para uma identificação confiável, na descrição da interação parasito / hospedeiro e de uma análise mais precisa na avaliação de risco de um determinado isolado / espécie como zoonose (ZAHEDI et al., 2016).

Atualmente, 29 espécies de *Cryptosporidium* foram reconhecidas como válidas (ZAHEDI, 2016), incluindo o *C. rubeyi* que foi recentemente descrito em solo de habitações de esquilos (*Spermophilus* sp.) (LI et al., 2015). No quadro 1, são citadas as espécies consideradas como válidas confirmadas por metodologias moleculares.

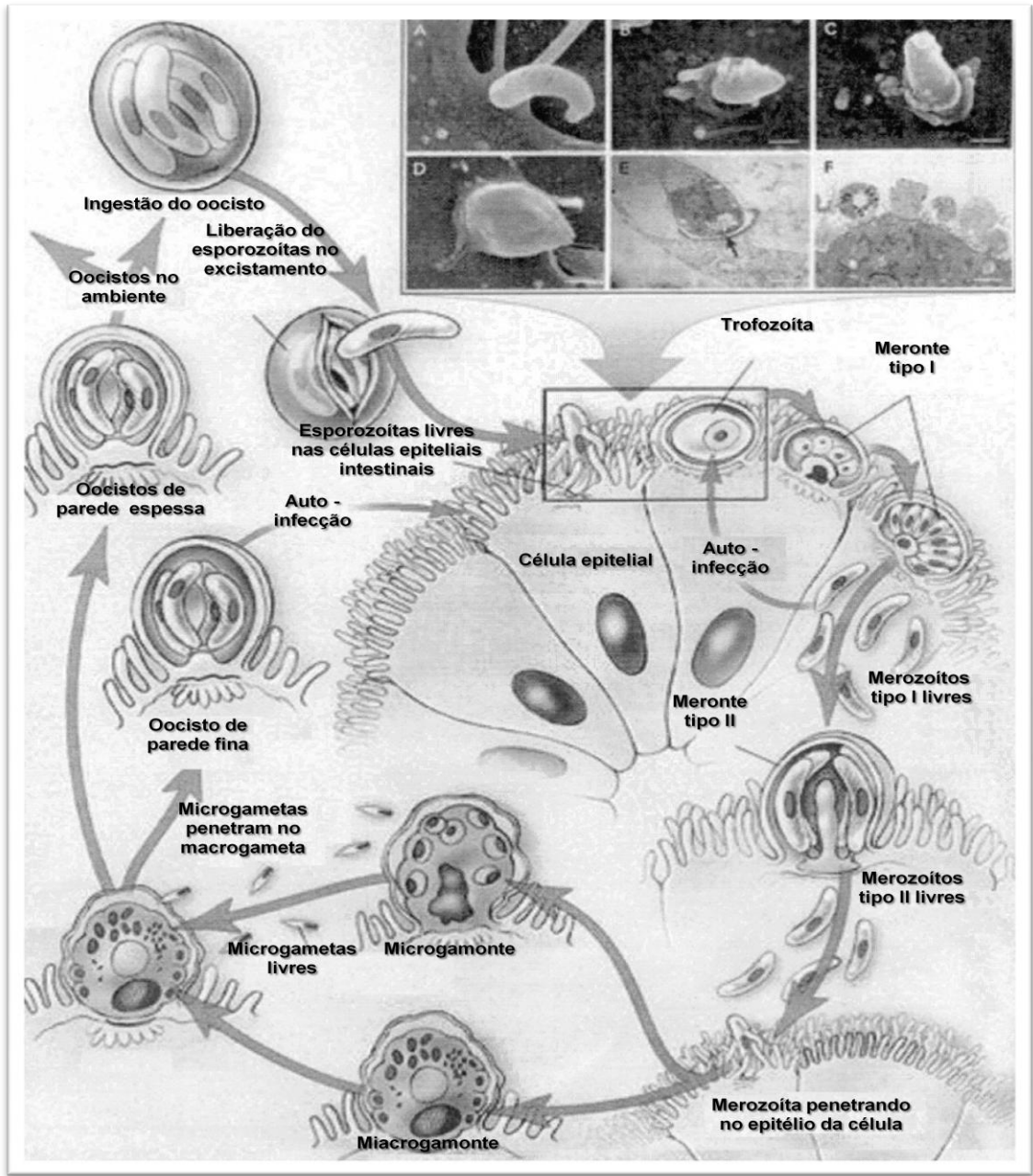


Figura 1. Imagem do ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*, demonstrando todas as fases endógenas no epitélio intestinal (Modificado de CHEN et al., 2002).

Quadro 1. Espécie de *Cryptosporidium* consideradas como válidas, confirmadas por análises moleculares, destacando o hospedeiro de origem e relato de infecção humano.

ESPÉCIE	AUTOR	HOSPEDEIRO DE ORIGEM	RELATO EM HUMANOS
<i>C. rubeyi</i>	Li et al., 2015	Esquilos <i>Spermophilus beecheyi</i>	Não relatado
<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez-Pellitero et al., 2004; Costa et al., 2015.	Pregado (Turbot) <i>Scophthalmus maximus</i>	Não relatado
<i>C. huwi</i>	Ryan et al., 2015.	Peixe <i>Poecilia reticulata</i> (Guppy), <i>Paracheirodon innesi</i> (Neon tetra), <i>Puntius tetrazona</i> (Tiger barb)	Não relatado
<i>C. erinacei</i>	Kváč et al., 2014.	Ouriço e cavalos <i>Erinaceus europaeus</i>	Kváč et al., 2014.
<i>C. scrofarum</i>	Kváč et al., 2013.	Suínos <i>Sus scrofa</i>	Kváč et al., 2009; Kváč et al., 2009.
<i>C. viatorum</i>	Elwin et al., 2012.	Humanos <i>Homo sapiens</i>	Elwin et al., 2012; Insulander et al., 2013.
<i>C. tyzzeri</i>	Tyzzer, 1912; Ren et al., 2012.	Camundongos <i>Mus musculus</i>	Rasková et al., 2013.
<i>C. cuniculus</i>	Robinson et al., 2010.	Coelho <i>Oryctolagus cuniculus</i>	Chalmers et al., 2009; Anon, 2010; Molloy et al., 2010; Chalmers et al., 2011; Anson et al., 2010; Koehler et al., 2014; Chalmers, 2012.
<i>C. ubiquitousum</i>	Fayer et al., 2010.	Ruminantes, roedores e primatas não humanos <i>Bos taurus</i>	Comumente relatados em humanos Fayer et al., 2010; Elwin et al., 2012.
<i>C. xiaoi</i>	Fayer et al., 2010.	Ovinos e caprinos <i>Ovis aries</i>	Adamu et al., 2014.
<i>C. ryanae</i>	Fayer et al., 2008.	Bovinos <i>Bos taurus</i>	Não relatado
<i>C. macropodum</i>	Power and Ryan, 2008.	Canguru <i>Macropus giganteus</i>	Não relatado
<i>C. fragile</i>	Jirků et al., 2008.	Sapo <i>Duttaphrynus melanostictus</i>	Não relatado
<i>C. fayeri</i>	Ryan et al., 2008.	Canguru <i>Macropus rufus</i>	Waldron et al., 2010.
<i>C. bovis</i>	Fayer et al., 2005.	Bovinos <i>Bos taurus</i>	Khan et al., 2010; Ng et al., 2012; Helmy et al., 2013.
<i>C. suis</i>	Ryan et al., 2004.	Suínos <i>Sus scrofa</i>	Xiao et al., 2002; Leoni et al., 2006; Cama et al., 2007; Wang et al., 2013.
<i>C. galli</i>	Pavlásek, 1999; Ryan et al., 2003	Aves <i>Spermestidae</i> , <i>Frangillidae</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Tetrao urogallus</i> , <i>Pinicola enucleator</i>	Não relatado

Quadro 1. Espécie de *Cryptosporidium* consideradas como válidas, confirmadas por análises moleculares, destacando o hospedeiro de origem e relato de infecção humano (Continuação).

<i>C. hominis</i>	Morgan Ryan et al., 2002	Humanos <i>Homo sapiens</i>	Espécie mais comum em humanos
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero, Sitjà-Bobadilla, 2002.	Peixe <i>Sparus aurata</i> (Gilt-head sea bream) and <i>Dicentrarchus labrax</i> (European seabass)	Não relatado
<i>C. canis</i>	Fayer et al., 2001.	Cão <i>Canis familiaris</i>	Alguns relatos Lucio-Forster et al., 2010.
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al., 2000.	Bovinos <i>Bos taurus</i>	Leoni et al., 2006; Morse et al., 2007; Waldron et al., 2011; Agholi et al., 2013; Jiang et al., 2014; Liu et al., 2014.
<i>C. varanii</i>	Pavlásek et al., 1995.	Lagartos <i>Varanus prasinus</i>	Não relatado
<i>C. baileyi</i>	Current et al., 1986.	Aves <i>Gallus gallus</i>	Não relatado
<i>C. parvum</i>	Tyzzler, 1912.	Ruminantes <i>Bos taurus</i>	Comumente relatados em humanos
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955.	Aves e humanos <i>Meleagris gallopavo</i> <i>Homo sapiens</i>	Comumente relatados em humanos
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1980.	Cobras e lagartos <i>Elaphe guttata</i> , <i>E. subocularis</i> , <i>Sanzinia madagascarensis</i>	Não relatado
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979.	Gato <i>Felis catus</i>	Alguns relatos Lucio-Forster et al., 2010.
<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al., 1971.	Porquinho da Índia <i>Cavia porcellus</i>	Não relatado
<i>C. muris</i>	Tyzzler, 1907; Tyzzler, 1910.	Roedores <i>Mus musculus</i>	Muitos relatos Guyot et al., 2001; Gatei et al., 2002; Tiangtip, Jongwutiwes, 2002; Gatei et al., 2003, Palmer et al., 2003; Gatei et al., 2006; Leoni et al., 2006; Muthusamy et al., 2006; Azami et al., 2007; Al Brikan et al., 2008; Neira et al., 2012; Hasajová et al., 2014; Petrincová et al., 2015; Spanakos et al., 2015.

Fonte: Modificado de Šlapeta, 2013 e Zahedi et al., 2016.

A maioria das infecções por *Cryptosporidium* atribuíveis à humanos referem-se a *C. hominis* e *C. parvum*, estas foram responsáveis pela maioria dos surtos de veiculação hídrica, com uma exceção, de um surto hídrico ocorrido no Reino Unido causado por *C. cuniculus*, espécie diagnosticada em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (CHALMERS et al., 2009; XIAO, 2010; RYAN et al., 2014). Outras espécies, tais como: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzer*, *C. erinacei* e *C. horse* e os genótipos skunk (Cangambá) e esquilo I, tem sido registrados parasitando humanos imunocompetentes e imunocomprometidos (XIAO, 2010; WALDRON et al., 2011; ELWIN et al., 2012a; NG et al., 2012; KVAC et al., 2013; RASKOVA et al., 2013; LIU et al., 2014).

Pouco se sabe sobre a distribuição das espécies e subtipos de *Cryptosporidium* zoonóticas e não zoonóticas em populações de animais silvestres (APPELBEE et al., 2005; ZIEGLER et al., 2007; RYAN et al., 2014). Evidências moleculares conclusivas, ligando a contaminação de abastecimento de água por animais selvagens em bacias com surtos de criptosporidiose em populações humanas são escassas. Contudo, um recente surto no Reino Unido, por via aquática causada por *C. cuniculi* de coelhos silvestres destacou a importância da vida selvagem na dispersão de *Cryptosporidium* à fontes de água potável associado a risco para a saúde humana (CHALMERS et al., 2009; ELVIN et al., 2012).

Várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* foram identificados em fonte de água potável, águas pluviais, fluxo de sedimentos, águas residuais e água do mar em várias regiões geográficas, incluindo as espécies *C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. cuniculus*, *C. meleagridis* e *C. canis* e bem como "sequências ambientais" não identificadas como espécie, que provavelmente representam genótipos de animais silvestres que poderiam contaminar águas (ZHOU et al., 2004; JIANG et al., 2005; YANG et al., 2008; JELLISON et al., 2004; NICHOLS et al., 2010; KOOMPAPONG, SUKTHANA, 2012; Van DYKE et al., 2012; XIAO et al., 2012; GALVAN et al., 2014; LI et al., 2014.; MAHMOUDI et al., 2015).

Estudos conduzidos por Jiang et al. (2005) e Feng et al. (2007), demonstraram que os animais silvestres são a principal fonte de contaminação de *Cryptosporidium* em água potável, incluindo a espécie *C. ubiquitum* e genótipo I originário de esquilo.

2.6 Diagnóstico da Criptosporidiose

Inicialmente, o diagnóstico da criptosporidiose era feito a partir da observação microscópica de amostras obtidas em material de biópsia, conseqüentemente o diagnóstico biológico dependia da histopatologia onde eram observados os estágios endógenos nas microvilosidades das células epiteliais intestinais. Inicialmente, métodos e técnicas foram desenvolvidos para identificar oocistos em amostras fecais de bezerros (ANDERSON, 1978; HAFIZ et al., 1985) e humanos (ANDERSON, 1983; CURRENT, 1983), auxiliando no diagnóstico assim como também monitorar o curso da criptosporidiose com certa rapidez e acuidade.

Atualmente, as metodologias utilizados para identificar a presença de *Cryptosporidium* sp. são na sua grande maioria as coproparasitológicas (MAGI et al., 2006). O diagnóstico da criptosporidiose baseia-se na demonstração dos oocistos nas fezes, mas algumas dificuldades são encontradas na realização desse diagnóstico. A diarreia aquosa acarreta a diluição do microorganismo e acelera a eliminação das fezes, gerando presença de muco que pode mascarar o resultado final (FAYER et al., 1997). A eliminação de oocistos pelo hospedeiro é intermitente em indivíduos sintomáticos e assintomáticos, sendo necessária a análise de várias amostras de fezes antes de ser emitido um diagnóstico preciso (CURRENT; GARCIA, 1991). As leveduras muitas das vezes são constantes e deverão ser diferenciadas dos oocistos de *Cryptosporidium*, já que apresentam as mesmas dimensões (FAYER et al., 1997).

Há diversas técnicas de diagnóstico que são empregadas para a criptosporidiose, desde aquelas simples como o exame parasitológico de fezes a fresco, até as mais sofisticadas como aquelas onde são utilizadas as ferramentas moleculares. A metodologia a ser empregada depende das condições de infraestrutura do laboratório e da especificidade do diagnóstico desejado (HUBER, 2007).

Se a finalidade é apenas determinar se há o parasitismo por *Cryptosporidium* sp., sem a identificação de espécie, então técnicas destinadas ao exame parasitológico de fezes rotineiros e colorações especiais de esfregaços de fezes podem ser o suficientes. Para determinar qual é a espécie de *Cryptosporidium*, o uso de técnicas moleculares torna-se imprescindível. Já, se o objetivo é determinar se o hospedeiro alguma vez foi exposto ao protozoário, então métodos sorológicos podem ser empregados. Os resultados destes irão indicar o contato do hospedeiro com o protozoário, porém não permitem a diferenciação entre uma infecção passada e já curada e uma infecção atual subclínica ou clínica (HUBER, 2007). Outro fator a ser

observado antes da escolha da metodologia é a infraestrutura laboratorial, visando, por exemplo, evitar a contaminação do material, além da capacitação de pessoal na realização da emissão de um diagnóstico correto (HUBER, 2007).

O diagnóstico da criptosporidiose não deve ser baseado apenas na observação da sintomatologia clínica, pois outras doenças podem apresentar sintomas clínicos semelhantes. Dessa forma faz-se necessário a utilização de técnicas específicas para a detecção de *Cryptosporidium* sp. (KAR et al., 2011).

Existem inúmeras formas de diagnosticar a presença de *Cryptosporidium* sp. em um hospedeiro com suspeita de criptosporidiose (Tabela 1) (SMITH et al., 2007; CHALMERS, 2009). Independente da técnica ou metodologia a ser utilizada, necessita de um profissional bem treinado para emitir um diagnóstico confiável.

Tabela 1. Métodos de diagnóstico de *Cryptosporidium* utilizando amostras fecais.

PROCEDIMENTO	ALVO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Microscopia	Oocisto	Baixo custo e detecta outros patógenos.	Possui baixa sensibilidade e especificidade.
Imunoenzimático	Antígeno	Pode ser utilizado a campo.	Alto custo pode apresentar resultados falsos positivos e negativos.
Molecular	DNA	Alta especificidade	Alto custo, restrito a laboratórios especializados.

Fonte: Modificado de SMITH, 2007; CHALMERS, 2009.

2.6.1 Diagnóstico através da microscopia

Há muito tempo, a microscopia tem sido utilizada como o único meio para diagnosticar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais (FAYER, 2007). A principal metodologia de diagnóstico utilizada na maioria dos laboratórios é a que permite a identificação da presença de oocistos do protozoário nas fezes, sem a determinação da espécie envolvida. Este fato deve-se a duas razões principais: a facilidade do procedimento laboratorial e o relativo baixo custo, quando comparado a metodologias mais elaboradas.

Para o diagnóstico por meio de exames parasitológico de fezes, amostras recém-eliminadas podem ser coletadas e enviadas ao laboratório sem adição de conservantes, o material fecal pode ser preservado em formalina à 10% ou em solução aquosa de bicromato

de potássio a 2,5%. Oocistos mantidos nesta solução à 2,5 %, se mantém infectante durante vários meses e devem ser considerados como material de risco biológico. Para inativar os oocistos é recomendada a adição de formalina a 10%, sendo que o tempo de contato deve ser superior a 24 horas para neutralização dos oocistos (ARROWOOD, 1997).

A concentração de oocistos nas fezes possui importância relevante para aumentar as chances de encontrar o protozoário. Podem ser utilizadas técnicas comuns de flutuação em solução saturada de açúcar, sal ou sulfato de zinco (ARROWOOD, 1997).

Quando forem utilizadas técnicas de sedimentação, deve ser considerado o baixo peso dos oocistos, que pode prejudicar a sedimentação em exames de rotina. Para a sedimentação de oocistos de *Cryptosporidium*, devem ser aumentados a rotação da centrífuga e o tempo de centrifugação. Uma rotação de 2000 – 2500 rpm por 10 minutos é necessária para garantir a sedimentação adequada dos oocistos (ARROWOOD, 1997), o que equivale a aproximadamente 402,48g.

Quando se utilizam técnicas de flutuação em solução de açúcar, os oocistos podem ser observados ligeiramente róseos, na microscopia de campo claro, são claros e birrefringentes quando vistos em contraste de fase. Os oocistos começam a deformar a partir de 15 minutos, quando estão em solução saturada de açúcar, perdendo sua forma esférica, assim como também, a sua coloração rósea (CURRENT; GARCIA, 1991). A técnica de flutuação em solução saturada de açúcar é considerada uma excelente metodologia de concentração para obtenção de oocistos em amostras fecais, principalmente se o hospedeiro tiver uma carga parasitária alta. Já, se o hospedeiro apresentar uma infecção subclínica, muitas das vezes eliminando poucos oocistos, a técnica poderá facilitar o diagnóstico da criptosporidiose (GARCIA et al., 1983; HUBER et al., 2004). Porém, a leitura microscópica das amostras em lâminas utilizando essa técnica, deve ser realizada rapidamente, isto porque, os oocistos após um intervalo de aproximadamente 15 minutos perdem sua coloração rósea, característica da técnica quando observado em microscopia de campo claro, e começam a deformar com facilidade (HUBER et al., 2004).

Diversas tecnologias microscópicas podem ser utilizadas para identificação de *Cryptosporidium* sp., dentre elas podemos citar a de campo claro, o contraste de fase, o contraste de interferência diferencial (DIC) e a de imunofluorescência (IFD) (FAYER, 2007; SMITH, 2007). Além disso, podem ser utilizadas técnicas de colorações de esfregaços fecais para auxiliar a visualização dos oocistos (FAYER et al., 2000; SMITH, 2007). Entretanto, apesar das técnicas de coloração auxiliar na visualização de oocistos em amostra fecais, pode

haver interpretação errônea quando a carga parasitária estiver baixa, gerando falso negativo. No material fecal existem várias estruturas com as mesmas afinidades tintoriais que os oocistos, o que pode dificultar o diagnóstico dependendo da qualificação do microscopista. Outro problema referente à coloração seria a obtenção de dados morfométricos não fidedignos, pelo fato de muitas técnicas usarem o calor para fixação dos corantes, acarretando o aparecimento de distorções no formato dos oocistos. Uma exceção seria a utilização da coloração em imunofluorescência onde os oocistos podem ser mensurados com uma precisão razoável (SMITH, 2007).

Para o diagnóstico microscópico é necessário tempo e pessoal capacitado para fazer a identificação de oocistos do protozoário, pois as similaridades morfológicas dos oocistos entre as espécies tornam impossíveis sua identificação específica (FAYER et al., 2000; HUBER et al., 2004; FAYER, 2007; SMITH, 2007; FAYER, 2010; XIAO, 2010).

A observação de estádios endógenos de *Cryptosporidium* foi inicialmente realizada através da coloração de cortes histológicos de tecidos infectados, raspados da mucosa intestinal ou do conteúdo intestinal, porém se constituindo um processo bastante invasivo e cuja sensibilidade estava na dependência da área examinada (XIAO; CAMA, 2006).

2.6.2 Diagnóstico por ensaio imunoenzimático para pesquisa de coproantígenos

Os ensaios enzimáticos mais comumente utilizados na detecção da infecção por *Cryptosporidium* sp. são o ELISA ('Enzyme Linked Immunosorbent Assay') e o ensaio imunocromatográfico (SMITH, 2007). Porém ainda podem ser utilizados testes com anticorpo policlonal fluorescente, reação de aglutinação em látex, imunofluorescência com anticorpos monoclonais, hemaglutinação passiva reversa e imunoserologia usando a detecção por imunofluorescência (FAYER et al., 2000).

A utilização de kits imunoenzimáticos pode ser uma ferramenta de grande utilidade no diagnóstico da criptosporidiose, pois os antígenos de *Cryptosporidium* podem ser detectados em suspensão fecal que contenha ou não as formas infectantes. Ou seja, possuem uma boa sensibilidade, podendo detectar a presença do protozoário mesmo que este não esteja sendo eliminado nas fezes. Além disso, a utilização do kit demanda menos tempo para a obtenção do diagnóstico e ao contrário do que ocorre na microscopia (SMITH, 2007). Apesar disso, as metodologias baseadas em anticorpos podem apresentar problemas devido à reação cruzada com outros microrganismos (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 (CHALMERS, 2009).

Com a utilização do ELISA as amostras não devem ser concentradas antes de serem testadas. Esta é uma técnica altamente sensível e específico, e é útil para o rastreamento de grandes números de amostras num período de tempo curto. No entanto, os controles são necessários para determinar a qualidade de reagentes disponíveis comercialmente (FAYER, XIAO, 2008).

Já a técnica imunofluorescência oferece a maior combinação de sensibilidade e especificidade e é considerada o padrão ouro por muitos laboratórios. No entanto, ela não fornece um registro permanente, tal como uma lâmina corada, a qual pode ser arquivada. As amostras de fezes devem ser concentradas antes de usar esta técnica (FAYER, XIAO, 2008).

2.6.3 Diagnóstico através das ferramentas moleculares

Um dos desafios primordiais dos pesquisadores foi à obtenção do DNA a partir de oocistos de *Cryptosporidium*. As técnicas inicialmente utilizadas para a obtenção de DNA genômico de bactérias não se aplicavam ao *Cryptosporidium*, por este possuir um oocisto com uma parede extremamente resistente que não se rompe 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. Hoje, com a utilização dos kits de extração de DNA aplicados para obtenção de DNA de microrganismos que apresentam formas biológicas que são eliminados através das fezes, tais como, oocistos e cisto, houve uma melhora intensa na obtenção de DNA de boa qualidade.

Nos últimos anos, as ferramentas de biologia molecular utilizadas para a detecção de *Cryptosporidium* sp. se desenvolveram, sendo eficazes não apenas no diagnóstico das espécies e genótipos, mas identificando os espécimes inclusive em subtipos, propiciando um melhor entendimento da biologia e da epidemiologia do protozoário (XIAO, 2010). Tal metodologia é utilizada principalmente para fins de pesquisa, já que seu custo é elevado para exame de rotina laboratorial (MAGI et al., 2006).

Existem alguns fatores que podem causar dificuldades no emprego da PCR para *Cryptosporidium*, tais como, a distribuição desigual de oocistos nas amostras fecais, fazendo com que a alíquota utilizada no procedimento não contenha oocistos; falha na ruptura dos oocistos durante a extração, evitando assim a liberação do DNA para a análise; a adsorção do DNA por compostos presentes nas fezes e a presença de inibidores da PCR que também

podem dificultar o emprego da técnica (SCORZA et al., 2003). Os inibidores, principalmente compostos orgânicos, presentes em amostras complexas, tais como fezes e solos, podem diminuir a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes (WARD; WANG, 2001).

Para amostras que não sofreram congelamento antes do processamento de extração de DNA, podem ser utilizadas técnicas comuns de flutuação em solução saturada de açúcar, sal ou sulfato de zinco (ARROWOOD, 1997). Oocistos das amostras fecais podem ser concentrados pela técnica do álcool-éter seguido por gradiente de sacarose (COUPE et al., 2005) ou Percoll ou outras soluções hipertônicas (KUCZYNSKA; SHELTON, 1999), seguindo o protocolo de extração de DNA.

O uso da formalina e do álcool polivinílico como conservantes ou preservantes pode inviabilizar a extração do DNA, uma vez que podem causar a degradação do mesmo (PIENIAZEK et al., 1999). Portanto, métodos como a concentração de oocistos pelo uso da formalina éter devem ser evitados, sendo que nesta técnica a formalina pode ser substituída pela água destilada. Nichols et al (2006) relatam altas taxas de amplificação na PCR, utilizando uma concentração prévia dos oocistos contidos nas amostras fecais utilizando para esta metodologia a água e éter. Os autores relatam que fezes líquidas ou semi sólidas apresentam maiores taxas de recuperação de oocistos do que fezes sólidas, sendo que a perda de oocistos no sobrenadante e no tampão gorduroso, varia entre 1 a 2 % dos oocistos nas amostras fecais líquidas e semi sólidas, chegando a mais de 3 % em amostras fecais sólidas.

Em amostras fecais congeladas, ocorre o rompimento dos oocistos e conseqüentemente a liberação dos esporozoítas de *Cryptosporidium*, portanto nessas amostras não podem ser realizadas as etapas de purificação ou concentração usando soluções saturadas, uma vez que este procedimento causaria a perda e/ou degradação do material genético presente. Tornam-se assim necessários métodos de extração de DNA aplicáveis à amostra de fezes totais (WARD; WANG, 2001).

Os marcadores moleculares mais amplamente utilizados para tipagem de isolados *Cryptosporidium* são os genes 18S (18S rRNA) ribossomal RNA e 60-kDa glycoprotein (GP60), também denominado de GP45 / GP40 e GP15. O GP60 codifica uma proteína precursora, que é clivada para produzir glicoproteínas de superfície de células hospedeiras implicadas na ligação de “zoítos”, nos mecanismos de invasão celular de enterócitos (XIAO, 2010; RYAN et al, 2014). A heterogeneidade genética do gene gp60, é dada pela variação no número de uma repetição de trinucleotídeos (TCA, TCG ou TCT) na extremidade 50 (GP40) da região codificante. As repetições são utilizadas para definir as famílias de subtipos dentro

de uma espécie, ao passo que o restante dos sítios polimórficos é usado para identificar subtipos dentro de um subtipo família (RYAN et al., 2014).

Além dos genes mencionados anteriormente, diversos outros genes alvo podem ser utilizados na identificação das diferentes espécies de *Cryptosporidium* (SMITH, 2007) (Tabela 2). O uso generalizado do gene 18S em genotipagem de *Cryptosporidium* é, em grande parte, devido à natureza de múltiplas cópias do gene e da presença de regiões semi conservadas e hipervariáveis, o que facilita a concepção de iniciadores gênero-espécie. Dentro de muitas espécies de *Cryptosporidium* e genótipos, pequenas variações de sequencia entre isolados estão presentes em diferentes cópias do gene SSU rRNA. Assim, novos genótipos não devem ser identificados com base em uma ou duas substituições ou inserções de deleções de nucleotídeo no gene (ABEYWARDENA et al. 2014).

2.7 Espécies de *Cryptosporidium* parasitando aves

A criptosporidiose é uma das infecções parasitárias mais prevalentes na classe das aves, tanto as domesticadas quanto as silvestres (O'DONOGHUE, 1995; SRETER, VARGA, 2000), o parasito tem sido relatado em mais de 30 espécies de aves em todo o mundo (LINDSAY, BLAGBURN, 1990; O'DONOGHUE, 1995; SRETER; VARGA, 2000; NG et al., 2006; RYAN; XIAO, 2008).

Atualmente, apenas três espécies de *Cryptosporidium* spp. são reconhecidas como válidas tendo como hospedeiros a classe das aves, sendo estas, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium galli*. No passado, duas outras espécies de *Cryptosporidium* foram nomeadas, *Cryptosporidium anserinus* de um ganso doméstico (*Anser domesticus*) (PROCTOR, KEMP, 1974) e *Cryptosporidium tyzeri* de galinhas (*Gallus gallus*) (LEVINE, 1961). Mas nenhum destes relatos mencionava descrições adequadas de oocistos ou fornecimento de outras informações úteis para serem consideradas como uma nova espécie e, portanto foram desconsideradas (LINDSAY; BLAGBURN, 1990).

A espécie *C. meleagridis* apresenta uma ampla variedade de hospedeiros sendo a terceira espécie mais prevalente infectando humanos (LEONI et al. 2006; XIAO, 2010; ELWIN et al. 2012). A capacidade de *C. meleagridis* infectar os seres humanos e outros mamíferos, e sua estreita relação filogenética com *C. parvum* e *C. hominis*, levou à sugestão de que os mamíferos, na verdade, foram os hospedeiros originais, e que a espécie tenha sido mais tarde adaptada para as aves (XIAO et al., 2002, 2004). Análise da sequência do gene HSP70 ('70-kDa heat shock protein') e do 18 S tem sido usado para fornecer evidência de

transmissão zoonótica de *C. meleagridis* parasitando *Gallus gallus* para seres humanos (SILVERLÅS et al., 2012).

Além disso, as espécies *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium serpentis*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium andersoni* e o genótipo I do rato almiscarado, foram também diagnosticados em um pequeno número de aves, que provavelmente este resultado foi pela ingestão acidental de oocistos *Cryptosporidium* (RYAN, 2010; RYAN; XIAO, 2014). Sendo que *C. parvum* já foi diagnosticado, por análise molecular, ocasionando um surto de criptosporidiose intestinal em várias espécies de maçaricos mantidos em uma unidade de criação em Dubai (ZYLAN et al., 2008), confirmando a capacidade de *C. parvum* infectar aves.

Tabela 2. Lista dos genes alvos com as técnicas moleculares utilizadas no diagnóstico de *Cryptosporidium*, com o tipo de ensaio e principal uso da sua amplificação.

GENE ALVO	TÉCNICA MOLECULAR	DIAGNÓSTICO
SSUrRNA (18S)	PCR, PCR-nested, sequenciamento, PCR-RFLP, PCR-tempo real, microarranjo	Identificação de espécies e genótipos
HSP70	PCR, PCR-nested, sequenciamento, PCR-tempo real, microarranjo	Identificação de espécies e genótipos
COWP	PCR, PCR-nested, sequenciamento, PCR-RFLP, microarranjo	Identificação de espécies e genótipos
Gene codificante da Actina	PCR, PCR-nested, sequenciamento	Identificação de espécies e genótipos
β-tubulina	PCR, PCR-nested, sequenciamento, PCR-RFLP	Identificação de espécies e genótipos
GP60	PCR, PCR-nested, sequenciamento	Identificação de subgenótipos
Microsatélites	PCR, PCR-nested, sequenciamento, tipificação de fragmento	Identificação de subgenótipos
Minisatélites	PCR, PCR-nested, sequenciamento, tipificação de fragmento	Identificação de subgenótipos
RNA fita dupla extracromossomal	Transcriptase reversa, PCR, sequenciamento, ensaio de mobilidade heteroduplex	Identificação de subgenótipos

Fonte: Modificado de SMITH, 2007.

Infecções naturais por *Cryptosporidium* em aves tem se manifestado de três formas clínicas: doença respiratória, enterite e doença renal (RYAN, 2010). Normalmente, apenas uma forma da doença está presente em um surto (LINDSAY; BLAGBURN, 1990). Atualmente não há uma quimioterapia eficaz disponível para o tratamento da criptosporidiose aviária (LINDSAY; BLAGBURN, 1990; RYAN; XIAO, 2008) e métodos de controle contra criptosporidiose aviária geralmente dependem da prevenção da infecção (RYAN, 2010).

2.7.1 *Cryptosporidium meleagridis* Slavin, 1955

A primeira descrição de criptosporidiose aviária foi feita por Tyzzer em 1929, mas após 35 anos, Slavin diagnosticou estruturas semelhantes à *Cryptosporidium* no íleo de perus e nomeou o parasito de *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin, 1955), assim como descreveu os estágios assexuados e sexuados do seu ciclo de vida.

Mas o ciclo de vida do que se presume ser *C. meleagridis* foi descrito mais detalhadamente a partir de perus de criação comercial infectados naturalmente com idade de 30 dias (TACCONI et al., 2001). Estágios endógenos de desenvolvimento de *C. meleagridis*, isolados de origem humana, foram também descritos em um camundongo e um frango experimentalmente infectados (AKIYOSHI et al., 2003).

C. meleagridis apresenta como local de parasitismo, o intestino delgado, grosso e bursa de Fabrício. A doença em aves tem sido associada à enterite gerando mortalidade (SLAVIN, 1955; GHARAGOZLOU et al., 2006; PAGÈS-MANTÉ et al., 2007).

As espécies *C. parvum* e *C. meleagridis* apresentam uma grande variabilidade de hospedeiros da classe das aves, infectando várias ordens (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 mostraram que *C. meleagridis* pode infectar frangos de corte, patos, perus, bezerras, suínos, coelhos, ratazanas, ratos (O'DONOGHUE, 1995; AKIYOSHI et al., 2003; DARABUS; OLARIU, 2003; HUANG et al., 2003). Geralmente, a taxa de infecção e virulência de *C. meleagridis* para mamíferos tem sido semelhante à de *C. parvum* (AKIYOSHI et al., 2003). Em 2004, foi descrito infecção natural por *C. meleagridis* em um cão da República Tcheca (HAJDUSEK et al., 2004).

Cryptosporidium meleagridis também é considerado um patógeno emergente em humanos e é a terceira espécie mais comumente diagnosticada neste hospedeiro (XIAO;

FAYER, 2008). Foi previamente sugerido que *C. meleagridis* poderia ser *C. parvum* devido as grandes similaridades genéticas (CHAMPLIAUD et al., 1998; SRETER; VARGA, 2000), no entanto a análise molecular de amostras originárias dos EUA, Austrália e Europa, utilizando os genes alvos 18S ('small subunit ribosomal RNA'), COWP ('oocyst wall protein'), HSP70 ('70-kDa heat shock protein'), GP60 ('60 kDa glicoprotein') e o gene codificante da Actina, demonstraram as singularidades genéticas e biológicas de *C. meleagridis* (XIAO et al., 1999; MORGAN et al., 2000; SRETER et al., 2000; SULAIMAN et al., 2000; XIAO et al., 2000; MORGAN et al., 2001; SULAIMAN et al., 2002; XIAO et al., 2002).

As análises filogenéticas sugerem que *C. meleagridis* foi possivelmente originalmente um parasito de mamíferos que subsequentemente tornou-se adaptado a aves via ingestão de presas infectadas (XIAO et al., 2002). Esta opinião é corroborada pelas conclusões sobre a capacidade de *C. meleagridis* infectar uma ampla variedade de mamíferos, o que não é o caso da espécie *C. baileyi* (RYAN, 2010).

2.7.2 *Cryptosporidium baileyi* Current, Upton and Haynes, 1986

A segunda espécie de *Cryptosporidium* aviária descrita foi originalmente isolada de frangos de corte de criação comercial e foi denominada de *Cryptosporidium baileyi*, esta espécie foi nomeada com base no seu ciclo de vida e características morfológicas (CURRENT et al., 1986).

Infecções naturais por *C. baileyi* têm sido relatadas em vários sítios anatômicos de seus hospedeiros, incluindo a conjuntiva, nasofaringe, traqueia, os brônquios, os sacos aéreos, intestino delgado, intestino grosso, ceco, cloaca, bursa de Fabrício, rins e trato urinário (LINDSAY; BLAGBURN, 1990). Após a inoculação oral, observou-se que os sítios primários de desenvolvimento eram a bursa de Fabrício e a cloaca (LINDSAY et al., 1986). Em inoculação intra traqueal de oocistos em galinhas, resultou em alta carga parasitária no trato respiratório (LINDSAY et al., 1986; BLAGBURN et al., 1987; LINDSAY et al., 1987). Infecções da conjuntiva ocorreram em algumas aves quando os oocistos foram colocados diretamente sobre o saco da conjuntiva (LINDSAY et al., 1987). No entanto, as aves eram mais propensas a desenvolverem infecções na bursa de Fabrício e na cloaca (LINDSAY et al., 1987).

A Criptosporidiose respiratória está mais frequentemente associada a infecção por *Cryptosporidium baileyi*, ocasionando alta morbidade e mortalidade, especialmente frangos de corte (LINDSAY; BLAGBURN, 1990; SRETER et al., 1995, 2000). A criptosporidiose renal também tem sido relatada em infecções naturais (GARDINER; IMES, 1984; RANDALL, 1986; NAKAMURA; ABE, 1988; LINDSAY; BLAGBURN, 1990) e também induzida experimentalmente em galinhas (livres do patógeno específico - SPF) e em galinhas coinfectados com *C. baileyi* e vírus da doença de Marek (MDV) (ABBASSI et al., 1999).

Cryptosporidium baileyi é provavelmente a espécie mais comum na classe das aves, tem sido relatada em uma variedade de espécies (LINDSAY; BLAGBURN, 1990; PAVLÁSEK, 1993; RYAN et al., 2003; ABE; ISEKI, 2004; JELLISON et al., 2004; KIMURA et al., 2004; CHVALA et al., 2006; HUBER et al., 2007; VAN ZEELAND et al., 2008). Sendo também demonstrada a infecção cruzada de *C. baileyi* entre várias espécies de aves (CURRENT et al., 1986; LINDSAY et al., 1987, 1989; LINDSAY; BLAGBURN, 1990; CARDOSO et al., 2005).

Na descrição do seu ciclo de vida há limitações, os estágios endógenos foram observados em alguns perus e nas infecções com alta carga parasitária, as aves desenvolveram estágios endógenos apenas na bursa de Fabrício (CURRENT et al., 1986). Hospedeiros mamíferos, como ratos e caprinos, inoculados experimentalmente, não adquiriram a infecção (CURRENT et al., 1986), denotando que a espécie não apresenta a capacidade de infectar mamíferos.

Cryptosporidium baileyi foi analisada utilizando os genes alvos incluindo o 18S, HSP70, COWP e Actina e demonstrou ser geneticamente uma espécie distinta (XIAO et al., 1999; SULAIMAN et al., 2000; XIAO et al., 2000; MORGAN et al., 2001; EGYED et al., 2002; SULAIMAN et al., 2002).

Geneticamente a espécie *Cryptosporidium baileyi* é mais estreitamente relacionado ao genótipo Avian I e II. A relação entre *C. baileyi* e outras espécies intestinais e gástricas não está claro quando se usa a análise filogenética para os genes 18S, Actina e COWP, mas a análise no locus HSP70 coloca *C. baileyi* em um ramo que contém todas as espécies de *Cryptosporidium* gástricas em vez do ramo que inclui as espécies intestinais (XIAO 23T et al., 2002).

2.7.3 *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999

A terceira espécie de *Cryptosporidium* aviária foi descrita pela primeira vez por Pavlásek (1999) em galinhas, com base nas diferenças biológicas. Mais posteriormente, o parasito foi redescrito com base nas diferenças moleculares associando-as com as biológicas (RYAN et al., 2003).

Ao contrário das outras duas espécies aviárias, os estágios do ciclo de vida de *C. galli* desenvolvem-se no proventrículo, e não no trato respiratório ou dos intestinos delgado e grosso (PAVLÁSEK, 1999, 2001). Pouco se sabe sobre o ciclo de vida de *C. galli*, mas o desenvolvimento das fases endógenas parece estar localizado nas células epiteliais glandulares do proventrículo e fases de trofozoitas, macrogamontes e oocistos têm sido observados (RYAN, 2010).

Cryptosporidium galli parece estar associado com doença clínica gerando alta mortalidade (BLAGBURN et al., 1990; PAVLÁSEK, 1999; MORGAN et al., 2001; PAVLÁSEK, 2001). A histopatologia de tentilhões (Passeriformes) infectados demonstrou necrose e hiperplasia das células epiteliais glandulares do proventriculo, com grande número de oocistos fixados à superfície de células epiteliais glandulares (MORGAN et al., 2001).

Infecções naturais *C. galli* já foram relatadas em várias espécies de aves domésticas e silvestres (PAVLÁSEK, 1999, 2001; RYAN et al., 2003; NG et al., 2006, RYAN et al., 2003). Futuros estudos são necessários para determinar a extensão da variabilidade de hospedeiros da classe das aves para *C. galli*. Neste sentido, estudo de transmissão cruzada demonstrou que oocistos de *C. galli* foram infecciosos para pintos (*Gallus gallus*) com nove dias de idade, mas não para frangos de 40 dias de idade, sendo que o fator idade foi primordial para a infecção (PAVLÁSEK, 2001).

Análises filogenéticas utilizando três genes alvo (18S, HSP70 e Actina) identificou *C. galli* como uma espécie distinta (RYAN et al., 2003). A localização gástrica no hospedeiro e o tamanho de seu oocisto, considerado grande, sugerem que esta espécie está mais intimamente relacionada com as espécies gástricas de *Cryptosporidium* o que tem sido apoiada por análises moleculares. Observou-se através de análises no loci SSUrRNA que *C. galli* é mais estreitamente relacionado com o genótipo aviário IV e com outras espécies gástricas como *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium serpentis* e *Cryptosporidium andersoni* (RYAN, 2010).

2.8 Genótipos de *Cryptosporidium* parasitando aves

Em adição às 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 pato preto, o genótipo da galinhola (woodcock) da Euroasiática e genótipos de gansos I-V (RYAN, XIAO, 2014; ABE, MAKINO, 2010). Sendo que nenhum destes são considerados patogênicos 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 se tornarem disponíveis (RYAN, 2010).

2.8.1 Genótipos Avian I-VI

Os genótipos Avian I-VI, foram identificados a partir de uma variedade de espécies de aves (MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006). As análises das sequências no locus do gene SSUrRNA indicam que, embora os genótipos Avian I e II são mais intimamente relacionados com *C. baileyi*, se comportam geneticamente distintos (99,4% e 97,6% de semelhança, respectivamente a *C. baileyi*) e exibindo 98,2% de semelhança entre si. No locus do gene Actina, os genótipos Avian I e II apresentaram apenas 95,7% e 88,3% de semelhança, respectivamente, com *C. baileyi*.

O genótipo Avian I foi diagnosticado em canários (*Serinus canaria*) e pavão (*Pavo cristatus*) (NG et al, 2006; NAKAMURA et al, 2009). O genótipo Avian II foi descrito de avestruzes e em várias espécies de psitacídeos (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; SEVA et al., 2011; NGUYEN et al., 2013).

Wang et al. (2014) relataram a presença do genótipo Avian II em 0,78% (3/385) em amostras fecais de frangos na China. Quanto aos sítios de infecção, o genótipo Avian II foi relatado parasitando o epitélio da cloaca e, em menor extensão, o epitélio do reto e bursa de Fabrício de avestruzes (SANTOS et al., 2005).

Isolados do genótipo Avian III foram geneticamente mais estreitamente relacionados ao genótipo da galinhola Euro Asiática (98,8% e 98,5% de similaridade genética no locus do gene 18S e Actina, respectivamente).

Aves parasitadas com os genótipos Avian I-III não apresentaram sinais clínicos, como diarreia, dispneia, tosse ou espirro (RYAN, 2010). O genótipo Avian III tem sido relatado em

várias espécies das ordens Psittaciformes 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).

O genótipo Avian IV foi identificado na ave *Zosterops japonicus* ("olho branco japonês") da República Tcheca, esta ave apresentou um quadro clínico de diarreia e anorexia. Na análise microscópica de amostras fecais, somente oocistos de *Cryptosporidium* foram observados, descartando outro agente etiológico causador da sintomatologia. Nas análises filogenéticas utilizando o 18S, este genótipo exibiu 97,9% de similaridades com *C. galli* (RYAN, 2010).

O genótipo de *Cryptosporidium* Avian V já foi assinalado em um papagaio da fronte azul da amazonia (*Amazona aestiva*) e descrito em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) no Japão, Brasil e China (ABE, MAKINO, 2010; NAKAMURA et al., 2014; QI et al., 2011), não sendo associada à doença clínica. Além do registro do genótipo de *Cryptosporidium* Avian V em aves, há um relato de sua ocorrência em répteis (*Iguana iguana*) (KIK et al., 2011).

Por comparações filogenéticas do gene 18S em múltiplas amostras, o genótipo V está relacionado ao *C. baileyi* e ao genótipo Avian I, com uma similaridade maior ao genótipo Avian II (ABE; MAKINO, 2010).

Infecção renal associada à doença clínica urinária por *Cryptosporidium* foi atribuída ao genótipo Avian V em cacatua (*Lophochroa leadbeateri*) (CURTISS et al., 2015).

Recentemente, Chelladurai et al. (2016) analisaram amostras fecais positivas para oocistos de *Cryptosporidium* provenientes do pássaro preto da asa vermelha (*Agelaius phoeniceus*) na América do Norte. Para as análises moleculares foram utilizados três genes alvos (18S, Actina, HSP70), como resultado, a espécie gástrica *Cryptosporidium galli* estava presente e estes autores sugerem um novo genótipo intimamente relacionado às espécies gástricas, sendo denominado de *Cryptosporidium* genótipo Avian VI. Estes resultados contribuem para a compreensão da diversificação de *Cryptosporidium* em passeriformes, a maior ordem da classe das aves.

2.8.2 Genótipo da galinhola euro Asiática

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 relacionados 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).

2.8.3 Genótipo do pato preto

Este genótipo foi identificado em um pato preto (MORGAN et al., 2001) apresentando similaridades 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 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 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.

2.8.4 Genótipos do Ganso I-V

Um estudo identificou *Cryptosporidium* sp. em gansos canadenses, onde as amostras de fezes foram coletadas em 13 locais em Ohio e Illinois (USA); após as caracterizações genéticas, estes foram nomeados de genótipos ganso I e II, além desses genótipos foi diagnosticado 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 Estados Unidos parasitados por *Cryptosporidium* sp., evidenciaram cinco genótipos do ganso (I-V). Assim como o genótipo do pato, estes parecem ter uma especificidade pelo hospedeiro da ordem dos Anseriformes.

Na tabela 3 encontram-se listadas as espécies de *Cryptosporidium* e genótipos que parasitam a classe das aves, de acordo com as ordens e sítios de infecção, confirmados pela análise molecular.

Tabela 3. Espécies de *Cryptosporidium* e genótipos identificados na classe das aves, de acordo com as ordens e sítios de infecção confirmados, pela análise molecular.

ESPÉCIES/ GENÓTIPOS	ORDENS DOS HOSPEDEIROS	SÍTIO DE INFECÇÃO*	REFERÊNCIA
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Columbiformes Galliformes Passeriformes Psittaciformes	Intestino delgado, Intestino grosso.	Morgan et al., 2000; Morgan et al., 2001; Glaberman et al., 2001; Ryan et al., 2003; Abe and Iseki, 2004; Huber et al., 2007; Pagés-Manté et al., 2007; Nakamura et al., 2009; Abe, Makino 2010; Wang et al., 2010; Qi et al., 2011; Berrilli et al., 2012; Silverlás et al., 2012; Wang et al., 2012; Baroudi et al., 2013; Wang et al., 2014; Li et al., 2013; Koompapong et al., 2014; Máca, Pavlásek, 2015; Reboredo-Fernández et al., 2015.
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Anseriformes Cathartiformes Charadriiformes Columbiformes Falconiformes Galliformes Gruiformes Passeriformes Piciformes Psittaciformes Strigiformes Struthioniformes	Bursa de Fabrício, Conjuntiva, Rins, Trato respiratório, Cloaca, Reto.	Morgan et al., 2001; Ryan et al., 2003; Abe and Iseki, 2004; Chvala et al., 2006; Ng et al., 2006; Huber et al., 2007; Van Zeeland et al., 2008; Kimura et al., 2004; Nakamura et al., 2009; Abe and Makino, 2010; Molina-López et al., 2010; Wang et al., 2010; Sevá et al., 2011; Qi et al., 2011; Wang et al., 2011; Wang et al., 2012; Coldwell et al., 2012; Schulze et al., 2012; Wang et al., 2012; Baroudi et al., 2013; Bougiouklis et al., 2013; Baines et al., 2014; Hamidinejat et al., 2014; Nakamura et al., 2014; Qi et al., 2014; Wang et al., 2014; Li et al., 2015; Máca, Pavlásek, 2015.
<i>Cryptosporidium galli</i>	Bucerotiformes Galliformes Passeriformes Psittaciformes Phoenicopteriformes	Proventrículo.	Rych et al., 2003; Ng et al., 2006; Antunes et al., 2008; Nakamura et al., 2009; Silva et al., 2010; Sevá et al., 2011; Qi et al., 2011; Nakamura et al., 2014.
Genótipo Avian I	Galliformes Passeriformes	ND	Ng et al., 2006; Nakamura et al., 2009.
Genótipo Avian II	Galliformes Psittaciformes Struthioniformes	Cloaca, Reto, Bursa de Fabrício.	Santos et al., 2005; Meireles et al., 2006; Ng et al., 2006; Nakamura et al., 2009; Sevá et al., 2011; Nguyen et al., 2013; Wang et al., 2014.
Genótipo Avian III	Passeriformes Psittaciformes Charadriiformes	Proventrículo.	Ng et al., 2006; Nakamura et al., 2009; Abe, Makino, 2010; Makino et al., 2010; Qi et al., 2011; Gomes et al., 2012; Koompapong et al., 2014; Ravich et al., 2014.
Genótipo Avian IV	Psittaciformes	ND	Ng et al., 2006; Abe, Makino, 2010; Qi et al., 2011.
Genótipo Avian V	Psittaciformes	ND	Abe, Makino, 2010; Qi et al., 2011; Nakamura et al., 2014.
Genótipo Avian VI	Passeriformes	Proventrículo.	Chelladurai, et al., 2016.
Genótipo Pato-Preto	Anseriformes	ND	Morgan et al., 2001; Jellison et al., 2004; Zhou et al., 2004.
Genótipo Galinhola Euro-asiática	Charadriiformes	Proventrículo.	Ryan et al., 2003; Ng et al., 2006.
Genótipo Ganso I	Anseriformes	ND	Xiao et al., 2002; Jellison et al., 2004; Zhou et al., 2004.
Genótipo Ganso II	Anseriformes	ND	Jellison et al., 2004; Zhou et al., 2004.
Genótipo Ganso III	Anseriformes	ND	Jellison et al., 2004.
Genótipo Ganso IV	Anseriformes	ND	Jellison et al., 2004.
Genótipo Ganso V	Anseriformes	ND	Jellison et al., 2004.

Fonte: Modificado de Meireles et al., 2015 e Zahedi et al., 2016.

* Não é mencionado em todos os trabalhos.

ND= Não definido.

2.9 Ocorrência de *Cryptosporidium* em aves

Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* têm sido registrados em mais de 30 diferentes espécies de aves no mundo distribuídas nas seguintes ordens: Anseriformes, Bucerotiformes, Cathartiformes, Charadriiformes, Cohimbiformes, Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Paseriformes, Piciformes, Phoenicopteriformes, Psittiformes, Strigiformes, Struthioniformes (ZAHEDI et al., 2016). Em aves a criptosporidiose se apresenta de três principais formas: respiratória, intestinal e renal, com manifestações clínicas ou subclínicas (SANTIN, 2013).

Grande parte dos estudos sobre criptosporidiose foram realizados em aves de corte como galinhas e perus. Kimura *et al.* (2004) analisaram isolados de *Cryptosporidium* oriundos de galinhas no Japão e identificaram *C. baileyi* após sequenciamento e análises filogenéticas. Wang *et al.* (2010) analisaram 2579 amostras fecais de galinhas poedeiras, frangos de corte e patos de Pequim oriundos de 46 granjas na Província de Henan (China), duas espécies de *Cryptosporidium* foram identificadas: *C. baileyi* (em 184 amostras) e *C. meleagridis* (em três amostras). Os autores chamam a atenção para o contato próximo entre humanos e galinhas em granjas, destacando que *C. meleagridis* é a terceira espécie mais comum diagnosticada em humanos e que potencialmente pode se tornar agente de uma doença emergente em algumas localidades da China. Baroudi et al. (2013) na Argélia, identificaram *C. meleagridis* em 34 % das galinhas e em 44 % dos perus. Os autores reforçam a importância desta espécie de *Cryptosporidium* na cadeia de transmissão zoonótica.

Alguns trabalhos sobre a criptosporidiose são realizados com avestruzes, criados em fazendas com a finalidade de agronegócios, fato que desperta o interesse para o diagnóstico de doenças. Oliveira *et al.* (2008) determinaram a prevalência de *Cryptosporidium* em avestruzes criados no estado do Rio de Janeiro, por meio da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada, sendo 44,4 % das amostras positivas. Wang *et al.* (2011) pesquisaram o parasito em avestruzes, criados em fazendas na China, sendo identificada a espécie *C. baileyi*. Os autores ressaltam que estudos de transmissão cruzada demonstraram que isolados de *C. baileyi* podem infectar galinhas e codornas. Nguyen *et al.* (2013) analisaram avestruzes de uma fazenda no Vietnã, utilizaram a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada e verificaram a positividade para oocistos de *Cryptosporidium* em 110 amostras (23,7 %), por meio de análises moleculares foi identificada infecção por *Cryptosporidium* genótipo Avian II.

Com relação a aves silvestres, Silva et al. (2008) analisaram fezes de 338 psitacídeos adultos, pertencentes a oito espécies, provenientes de um criadouro conservacionista e do Zoológico de Cachoeira do Sul, estado do Rio Grande do Sul, empregando como metodologias de diagnóstico, técnicas de centrifugação e flutuação e coloração de Zielh-Neelsen, obtiveram 180 amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium*. Sendo o primeiro registro de parasitismo por *Cryptosporidium* nas espécies de agapornis (*Agapornis fischeri*), arara Canindé (*Ara ararauna*) e papagaio charão (*Amazona pretrei*).

Há a necessidade de se realizar metodologias moleculares no diagnóstico para *Cryptosporidium* sp., isto porque, permite identificação das espécies presentes em determinados estudos, bem como de genótipos. Estudos moleculares auxiliam no entendimento da dinâmica de transmissão de *Cryptosporidium* e permitem verificar a presença de espécies de potencial zoonóticas ou não (RYAN et al., 2003; ALVES et al., 2005; MATSUBAYASHI et al., 2005; ROHELA et al., 2005; LIM et al., 2008; GEURDEN et al., 2009; WANG et al., 2011).

Morgan et al. (2000) realizaram a caracterização morfológica e genética de *Cryptosporidium* obtidos de Periquitos-de-colar (*Psittacula krameri*) e a espécie identificada foi *Cryptosporidium meleagridis*, registrando esta espécie em um hospedeiro da ordem Psittaciformes.

Abe e Isiki (2004) identificaram em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) duas espécies: *C. meleagridis* e *C. baileyi*, registrando pela primeira vez neste hospedeiro a infecção por *Cryptosporidium*. Estes autores sugerem que aves de estimação podem desempenhar um papel importante na epidemiologia da criptosporidiose e que há a necessidade da identificação correta deste agente etiológico, para uma melhor compreensão da epizootia desta infecção em aves visando o controle da criptosporidiose humana.

Ng et al. (2006) pesquisaram a presença de *Cryptosporidium* na Austrália e identificaram quatro espécies: *C. galli*, *C. baileyi*, *C. andersoni* e *C. muris* em aves das ordens: Psittaciformes, Passeriformes e Galliformes. Os autores sugerem que as aves podem ter um importante papel na epidemiologia de *Cryptosporidium* e que é necessário conhecer as adaptações entre parasitos e hospedeiros para compreender possíveis implicações em saúde pública.

Antunes et al. (2008) identificaram *Cryptosporidium galli* nas ordens Passeriformes (canários e curiós) e Psittaciformes (calopsitas), sendo que foi o primeiro registro da espécie em curiós (*Oryzoborus angolensis*).

Nakamura et al. (2009) estudaram aves mantidas em cativeiro e identificaram *C. baileyi* em urubu de cabeça preta (*Coragyps atratus*), em galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) e em canário da terra verdadeiro (*Sicalis flaveola*); *C. galli* em canário (*Serinus canaria*), calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e curió (*Oryzoborus angolensis*); *C. meleagridis* em galinha doméstica; *C. parvum* em calopsita; genótipo Avian I em canário e em um pavão-indiano (*Pavo cristatus*); genótipo Avian II em avestruz (*Struthio camelus*) e genótipo Avian III em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e agapornis (*Agapornis roseicollis*).

Silva et al. (2010), estudaram *Cryptosporidium* em aves da ordem Passeriformes (*Oryzoborus maximiliani*, *Oryzoborus angolensis*, *Cyanocompsa brissonii*, *Sporophila collaris*), criadas em aviários e identificaram *C. galli* em 91(24,5%) amostras de aves adultas e 14 (13%) jovens.

Sevá et al. (2011) realizaram um estudo em aves silvestres, onde foi diagnosticado *C. galli* em sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*), trinca ferro (*Saltator similis*), cigarrinha do norte (*Sporophila schistacea*), pintassilgo comum (*Carduelis carduelis*), canário da terra verdadeiro (*Sicalis flaveola*); *C. baileyi* nas seguintes espécies: pintassilgo comum (*Carduelis carduelis*), pixoxó (*Sporophila frontalis*), cardeal do nordeste (*Paroaria dominicana*) e canário da terra verdadeiro (*Sicalis flaveola*) e *Cryptosporidium* genótipo Avian II em periquito maracanã (*Aratinga leucophthalma*). Os autores sugerem que devem existir mais estudos contemplando aves silvestres.

Qi et al. (2011) pesquisaram *Cryptosporidium* em aves das ordens Passeriformes, Columbiformes e Psittacidae com um total de 12 espécies, que são comercializadas em aviários na China, estes autores, obtiveram uma prevalência de 8,1 % de aves infectadas por *Cryptosporidium*, sem que as mesmas apresentassem sinais clínicos. Após a caracterização genotípica três espécies foram identificadas (*C. baileyi*, *C. meleagridis* e *C. galli*) e dois genótipos (genótipo Avian III e o genótipo Avian IV). Devido a *C. meleagridis* apresentar potencial zoonótico, os autores relataram o risco à saúde humana.

Schulze et al. (2011) verificaram a infecção na bursa de Fabrício por *Cryptosporidium baileyi* em aves da família Anatidae (*Mergus serrator* – merganso de poupa) em um Zoológico da Alemanha, que vieram a óbito, estes autores sugeriram que a doença foi em decorrência da introdução de patos adultos nas instalações e enfatizaram que a quarentena é de fundamental importância antes da introdução de um novo animal no plantel.

Gomes et al. (2012) investigaram a presença de *Cryptosporidium* em aves exóticas, comercializadas em lojas de pequenos animais no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Do total de

103 amostras analisadas, sete (6,8 %) delas foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium*. A análise dos isolados revelou a presença de *Cryptosporidium parvum* em passeriforme originário da China, denominado manon (*Lonchura striata domestica*); Genótipo Avian III em Pada (*Padda oryzivora*) pássaro da Indonésia, e em calopsita (*Nymphicus hollandicus*).

Bosa (2014), após a análise de 79 amostras de aves da ordem Psittaciformes, um exemplar de ararajuba (*Guaruba guarouba*), dois exemplares de papagaio de cara roxo (*Amazona brasiliensis*) e um exemplar de papagaio de peito roxo (*Amazona vinacea*), após a caracterização genotípica foram diagnosticados como a espécie *C. galli*. Neste trabalho, nenhum dos animais positivos apresentou sinais clínicos, fato que corrobora com os achados de Ng *et al.* (2006) e Wang *et al.* (2011). Em psitacídeos, a criptosporidiose já foi relatada em diversas espécies, aquelas comuns em cativeiro, como papagaios (DOSTER *et al.*, 1979), periquitos australianos (GOODWIN & KRABILL, 1989), maritacas e araras (LEY *et al.*, 1988).

Fernandez *et al.* (2015) ao analisarem amostras de fezes obtidas de 433 aves silvestres em centros de recuperação de animais selvagens na Galiza, Espanha, detectaram através da imunofluorescência, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. Neste trabalho, foi descrito pela primeira vez *Giardia* sp. em *Tyto alba* e *Caprimulgus europaeus* e *Cryptosporidium* sp. em *Apus apus*, *Athene noctua*, *C. europaeus*, *Falco tinnunculus*, *Morus do bassanus*, *Parabuteo unicinctus* e *Strix aluco*. Através do diagnóstico molecular foi diagnosticado: *Giardia duodenalis* genótipo B em *Buteo buteo*, *Coturnix coturnix* e *Pica pica*, o genótipo D em *Garrulus glandarius* e o genótipo F em *Anas platyrhynchos*; *Cryptosporidium parvum* em *Accipiter nisus*, *B. buteo*, *Milvus migrans*, *Pernis apivorus* e *P. pica*; *Cryptosporidium meleagridis* em *Streptopelia turtur*. Os autores demonstram a ampla disseminação de *Giardia* e *Cryptosporidium* entre aves silvestres e que o diagnóstico de *C. meleagridis* em rola comum ou rola brava (*Streptopelia turtur*) amplia o alcance deste enteropatógeno em outros hospedeiros aviários levantando questões sobre o potencial de transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* de pombas para os seres humanos.

Majewska *et al.* (2009), em um estudo conduzido na Polônia, analisaram a importância das aves livres na natureza, em cativeiro e domésticas, envolvidas na contaminação ambiental com oocistos de *Cryptosporidium parvum* e cistos de *Giardia lamblia*. Os autores diagnosticaram com mais frequência estes agentes etiológicos em amostras fecais de aves aquáticas de vida livre do que em aves não normalmente associadas com água. Os autores enfatizam a importância de aves aquáticas representando um vínculo epidemiológico em

ciclos de transmissão associadas à água, e que essas aves desempenham um papel significativo na contaminação ambiental dos habitats aquáticos com esses patógenos antropozoonóticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e procedimentos de coleta das amostras fecais

As amostras fecais foram colhidas de um Criadouro Comercial legalizado junto ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), localizado na Zona Oeste do Município do Rio de Janeiro/RJ, no Bairro de Guaratiba. Este criadouro apresenta licença para reprodução e comercialização de aves destinadas para pets, exportação e outros criadouros. No local, há várias famílias de aves, sendo que neste trabalho somente amostras de fezes de duas famílias (Ramphastidae e Psittacidae) foram pesquisadas para a presença de *Cryptosporidium* sp.

As coletas das amostras fecais foram realizadas no criadouro e apresentavam-se dentro dos padrões de normalidade. Para coleta, foi colocado um plástico que cobria o fundo das instalações das aves (Figura 2) e que após 12 horas eram retirados. A retirada das fezes do plástico era realizada com o auxílio de uma espátula descartável. Após a coleta, as fezes foram transferidas para recipientes estéreis com solução fisiológica, identificadas com os dados de cada animal e acondicionadas em isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.2 Descrições do criatório

As aves da família Ramphastidae estavam dispostas em recintos telados completamente, com divisão entre os recintos evitando o contato entre as aves para promoção de conforto e a fim de evitar brigas por serem territorialistas (Figura 3). Cada recinto medindo 2,00m x 3,00m x 1,20m, eram suspensos do solo de 0,60m a 0,80m evitando o contato das aves com os excrementos. As aves eram alimentadas com ração própria para tucanos e porção diária de frutas e legumes da época fatiados e distribuídos em potes. Recebiam água potável oriunda da distribuidora local em potes próprios, substituídas duas vezes ao dia. Em cada instalação eram colocados casais buscando a reprodução, porém, haviam aves que se encontravam sozinhas por recinto. Em relação às condições higiênicas sanitária das instalações, estas foram classificadas como satisfatórias, havendo limpeza periodicamente.



Figura 2. Imagem geral do fundo das instalações das aves com o plástico no fundo para as coletas das amostras fecais.



Figura 3. Imagem das instalações das aves representantes da família Ramphastidae.

Desta família foi avaliado um total de 37 amostras: *Ramphastus toco* (Tucano toco) 28 amostras; *Ramphastus tucanus* (Tucano grande de papo branco) quatro amostras;

Ramphastus dicolorus (Tucano de bico verde) duas; *Pteroglossus bailloni* (Araçari banana) duas; *Selenidera maculirostris* (Araçari poca) uma.

As aves da família Psittacidae estavam dispostas em instalações onde, geralmente havia casais nos recintos, mas quando existiam aves “solteiras”, estas eram colocadas individualmente (Figura 4). As instalações mediam 2,00m x 2,00m x 1,20m, eram suspensas do solo de 1,00m a 1,40m, teladas ao fundo evitando o contato das aves com o solo e excretas. Eram alimentadas com ração industrializada peletizada e recebiam como complemento porções diárias de frutas e legumes, da estação, fatiados. Era fornecida água potável da distribuidora local com bebedouros de pressão. A relação condição higiênico sanitárias das instalações também foram classificadas como satisfatórias, da mesma forma que nas instalações das aves da família Ramphastidae, havia limpeza periodicamente.



Figura 4. Imagem das instalações das aves representantes da família Psittacidae.

O criadouro apresentava assistência veterinária constante e exames de rotina são realizados no plantel, como Clamidiose, Salmonelose e Parasitológico de fezes. Quando eram introduzidas aves oriundas de outro plantel, estas eram postas em quarentena e eram realizados exames para Clamidiose, Salmonelose, Parasitológico de fezes, Circovirus, Herpesvírus e Polyomavírus. Anti-helmínticos eram administrados as aves do plantel

principalmente nos filhotes, já nas aves de quarentena eram administrados antiparasitários tanto para ectoparasitos quanto para endoparasitos.

Desta família foi avaliado um total de 48 amostras: *Psittacus eritachus* (Exótica) (Papagaio do Congo) 14 amostras; *Ara ararauna* (Arara canindé) quatro; *Ara macao* (Arara Macau) uma; *Amazona aestiva* (Papagaio verdadeiro) 19; *Ecletus roratus* (Exótica) (Papagaio ecletus) oito e duas *Pionites leucogaster* (Marianinha da cabeça amarela).

Segue nos anexos 1 e 2 algumas outras descrições sobre as espécies das famílias utilizadas no estudo.

3.3 Processamento das amostras fecais e Diagnóstico Microscópico

No laboratório, as amostras foram catalogadas, processadas e diagnosticadas por meio da microscopia óptica quanto à presença de *Cryptosporidium* spp.

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 15mL 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, na segunda centrifugação, os 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 e 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*, o sedimento fecal acondicionado no tubo de 15mL foi preservado sob-refrigeração, para posterior extração de DNA e as análises subsequentes.

3.4 Extração de DNA

Os procedimentos de extração de DNA genômico, realização da 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* sp. na microscopia, foi realizada a extração de DNA. Esta foi realizada utilizando-se 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. Sendo estas, referentes aos dois períodos de incubação do material onde as amostras foram submetidas a uma temperatura de 95°C, com uma incubação mais longa de 10 minutos, utilizando um agitador com controle de temperatura, a uma rotação de 800 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).

3.5 Reações de PCR Primária 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., 1999; 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., 1999; FAYER et al., 2010).

Como controle positivo para *Cryptosporidium* foi utilizado uma amostra de bezerro na amplificação da PCR primária e para nested-PCR, tendo como número de acesso no Genbank - DQ885333, espécie *C. parvum*. Já para o controle negativo, foi utilizado água ultrapura.

Na realização das reações da PCR primária, foram utilizados 4 mM de MgCl₂ (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), 1 µL de DNA da amostra e água ultrapura (‘Nuclease-free water’ – Promega) até completar o volume final de 25 µL.

Para a reação da Nested-PCR foram utilizadas as mesmas condições da PCR primária, exceto pela diminuição da concentração de MgCl₂ que passou a ser 2 mM e a utilização de 0,2 µM do ‘primer’ 18SNF e 0,2 µM do ‘primer’ 18SNR.

Os ciclos termais utilizados para a realização das reações da 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 através de um gradiente de temperatura que variou de 58°C (PCR primária) e 59°C (PCR secundária) por 45 segundos e a extensão da cadeia de DNA dos produtos formados 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 amostra foram retirados do termociclador e 5 µL do material visualizado através da eletroforese em gel de agarose a 1,5% (100V por 40 minutos), corado com brometo de etídio (5µg/mL). O tampão de amostra utilizado foi ‘loading buffer’ 6X – tipo III (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e o marcador usado como peso molecular foi ‘1Kb Plus DNA Ladder’ (Invitrogen). Os géis de agarose foram posteriormente observados sob luz ultravioleta, analisados e fotografados.

3.6 Sequenciamento e Análise Filogenética

3.6.1 Purificação dos produtos da Nested-PCR e sequenciamento

Todas as amostras obtidas através da reação da Nested-PCR foram coradas pelo brometo de etídio e observadas em gel de agarose, sendo posteriormente purificadas utilizando ExoSAP-IT® (Promega), 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 Nested-PCR, cada amostra foi sequenciada uma vez no sentido *forward* e uma no sentido *reverse*.

3.6.2 Análise das sequencias

A análise dos cromatogramas e edição das sequencias 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 e possíveis homologias e similaridades com espécies previamente depositadas no 'GenBank'.

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 1.

3.6.3 Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o 'software' MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Como teste filogenético foi realizado 'bootstrap' com 1000 réplicas, das quais foram construída 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 2. 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.

ESPÉCIES e GENÓTIPOS	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUENCIA NO GenBank	AUTOR	LOCAL	HOSPEDEIRO ORIGINÁRIO
Avian genotype I	GQ227479	Nakamura et al., 2009	Brasil	Canário (<i>Serinus canaria</i>)
Avian genotype II	DQ002931	Meirelles et al., 2006	Brasil	Avestruz (<i>Struthio camelus</i>)
Avian genotype III	AB471641	Makino et al., 2010	Japão	“Passaro do amor” <i>Agapornis roseicollis</i>
	FJ205700	Feng et al., 2009	China	Amostra ambiental (águas residuais)
	GQ227480	Sevá et al., 2009	Brasil	“Passaro do amor” <i>Agapornis roseicollis</i>
	GU074384	Gomes et al., 2012	Brasil	Calafate <i>Padda oryzivora</i>
	HM116385	Qi et al., 2011	China	black-billed magpie (<i>Pica pica</i>)
	KF994570	Prystajecy et al., 2014	Canadá	Amostra ambiental (águas superficiais)
Avian genotype V	HM116381	Qi, et al., 2011	China	Calopsita (<i>Nymphicus hollandicus</i>)
Duck genotype	AY504514	Zhou et al., 2004	USA	Ganso do Canadá (<i>Branta canadensis</i>)
Goose genotype I	AY120912	Xiao et al., 2002	USA	Ganso do Canadá (<i>Branta canadensis</i>)
Goose genotype II	AY504515	Zhou, et al., 2004	USA	Ganso do Canadá (<i>Branta canadensis</i>)
<i>C. andersoni</i>	AB089285	Koyama et al., 2005	Japão	Bovinos (<i>Bos taurus</i>)
<i>C. baileyi</i>	EU814429	Wang et al., 2010	China	Patos (<i>Anas platyrhynchos</i>)
	GU377276	Wang et al., 2011	China	Avestruz (<i>Struthio camelus</i>)
	HM116378	Qi et al., 2011	China	Mandarim (<i>Taeniopygia guttata</i>)
	HM116380	Qi et al., 2011	China	black-billed magpie (<i>Pica pica</i>)
	JX548296	Wang et al., 2014	China	Galinhas (<i>Gallus gallus</i>)
<i>C. canis</i>	AF112576	Xiao et al., 1999	USA	Cão (<i>Canis lupos familiaris</i>)
<i>C. felis</i>	AF112575	Xiao et al., 1999	USA	Gato (<i>Felis catus domesticus</i>)
<i>C. galli</i>	EU543270	Antunes et al., 2008	Brasil	Lesser seed-finches (<i>Oryzoborus angolensis</i>)
	GU734646	Silva et al., 2010	Basil	Rusty-collared seedeater (<i>Sporophila collaris</i>)
	GU734647	Silva et al., 2010	Brasil	Azulão (<i>Cyanocopsa brissonii</i>)
	HM116387	Qi, et al., 2011	China	Silver-eared Liocichla (<i>Leiothrix argentauris</i>)
	HM116388	Qi, et al., 2011	China	Bombycilla garrulus (Syn. Bohemian Waxwing)
<i>C. hominis</i>	KP314259	Liu, et al., 2015	China	Macaco esquilo (<i>Saimiri sciureus</i>)

Quadro 2. 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>	AF180339	Wang et al., 2010	China	Pombo (<i>Columba livia</i>)
	KP730310	Vermeulen et al., 2015	Austrália	Cangurus (<i>Petrogale penicillata</i>)
	JQ217141	Wang et al., 2012	China	Codornas (<i>Coturnix coturnix japonica</i>)
	JX548298	Wang et al., 2014	China	Pintos (<i>Gallus gallus</i>)
	EU814439	Morgan et al., 2000	Austrália	Periquito de colar (<i>Psittacula krameri</i>)
<i>C. muris</i>	AY642591	Hikosaka, Naka, 2005	Japão	Rato de campo japonês (<i>Apodemus speciosus</i>)
<i>C. parvum</i>	L25642	Kilani, Wenman, 1994	Canadá	Bovino (<i>Bos taurus</i>)
<i>C. suis</i>	AF108861	Morgan et al., 1999	Austrália	Suíno (<i>Sus scrofa</i>)
<i>C. serpentis</i>	AF151376	Kimbell et al., 1999	USA	Cobra do milho (<i>Elaphe guttata guttata</i>)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diagnóstico microscópico de *Cryptosporidium* sp. em aves das famílias Ramphastidae e Psittacidae

Neste estudo, de um total de 85 amostras fecais de aves, sendo 48 de psitacídeos e 37 de ramphastídeos, 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* sp. (Figura 5). Somente as amostras fecais da família Ramphastidae apresentou positividade, nesta tendo três espécies de tucanos parasitadas: seis amostras em exemplares de *Ramphastus toco*, duas em *Ramphastus tucanus* e uma em *Pteroglossus bailloni*. Não foi diagnosticado por esta técnica, nenhum outro agente etiológico parasitário nas amostras fecais das duas famílias estudadas. A utilização desta técnica se baseia no princípio de que os ovos de helmintos que são menos densos que o meio fluido de flutuação, irão flutuar para o topo do recipiente, onde poderão ser coletados para uma avaliação microscópica. Baseando neste princípio, não foi diagnosticado nenhum helminto, sendo que, esta solução não irá flutuar a maioria dos ovos de trematódeos, alguns cestóides e helmintos.

Cryptosporidium spp. é amplamente aceito como uma causa de gastroenterite. Vários métodos têm sido aplicados para detectar oocistos nas fezes, mas as dificuldades de discriminar entre oocistos e outras estruturas similares, somente com um bom treinamento. Os oocistos apresentam-se com parede lisa, incolor, de forma esférica a subsférica, com quatro esporozoítas alongados no seu citoplasma e um corpo residual (SMITH, 2007).

Neste trabalho, nas amostras positivas para *Cryptosporidium* sp. foram encontradas pouca quantidade de oocistos por lâmina (< 20) por amostras analisadas, estas observações estão de acordo com Gomes et al. (2012), que trabalharam com aves silvestres no Brasil. As baixas taxas de infecção em aves silvestres, e a pouca quantidade de oocistos diagnosticados em amostras fecais, são relatadas na literatura. Ng et al. (2006) ao estudarem a presença de *Cryptosporidium* em aves de cativeiro, além da baixa prevalência de infecção, também não conseguiram números significantes de oocistos por campo de lâminas analisadas.

A eliminação de oocistos em um número baixo nas aves silvestres poderia estar sendo influenciada pela idade das aves, já que a maioria é comercializada adulta e

imunologicamente superariam doença clínica e, provavelmente, se caso viessem a adquirir o protozoário, o número oocistos eliminados seria muito baixo (GOMES et al., 2009; ANTUNES et al., 2008).

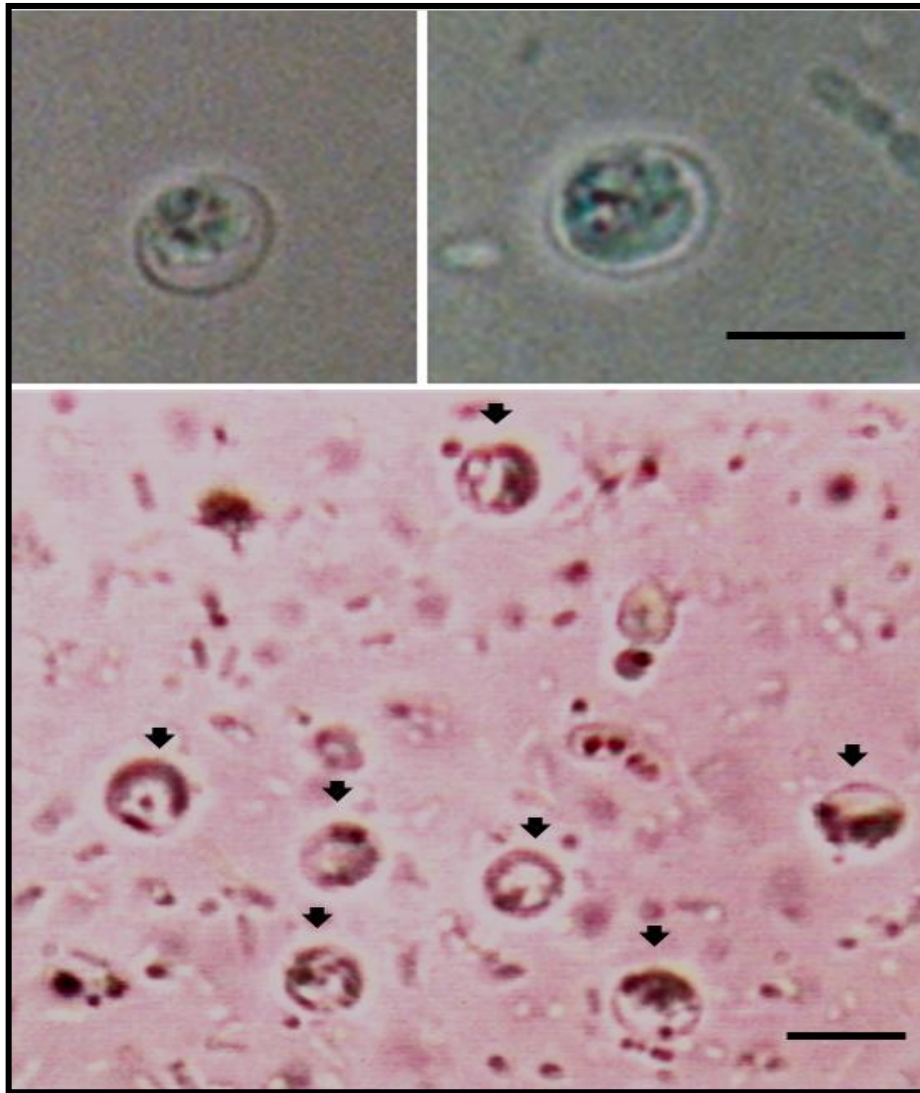


Figura 5. Oocistos de *Cryptosporidium* sp. observados na microscopia óptica após a utilização da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar (■), provenientes de amostras fecais de aves da família Ramphastidae de um criadouro localizado no Rio de Janeiro(— = 10 μ m).

Entretanto, deve ser ressaltado que a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium*, pelo hospedeiro, é intermitente em indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Desta maneira, várias amostras de fezes devem ser analisadas antes de ser emitido um diagnóstico final (CURRENT; GARCIA, 1991). No presente estudo, foi realizada coleta de amostras únicas, enfatizando que o número de coletas por indivíduo é de extrema relevância para a obtenção de um resultado satisfatório através de exames microscópicos, quanto maior o número de amostras por indivíduo, maior as chances de se obter positividade no diagnóstico para *Cryptosporidium*, principalmente em ambientes onde há a infecção (FAYER; XIAO, 2008). Coletas múltiplas de amostras fecais poderiam ter sido feitas no criatório do estudo, já que foi diagnosticada a infecção em algumas espécies de aves, provavelmente existiria a contaminação ambiental e também pelo fato da eliminação dos oocistos serem intermitente.

No presente estudo, sugere-se que possivelmente aves livres poderiam ser as principais disseminadoras de oocistos de *Cryptosporidium* para o ambiente do criatório, já que muitas das vezes eram visualizadas no entorno ou muito próximas desses ambientes, sobre e até mesmo dentro das instalações dos animais. Estas aves de vida livre principalmente as pombas e rolinhas (*Patagioenas picazuro*, *Columbina*) (Figura 6), estão neste ambiente em busca de alimentos e água, com isto podendo defecar nestes locais, o que era comum, favorecendo a disseminação de oocistos nas instalações e podendo promover a infecção das aves do criatório. Durante o acondicionamento das fezes nos recipientes de coleta, teve-se o cuidado de verificar através dos padrões das fezes, se haviam outras amostras fecais que não fosse da espécie do recinto de criação, exemplo, das espécies de aves de vida livre.

A questão das aves livres como possíveis disseminadoras da forma infectante de *Cryptosporidium*, já foi mencionada por Fernandez, et al. (2015) que diagnosticaram *C. meleagridis* em rola comum ou rola brava (*Streptopelia turtur*) e sugerem que esta ave poderia disseminar este enteropatógeno para outros hospedeiros da classe das aves, assim como também para humanos, já que estes são susceptíveis a infecção por esta espécie.

Outra sugestão da possível infecção por *Cryptosporidium* nas aves deste estudo, poderia ser aplica a questão da água, sabe-se que *Cryptosporidium* é de veiculação hídrica que infectam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, inclusive humanos (FAYER; XIAO, 2008). Sabe-se também, que a cloração da água representa um benefício indiscutível à saúde humana, uma vez que o cloro é um desinfetante comum capaz de destruir e/ou inativar a maioria dos microrganismos patogênicos transmitidos pela água (SANTOS, 2011). Porém, os processos convencionais de tratamento da água não são totalmente eficientes para certos

parasitoss, como os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* (ROSE; HUFFMAN, 2002), que possuem oocistos e cistos, respectivamente, resistentes aos processos de cloração e ao aumento de temperatura, permanecendo viáveis por muito tempo no ambiente.



Figura 6. Imagem de aves de vida livre representantes da ordem Columbiformes, família Columbidae (A e B = *Patagioenas picazuro* - Pombão, asa branca, C= *Columbiga* (○), C= um exemplar da família Psittacidae (△) que comumente são observadas no entorno e no interior das instalações das aves do estudo.

Na literatura, há relatos da presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas subterrâneas e em águas superficiais, incluindo lagos, mares e rios, bem como em água tratada (JUÁREZ-FIGUEROA et al., 2003; SHORTT et al., 2006; SUNDERLAND et al., 2007; PLUTZER et al., 2008; AZMAN et al., 2009).

Feng et al. (2009), analisaram amostras de águas residuais domésticas, coletadas de quatro estações de tratamento em Xangai, China. Para o diagnóstico, foram utilizadas técnicas moleculares usando enzimas de restrição - RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfism) e os genes alvo 18S e o da glicoproteína 60 kDa (GP60). Estes autores relataram a presença de *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. bailey*, *C. suis*, genótipo do rato, genótipo Avian III e um novo genótipo, não compatível com nenhuma sequência depositada no Genbank. Essas espécies e genótipos diagnosticados foram de encontro aos hábitos alimentares da população, onde se abatiam animais de produção, assim como roedores e várias espécies de aves, além de fezes humanas que eram depositadas nestes ambientes. Este trabalho também enfatiza a contaminação ambiental, favorecendo a infecção de *Cryptosporidium* a vários hospedeiros susceptíveis.

Como as bacias hidrográficas são vulneráveis à contaminação por *Cryptosporidium* tanto de caráter zoonótico e não zoonótico, provenientes de animais silvestres, faz-se necessário uma detecção correta e sensível de oocistos de *Cryptosporidium* em águas identificando espécies e/ou genótipo para uma avaliação do risco de transmissão de águas de nascente (Li et al., 2015).

4.2 Ocorrência de *Cryptosporidium* em aves das famílias Ramphastidae e Psittacidae

Nas Tabelas 4 e 5 encontram-se o número total de amostras fecais analisadas para as duas famílias de aves utilizadas no estudo, indicando as espécies, o seu número total e o percentual de parasitismo por *Cryptosporidium* sp. Nas Figuras 7 e 8 encontram-se imagens das espécies de aves separadas por famílias que foram analisadas neste estudo; vale ressaltar que na família Ramphastidae, as imagens que estão com letras de cor vermelha, referem-se às espécies que se apresentavam parasitadas.

Papini *et al.* (2012) analisaram a presença de endoparasitos em aves do Zoológico de Giardino (Itália) e de lojas para comercialização de aves. Após o sequenciamento de amostras positivas, os autores relataram a presença de *Cryptosporidium* em *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro), *Platycercus eximius* (roselha-do-leste) e *Psittacula eupatria*

(periquito-alexandrino), todos pertencentes ao grupo dos psitacídeos. Sendo que no presente estudo nenhuma das aves cativa da família Psittacidae apresentou-se parasitada.

Tabela 4. Número total de amostras por espécies da família Psittacidae e seus diagnóstico parasitológico, utilizando a técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar.

FAMÍLIA PSITTACIDAE			
Espécie / Nome Vulgar	Número Total de Amostras	Diagnóstico Parasitológico	
		Helmintos	<i>Cryptosporidium</i> sp.
<i>Psittacus eritachus</i> (Papagaio do Congo) (Exótica)	14	--	--
<i>Ara ararauna</i> (Arara canindé)	04	--	--
<i>Ara macao</i> (Arara Macau)	01	--	--
<i>Amazona aestiva</i> (Papagaio verdadeiro)	19	--	--
<i>Ecletus roratus</i> (Papagaio ecletus) (Exótica)	08	--	--
<i>Pionites leucogaster</i> (Marianinha da cabeça amarela)	02	--	--
Total de amostras	48	--	--

Tabela 5. Número total de amostras por espécies da família Rhamphastidae e seus diagnóstico parasitológico, utilizando a técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar.

FAMÍLIA RHAMPHASTIDAE			
Espécie / Nome Vulgar	Número Total de Amostras	Diagnóstico Parasitológico	
		Helmintos	<i>Cryptosporidium</i> sp.
<i>Ramphastus toco</i> (Tucano toco)	28	--	06 16,21%
<i>Ramphastus tucanus</i> (Tucano grande de papo branco)	04	--	02 5,40%
<i>Ramphastus dicolorus</i> (Tucano de bico verde)	02	--	-- --
<i>Pteroglossus bailloni</i> (Araçari banana)	02	--	01 3,70%
<i>Selenidera maculirostris</i> (Araçari poca)	01	--	-- --
Total de amostras	37	--	09 24,32%



Figura 7. Espécies da família Ramphastidae analisadas neste estudo: A= *Ramphastus toco* (Tucano toco), B= *Ramphastus tucanus* (Tucano grande de papo branco), C= *Ramphastus dicolorus* (Tucano de bico verde), D= *Pteroglossus bailloni* (Araçari banana) e E= *Selenidera maculirostris* (Araçari poca).



Figura 8. Espécies da família Psittacidae analisadas neste estudo: A= *Psittacus eritachus* (Papagaio do Congo) (Exótica), B= *Ecletus roratus* (Papagaio ecletus) (Exótica), C= *Ara macao* (Arara Macau), D= *Ara ararauna* (Arara canindé), E= *Amazona aestiva* (Papagaio verdadeiro), F= *Pionites leucogaster* (Marianinha da cabeça amarela).

A infecção em aves silvestres por *Cryptosporidium* já foi relatada por Lindsay et al. (1990) que diagnosticaram o protozoário em aves da ordem Passeriformes de zoológico e aves destinadas como animais de estimação. Nestas aves a infecção teve como sítio de parasitismo o proventriculo. Latimer et al. (1992) diagnosticaram a infecção por *Cryptosporidium* que foi causa da morte de quatro calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) alojadas em zoológico. Ng et al. (2006) e Antunes et al. (2008) detectaram *Cryptosporidium* em isolados de várias aves silvestres, entre elas calopsitas e canários (*Serinus canaria*). Gomes et al., (2012) identificaram a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes de manon (*Lonchura striata domestica*) e calafate (*Padda oryzivora*), sendo o primeiro relato no Brasil, nestas aves.

As taxas de ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em aves silvestres variam entre os autores, as observadas por Gomes et al. (2012) foram similares as encontradas por Ng et al. (2006), que obtiveram 6,3% em aves de cativeiro. Já, Nakamura et al. (2009), encontraram 4,86 % das amostras positivas. Estas taxas são consideradas baixas quando comparadas a outras encontradas em aves domésticas e em patos silvestres (GOMES et al., 2009; GRAKZYC et al., 1996), isso muito provavelmente pelo fato de aves silvestres quando estudadas, serem adultas.

Alguns estudos tem sido conduzidos para a elucidação dos fatores de risco para a infecção por *Cryptosporidium* principalmente para ruminantes domésticos (NORDEEN et al., 2001; CAUSAPÉ et al., 2002; HOAR et al., 2001), com destaque para fatores como idade do hospedeiro e tipos de manejo fornecido a esses animais, porém para aves poucos são os trabalhos desenvolvidos em relação à associação de fatores de risco para a infecção por *Cryptosporidium* sp.

Há relato que a idade é um dos fatores mais importantes para aquisição da infecção pelo protozoário, já que esse é um patógeno oportunista e, assim, animais mais jovens se apresentariam com uma maior susceptibilidade à infecção. Em estudos de infecção experimental em frangos de corte, observou-se que animais mais velhos demonstraram maior resistência à *Cryptosporidium*, pelo fato de terem apresentado um maior período pré-patente, ou seja, maior resistência à exposição ao agente etiológico, e um período patente menor. Este fato é explicado por esses animais apresentarem o sistema imunológico mais desenvolvido, capazes de combater a infecção comparando-se com os animais mais jovens, que apresentaram períodos mais longos de eliminação de oocistos (TUMOVÁ et al., 2002).

No criadouro onde se encontravam as aves deste estudo, nenhuma delas apresentou sintomatologia clínica, tanto referente às gastrointestinais quanto a outras manifestações de alguma outra infecção, todas independentes de estarem parasitadas ou não, encontravam-se com fezes dentro dos padrões de normalidade, este padrão estando de acordo com as características de cada espécie estudada somando-se a sua dieta alimentar. Este fato também poderia estar associado ao fator idade dos animais, como já foi mencionado acima. Neste trabalho, daquelas aves parasitadas, oito eram adultas e uma delas apresentava-se com um ano de idade, significando que ainda não tinha adquirido o amadurecimento sexual, considerada como uma ave jovem. No Anexo I e II, encontram-se informações sobre a idade de cada indivíduo utilizado neste estudo.

Os fatores de risco para a infecção estão intimamente relacionados à facilidade de dispersão ambiental dos oocistos de *Cryptosporidium*. Fatores relacionados à higiene estão entre os fatores de risco para a infecção (JOACHIN, 2004), assim podemos associar que limpezas periódicas de gaiolas e bebedouros diminuem a infecção pelo protozoário, conseqüentemente, diminuindo o tempo de exposição a possíveis oocistos em fezes contaminada nesses ambientes.

A idade dos animais neste estudo pode ter influenciado nos resultados pela questão do amadurecimento imunológico dos animais, mas também não devemos descartar que os ambientes desta criação apresentavam um bom manejo higiênico sanitário, instalações e alimentação dentro dos padrões considerados satisfatórios, isto estando diretamente relacionado ao bem estar do animal e somando-se a isto um bom estado imunológico.

Como os animais são principais fontes de eliminação de oocistos no ambiente, a diminuição da contaminação ambiental promovida por limpeza da área, reduz o risco da infecção por *Cryptosporidium* sp. (CAUSAPÉ et al., 2002). Ng et al. (2006) verificaram que baixas taxas de infecção em aves estão relacionadas ao manejo eficiente encontrado nos aviários, como por exemplo, as medidas de higiene e a salubridade das criações. Entretanto, no presente estudo as condições sanitárias observadas foram de boa qualidade, havendo limpeza periódica nas instalações, alimentação adequada e assistência veterinária periódica.

Garber et al. (1994) relataram que a aglomeração de animais pode constituir um risco a ocorrência de doenças infecciosas, pois o intenso contato entre eles facilitaria a infecção. Este fato, não foi observado nas instalações do sistema de criação das aves utilizadas neste estudo.

4.3 Diagnóstico Molecular: PCR primária e Nested-PCR

As nove amostras dos representantes da família Ramphastidae que foram diagnosticadas positivas para *Cryptosporidium* pela visualização de oocisto na microscopia, foram submetidas ao diagnóstico molecular. Em nenhuma das reações da PCR primária de DNA obtido de 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 pb. Este resultado, confirma que houve amplificação primária do gene alvo 18S para *Cryptosporidium* sp. (XIAO et al., 2000), pelo menos no controle positivo.

O resultado não observável, para amostras de aves, deve-se pelo fato de que a detecção do DNA por meio da PCR simples é considerada inviável quando há baixa quantidade de DNA ou inibidores enzimáticos presentes na amostra, e o uso da PCR secundária, aumentaria a especificidade e sensibilidade dos testes (MORGAN; THOMPSON, 1998), sendo mais eficiente na amplificação.

Nas reações da Nested-PCR foram observados amplicons com aproximadamente 830 pb (Figura 9), confirmando que a região do gene alvo foi amplificada para *Cryptosporidium* sp. (XIAO et al., 2000). Estes dados comprovam que da PCR secundária é necessária para aumentar a sensibilidade, já que uma segunda amplificação aumenta a quantidade de DNA em pelo menos o dobro, e também por utilizar um par de primers espécie-específica aumenta a sensibilidade da técnica da PCR (MORGAN; THOMPSON, 1998).

Os resultados das amostras positivas diagnosticadas pela microscopia foram em concordância com resultados da Nested PCR e amplicons de todas as amostras positivas na Nested- PCR, foram sequenciados.

4.4 Análise das sequencias e Filogenia

Das amostras que amplificaram na Nested-PCR para o gene 18S, uma amostra (T5) apresentou o sequenciamento de má qualidade e foi descartada. Na tabela 5 encontram-se o tamanho das sequencias obtidas após análise da qualidade dos cromatogramas.

As sequencias obtidas neste estudo, foram alinhadas (Figura 10) e observou-se que as oito amostras mostraram-se idênticas entre si. Deste modo, foram depositadas no GenBank somente três sequencias, cada uma correspondente a uma espécie de hospedeiro

(*Ramphastus toco*, T1 = KU885387; *Ramphastus tucanus*, T2 = KU885388; *Pteroglossus bailloni*, T8 = KU885389).

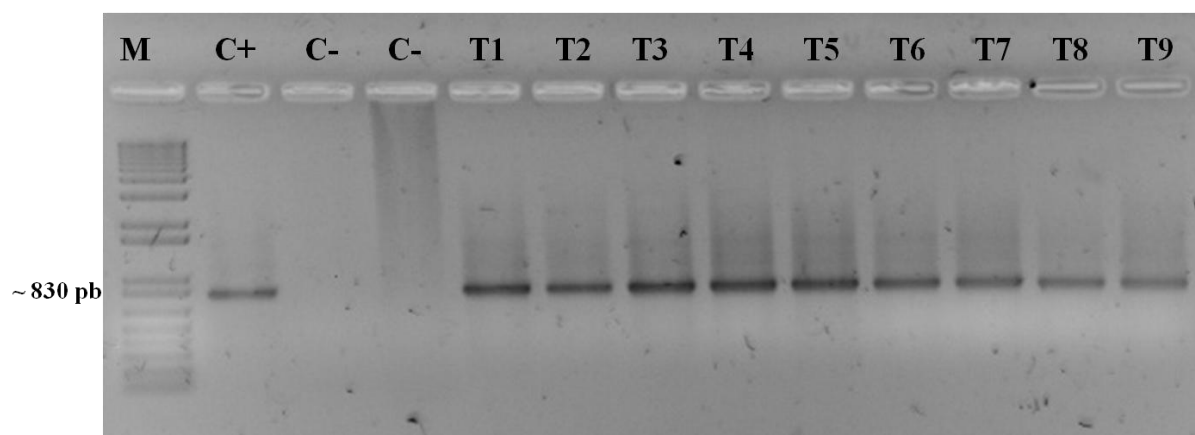


Figura 9. Amplificação pela Nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* sp. provenientes das espécies da família Ramphastidae. M = marcador de peso molecular, C+ = controle positivo (*C. parvum*) e C - = controle negativo (água ultrapura).

Tabela 6. Tamanho das sequencias obtidas de *Cryptosporidium* após análise da qualidade dos cromatogramas de acordo com as espécies de hospedeiros.

NOME	ESPÉCIE DE HOSPEDEIRO	IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA	TAMANHO DO FRAGMENTO
T1	<i>Ramphastus toco</i>	TCB1 (F) e TCB2 (R)	678pb
T2	<i>Ramphastus tucanus</i>	TCB3 (F) e TCB4 (R)	698pb
T3	<i>Ramphastus tucanus</i>	TCB5 (F) e TCB6 (R)	670pb
T4	<i>Ramphastus toco</i>	TCB7 (F) e TCB8 (R)	664pb
T5	<i>Ramphastus toco</i>	TCB9 (F) e TCB10 (R)	Sequencia descartada
T6	<i>Ramphastus toco</i>	TCB11 (F) e TCB12 (R)	728pb
T7	<i>Ramphastus toco</i>	TCB13 (F) e TCB14 (R)	727pb
T8	<i>Pteroglossus bailloni</i>	TCB15 (F) e TCB16 (R)	727pb
T9	<i>Ramphastus toco</i>	TCB17 (F) e TCB18 (R)	738pb

Figura 10. Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes das três espécies de tucanos evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.), tamanho da sequencia utilizada para comparação: 652pb.

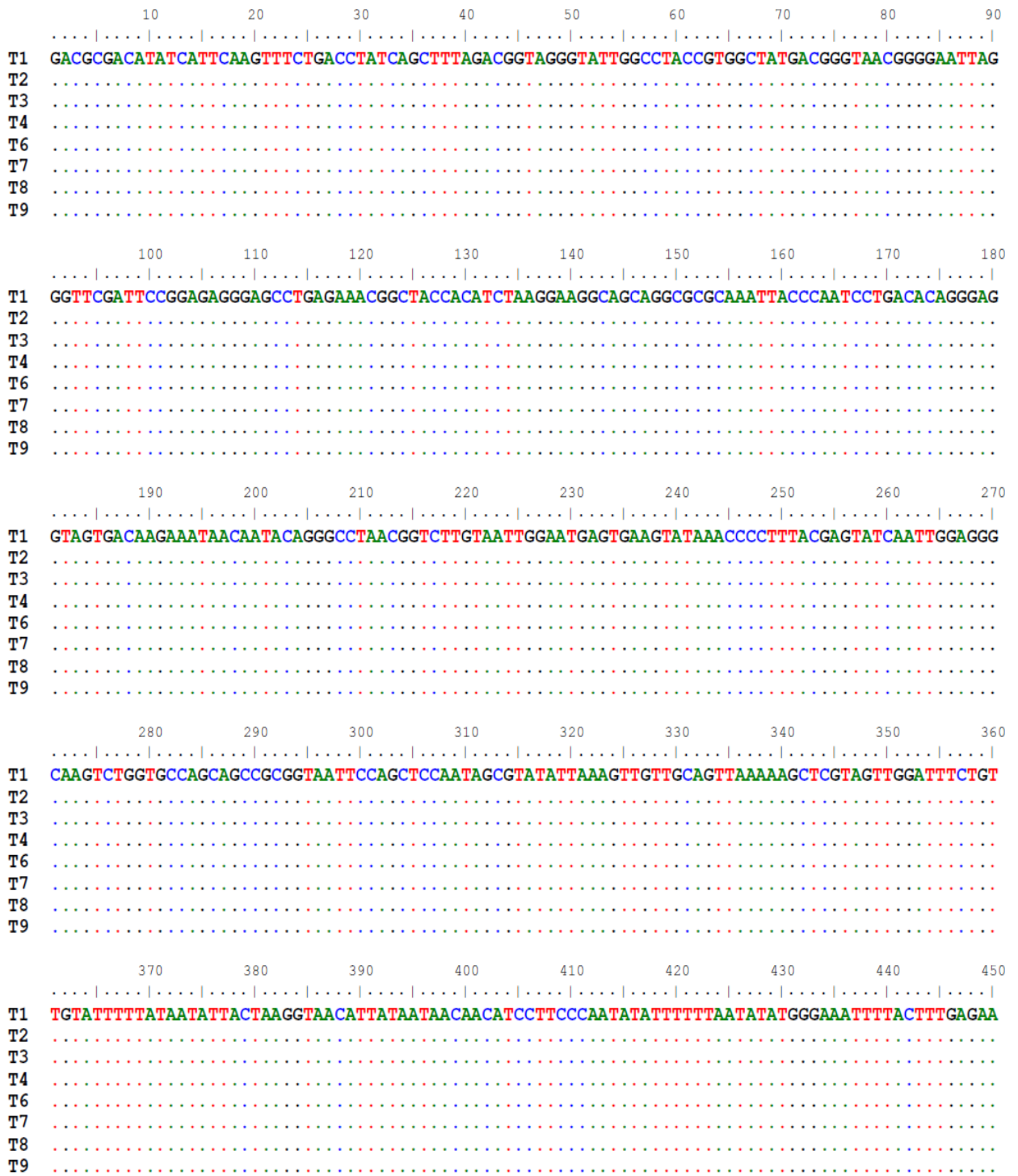
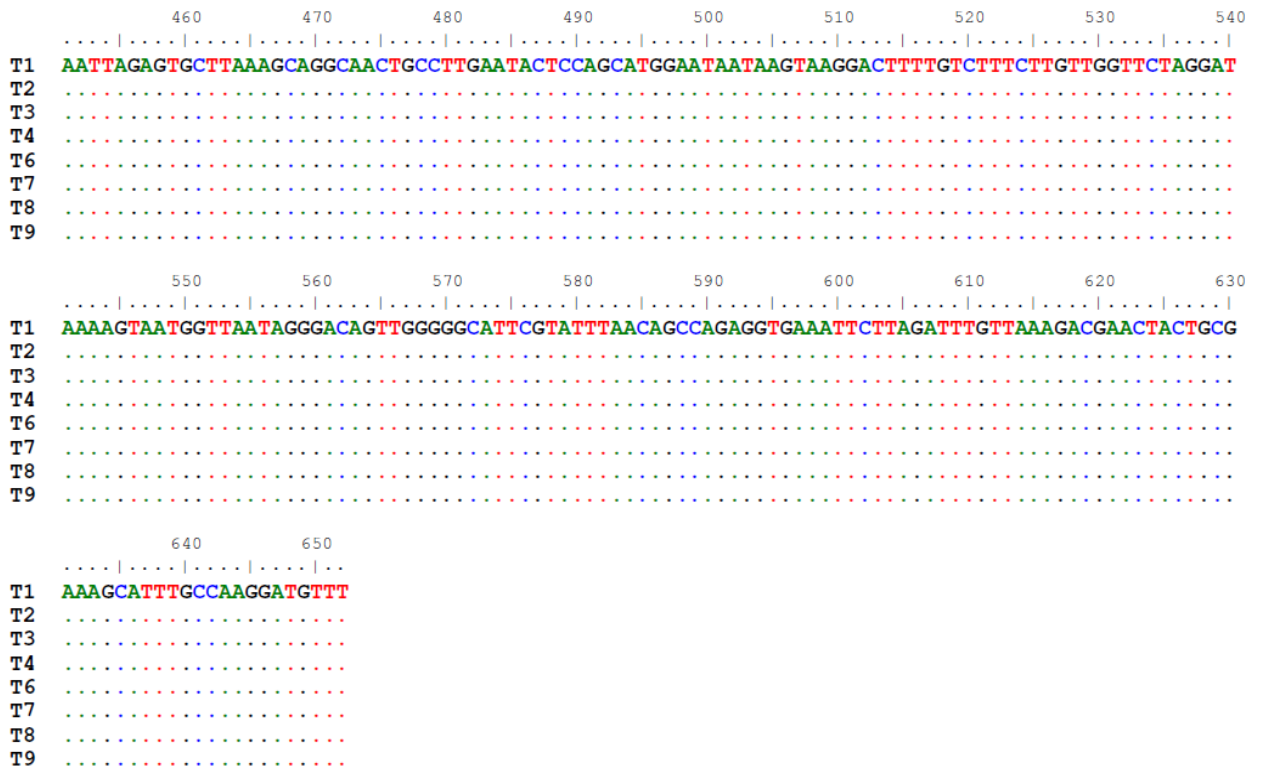


Figura 10. Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes das três espécies de tucanos evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.), tamanho da sequencia utilizada para comparação: 652pb (Continuação).



A comparação deste fragmento obtido com a sequência completa do gene 18S de *Cryptosporidium serpentis*, espécie mais próxima que apresenta o gene completamente sequenciado depositado no GenBank (número de acesso: AF151376), permitiu localizar o fragmento de 652pb aproximadamente entre as posições nucleotídicas 264-915.

Os fragmentos das sequências obtidas dos isolados de *Cryptosporidium* das amostras dos representantes da família Ramphastidae apresentaram 100% de similaridade com as sequências de *Cryptosporidium* genótipo Avian III depositadas no GenBank (Tabela 6 e Figura 11). No estudo da posição taxonômica dos isolados obtidos no presente estudo, podemos observar que se agruparam com *Cryptosporidium* Genótipo Avian III (Figura 12), e a topologia da árvore filogenética obtida pelo Neighbor Joining, mostrando a posição taxonômica dos isolados.

Cryptosporidium genótipo Avian III já foi relatado em várias espécies de aves das seguintes ordens: Psittaciformes (NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; ABE, MAKINO, 2010; QI et al., 2011; GOMES et al., 2012; RAVICH et al., 2014); Passeriformes QI et al., 2011; GOMES et al., 2012) e Charadriiformes (KOOMPAPONG et al., 2014).

Neste trabalho nenhuma espécie de aves da ordem Psittaciformes apresentaram positividade para *Cryptosporidium*: *Psittacus eritachus* (Papagaio do Congo), *Ecletus roratus* (Papagaio ecletus), *Ara macao* (Arara Macau), *Ara ararauna* (Arara canindé), *Amazona aestiva* (Papagaio verdadeiro), *Pionites leucogaster* (Marianinha da cabeça amarela. Sendo que os representantes da ordem Piciformes analisados neste estudo: *Ramphastus toco* (Tucano toco), *Ramphastus tucanus* (Tucano grande de papo branco), *Ramphastus dicolorus* (Tucano de bico verde), *Pteroglossus bailloni* (Araçari banana) e *Selenidera maculirostris* (Araçari poca); três apresentaram positividade para *Cryptosporidium* genótipo Avian III mediante as análises do gene alvo 18S (*Ramphastus toco*, *Ramphastus tucanus* e *Pteroglossus bailloni*). Este estudo, sendo o primeiro registro mundial de *Cryptosporidium* genótipo Avian III na ordem Piciformes e na família Ramphastidae, onde três espécies de hospedeiros (*Ramphastus toco*, *Ramphastus tucanus* e *Pteroglossus bailloni*) encontravam-se com o agente etiológico.

As análises filogenéticas de *Cryptosporidium* spp. usando os loci do 18S, HSP-70 e Actina, suportam a estrutura genética geral do gênero, com as espécies gástricas e as intestinais formando grupos monofiléticos distintos. Dentro de cada grupo as espécies que parasitam répteis formam os ramos basais e a maioria das espécies encontradas em mamíferos formam os ramos mais distantes (XIAO et al., 2004).

Tabela 7. Sequencias obtidas do GenBank de *Cryptosporidium* sp. do Genótipo Avian III utilizadas como comparação com as sequencias obtidas neste estudo, com as suas respectivas similaridades.

SEQUENCIA (Acesso /origem)	IDENTIDADE	QUERY COVER (Cobertura da sequencia)	REFERENCIA	LOCAL
KF994570 <i>Cryptosporidium</i> sp. (Avian genotype III - águas superficiais)	100%	100%	Prystajecky et al., 2014	Canadá
GU074384 <i>Cryptosporidium</i> sp. (Avian genotype III - <i>Padra oryzivora</i>)	100%	100%	Gomes et al., 2012	Brasil
HM116385 <i>Cryptosporidium</i> sp. (Avian genotype III - <i>Pica pica</i>)	100%	100%	Qi et al., 2011	China
AB471641 <i>Cryptosporidium</i> sp. (Avian genotype III - <i>Agapornis roseicollis</i>)	100%	100%	Makino et al., 2010	Japão
GQ227480 <i>Cryptosporidium</i> sp. (Avian genotype III - <i>Agapornis roseicollis</i>)	100%	100%	Sevá et al., 2009	Brasil
FJ205700 <i>Cryptosporidium</i> sp. (Avian genotype III - ambiente - águas residuais)	100%	100%	Feng et al., 2009	China

Figura 11. Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes da três espécies de tucanos comparando com sequencias de *Cryptosporidium* genótipo Avian III, evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.).

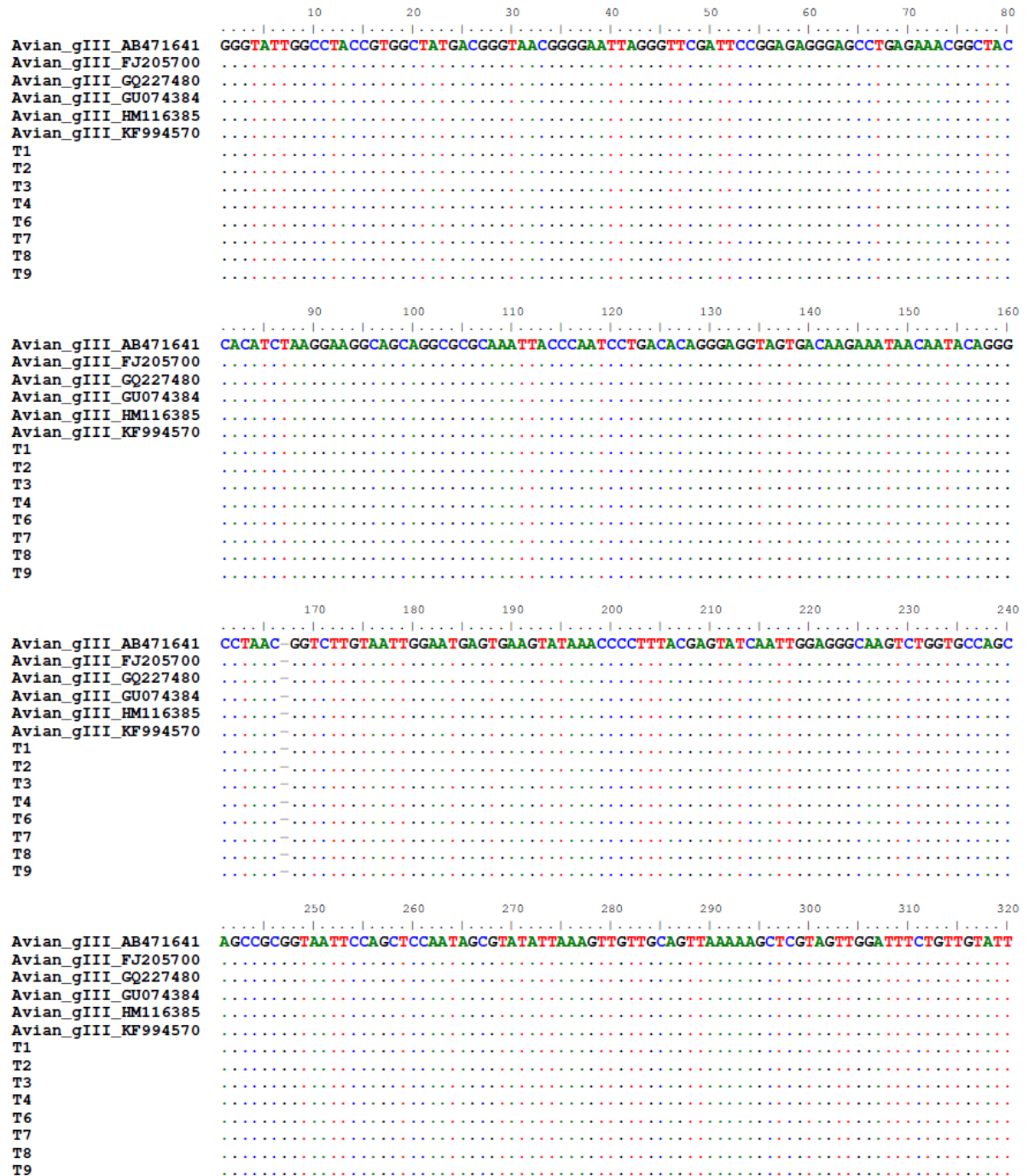
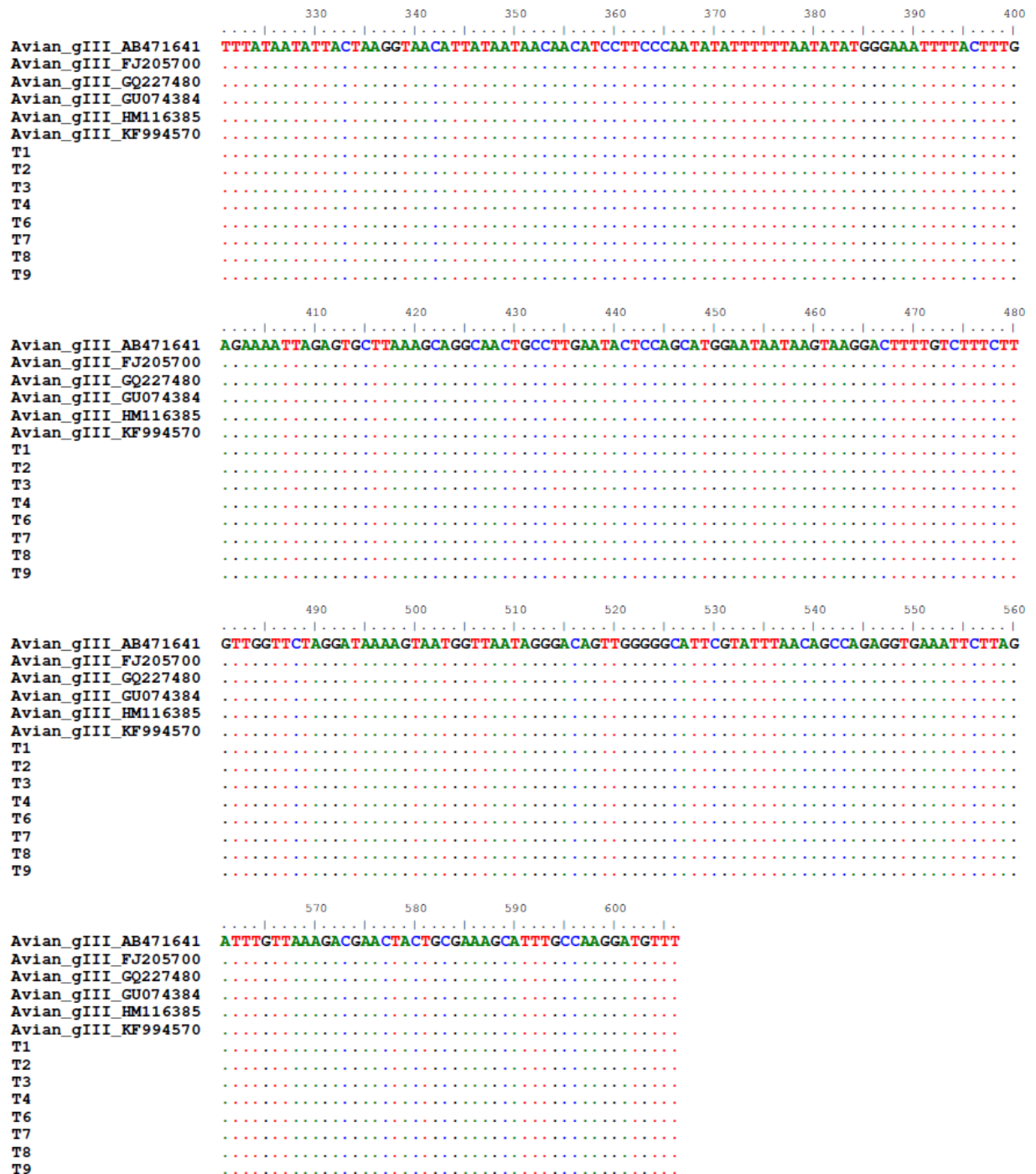


Figura 11. Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes da três espécies de tucanos comparando com sequencias de *Cryptosporidium* genótipo Avian III, evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.) (Continuação).



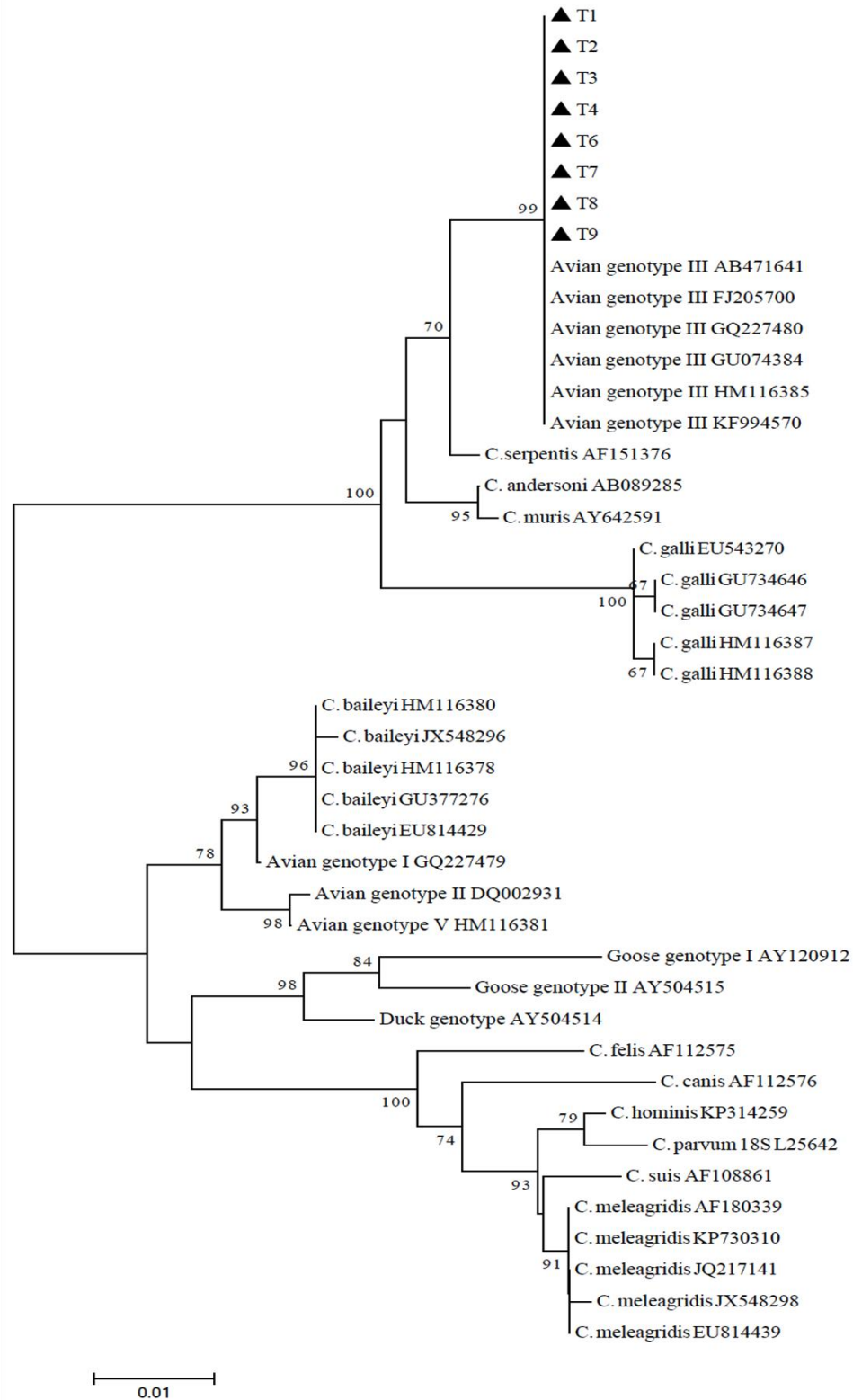


Figura 12. Relação genética entre os isolados de *Cryptosporidium* sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 633pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura - 2 parâmetros com análise de "bootstrap com 1000 réplicas. As sequencias obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo da família Rhamphastidae (T1, T4, T6, T7, e T9 = *Rhamphastus toco*; T2 e T3 = *Ramphastus tucanus*; T8 = *Pteroglossus bailloni*).

A formação dos dois grupos principais, de espécies de *Cryptosporidium* gástricos e intestinais, parece ter ocorrido antes do surgimento de peixes e répteis, uma vez que em ambos os grupos de hospedeiros ocorrem nos dois tipos de grupos (XIAO et al., 2004).

Hospedeiros geneticamente relacionados muitas vezes albergam espécies semelhantes de *Cryptosporidium*, sugerindo a co-evolução entre hospedeiro e parasito (XIAO et al., 2004). A formação das espécies do gênero *Cryptosporidium* aparentemente é o resultado da adaptação do parasito a diferentes hospedeiros, porém diferentes espécies de *Cryptosporidium* podem parasitar um mesmo hospedeiro, como ocorrem em *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. muris*, sugerindo que outros fatores podem levar à especiação (TANRIVERDI; WIDMER, 2006).

Geneticamente, por meio da utilização do gene alvo 18S, o genótipo de *Cryptosporidium* Avian III diagnosticado neste estudo, assim como também relatado por outros autores (Prystajecy et al., 2014; Gomes et al., 2012; Qi et al., 2011; Makino et al., 2010; Sevá et al., 2009; Feng et al., 2009), apresentou-se mais estreitamente relacionado às espécies gástricas.

Cryptosporidium genótipo Avian III, foi diagnosticado pela primeira vez em amostras em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), cacatua de peito rosa (*Eolophus roseicapilla*) e jandaia da testa vermelha (*Solstitialis Aratinga*) na Austrália Ocidental (NG et al., 2006). Posteriormente no Brasil em periquito (*Agapornis roseicollis*) (NAKAMURA et al., 2009); no Japão em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) (ABE, MAKINO, 2010) e no "pássaro do amor" (*Agapornis roseicollis*) (MAKINO et al., 2010); na China em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e gralha do bico vermelho (*Urocissa erythrorhyncha*) (QI et al., 2011); no Brasil em calafate (*Padda oryzivora*) e calopsita (*Nymphicus hollandicus*) (GOMES et al., 2012); em gaivotas (*Chroicocephalus*) na Tailândia (KOOMPAPONG et al., 2014) e nos Estados Unidos da América em espécies de *Agapornis* (RAVICH et al., 2014). Tendo em consideração as localidades variadas das pesquisas, pode-se deduzir que este genótipo pode ser amplamente distribuído em outros países e em outras ordens da classe das aves assim como outras famílias, contendo possivelmente vários outros hospedeiros.

Embora *Cryptosporidium* genótipo Avian III seja semelhante a espécie *C. galli* em termos de morfologia de oocistos (NG, et al., 2006), esta característica para a distinção de espécies e genótipos não é válida, para tal, sendo imprescindível a utilização de análises moleculares, já que a morfologia do oocisto não é um dado confiável em sistemática (RYAN et al, 1999; MORGAN et al., 2001; NG, et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009).

Em aves conforme já foi descrito por Santin (2013), a criptosporidiose se apresenta de três principais formas: respiratória, intestinal e renal, com manifestações clínicas ou subclínicas. A patogenicidade e a localização das formas endógenas no hospedeiro para genótipo Avian III, ainda não estão claras. Makino et al. (2010) relatam pela primeira vez, sinais clínicos como o vômito crônico em *Agapornis roseicollis* que estavam infectados com *Cryptosporidium* genótipo Avian III. Ng et al. (2006), descreveram a positividade do genótipo Avian III em três espécies de aves, onde as mesmas apresentaram sinais clínicos, tais como diarreia, dispnéia, tosse, espirros, ou vômitos. Informações clínicas relativas a infecção de *Cryptosporidium* genótipo Avian III em *Agapornis roseicollis*, no Brasil, não foram documentadas (NAKAMURA et al., 2009) e nem para outras espécies de aves. No presente estudo, nenhuma das aves diagnosticadas positivas para o genótipo apresentavam-se com sinais clínicos.

Portanto, tanto a patogenicidade e os sítios de localização deste genótipo em hospedeiros têm sido bastante incerto. O sítio de localização de *Cryptosporidium* Genótipo Avian III, foi documentado por Makino et al. (2010) e Ravich et al. (2014) em ductos de glândulas proventriculares, onde mediante a utilização fragmentos de proventriculo das aves e inserção de metodologias moleculares utilizando-se os genes alvos 18S e Actina, após análises das sequencias, confirmou-se a presença de *Cryptosporidium* genótipo Avian III. Mas, mais estudos deverão ser realizados, principalmente para se verificar se todas as espécies de aves diagnosticadas com este genótipo teriam o mesmo sítio de localização do parasitismo ou se seria apenas restrito somente ao proventrículo. Nos trabalhos desses autores, as sequências de ambos os “loci” foram idênticas as do *Cryptosporidium* genótipo Avian III. No presente trabalho, utilizou-se amostras fecais das aves e por meio de metodologias moleculares tendo o gene alvo 18S, obteve-se o diagnóstico para *Cryptosporidium* genótipo Avian III.

Makino et al. (2010) estudaram aves (*Agapornis roseicollis*) infectadas pelo *Cryptosporidium* genótipo Avian III que apresentavam-se com mais de dois anos de idade, e foi observado a eliminação persistente de oocistos em três das aves estudadas. No presente estudo, não foi feito acompanhamento para uma avaliação dos animais em termos de eliminação de oocistos por terem sido amostras únicas, mas naquelas aves positivas, apresentavam-se com mais de dois anos de idade com excessão de uma que tinha um ano e meio de vida.

Aves da família Ramphastidae são exclusivas da região neotropical, que é uma região biogeográfica que compreende a América Central, incluindo a parte sul do México e da península da Baja California, o sul da Florida, todas as ilhas do Caribe e a América do Sul. Nesta família, encontram-se aves com potencial de dispersão de sementes, sendo muito importantes para a dinâmica e manutenção de ambientes florestais. Apesar da grande biodiversidade de espécies da família, pouco se sabe sobre patógenos e seus impactos, tanto da fauna de vida livre quanto da cativa.

Estudos científicos, como a determinação da incidência e da distribuição de agentes etiológicos patogênicos na população desta família, são tarefas urgentes e prioritárias (CATÃO-DIAS, 2008). Sem o conhecimento sobre agentes etiológicos circulantes entre animais silvestres cativos ou de vida livre, programas conservacionistas podem fracassar devido à perda dos animais introduzidos ou translocados, ou pela possibilidade da introdução de doenças em ambientes previamente isentos (CATÃO-DIAS, 2008). Além disso, é provável que o papel das doenças nos processos de extinção de espécies seja subestimado, devido ao pouco conhecimento sobre agentes etiológicos em animais ameaçados (SMITH et al., 2008). Como as áreas naturais podem estar reduzidas ou fragmentadas, a pressão sobre animais de vida livre se aproxima à sofrida pelos indivíduos cativos. Assim, animais mantidos *ex situ* podem servir como modelo para estudar as respostas *in situ* aos diversos desafios nos ambientes naturais (MUNSON et al., 1993).

Ryan et al. (2003) realizaram uma pesquisa de *Cryptosporidium* em amostras fecais de várias espécies de hospedeiros (mamíferos, aves e répteis) da República Tcheca. A maioria dos isolados foram obtidos a partir de animais de produção de fazendas e do Jardim zoológico de Praga. Quanto às aves, foi diagnosticado *Cryptosporidium baileyi* em um tucano do bico preto (*Rhamphastus vitellinus*), mas o artigo não menciona o número total de exemplares analisados, aliás para nenhum dos hospedeiro estudados. Na natureza a espécie de tucano citada acima, está presente no Brasil, desde a Amazônia até os estados de Santa Catarina, Goiás e Mato Grosso. No Nordeste é restrito aos estados de Pernambuco e Alagoas. Exemplares, também são encontrados nas Guianas, Venezuela e Bolívia.

Apesar de não se saber se os representantes da família Ramphastidae livres na natureza, possam se infectar com *Cryptosporidium*, o trabalho demonstrou a susceptibilidade de algumas espécies à infecção quando criados em cativeiro. É importante ressaltar que *Cryptosporidium* genótipo Avian III, até a presente data, não foi registrado em humanos, portanto, trata-se de um genótipo que parece não ter potencial zoonótico, mas apresenta a sua

importância na saúde animal. No Brasil, Sevá et al. (2011), realizaram genotipagem de *Cryptosporidium* em 242 amostras de aves silvestres apreendidas no estado de São Paulo, dentre estas haviam oito representantes da família Ramphastidae (3,3%), sendo que estas amostras foram negativas para a presença de *Cryptosporidium*. Neste artigo, os autores não mencionam espécies destes exemplares.

Estudos epizootiológicos globais da infecção por *Cryptosporidium* em "pet aves" são necessários para esclarecer a origem da infecção, a via de transmissão, e para controlar a infecção por *Cryptosporidium* entre a população dessas aves e outras cativas. Além disso, a infecção experimental de *Cryptosporidium* genótipo Avian III em aves livres do patógeno, também são necessárias para observações das manifestações clínicas, assim como também para a verificação do sítio de parasitismo.

Mais estudos devem ser realizados para elucidação de fatores de risco associados a infecção por *Cryptosporidium* sp., assim como também estudos de caracterização molecular dos diferentes isolados para a identificação de espécie(s) e/ou genótipo(s) envolvido (s) nesses ambientes.

5. CONCLUSÕES

- Das amostras fecais de aves pertencentes às famílias Ramphastidae e Psittacidae, somente a primeira apresentou positividade para presença de oocistos de *Cryptosporidium* mediante diagnóstico microscópico.
- Após a utilização de técnicas moleculares nas amostras positivas da microscopia, utilizando como gene alvo o 18S, foi identificado *Cryptosporidium* genótipo Avian III.
- Este é o primeiro registro mundial de *Cryptosporidium* genótipo Avian III na na família Ramphastidae, onde três espécies de hospedeiros (*Ramphastus toco*, *Ramphastus tucanus* e *Pteroglossus bailloni*) encontravam-se com o agente etiológico.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASSI, H.; COUDERT, F.; CHEREL, Y.; DAMBRINE, G.; BRUGERE-PICOUX, J.; NACIRI, M. Renal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) in specific-pathogen-free chickens experimentally coinfecting with Marek's disease virus. **Avian Diseases**, p. 738-744, 1999.

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.; MAKINO, I. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. **Parasitology Research**, v. 106, n. 6, p. 1491-1497, 2010.

ABEYWARDENA, H.; JEX, A. R.; KOEHLER, A. V.; RAJAPAKSE, R. P.; UDAYAWARNA, K.; HAYDON, S. R.; GASSER, R. B. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from bovines (*Bos taurus* and *Bubalus bubalis*) in Sri Lanka: unexpected absence of *C. parvum* from pre-weaned calves. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 7, p. 75, 2014.

AKIYOSHI, D. E.; DILO, J.; PEARSON, C.; CHAPMAN, S.; TUMWINE, J.; TZIPORI, S.. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passed through different host species. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 1828-1832, 2003.

ALVES, M., XIAO, L.; LEMOS, V.; ZHOU, L.; CAMA, V.; DA CUNHA, M. B.; ANTUNES, F.. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. **Parasitology Research**, v. 97, n. 2, p. 108-112, 2005.

ANDERSON, B. C. 1983. Cryptosporidiosis. *Lab. Med.* 14:55-56.

ANDERSON, B. C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. **The Journal of American Medical Association**, 178:982-984, 1978.

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.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife—current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.

BAHR, S. E.; MORAIS, H. A. Pessoas imunocomprometidas e animais de estimação. **Clínica Veterinária**, ano VI, n. 30, p. 17-22, 2001.

BAROUDI, D.; KHELEF, D.; GOUCEM, R.; 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. 3, p. 334-340, 2013.

BIRD LIFE INTERNATIONAL. 2000. Threatened birds of the world. *Barcelona and Cambridge: Lynx Edicions and Birdlife International*.

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.; ATLAS, A. L.; TOIVIO-KINNUCAN, M. *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganopura bella*: Passeriformes, Estrildidae). **Avian Diseases**, p. 1027-1030, 1990.

BOSA, C. R. Detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. Tyzzer, 1907 em fezes de animais e em água do Zoológico Municipal de Curitiba, Paraná Brasil. 2014.

CAMA, V. A.; BERN, C.; ROBERTS, J.; CABRERA, L.; STERLING, C. R.; ORTEGA, Y.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 14, n. 10, p. 1567-1574, 2008.

CARDOZO, S. V.; TEIXEIRA, F. W. L.; LOPES, C. W. [Experimental transmission of *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) isolated of broiler chicken to Japanese quail (*Coturnix japonica*)]. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 119-124, 2004.

CHALMERS, R. M.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; XIAO, L.; RYAN, U.; MALLAGHAN, C. *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 15, n. 5, p. 829-830, 2009.

CHAMPLAUD, D.; GOBET, P.; NACIRI, M.; VAGNER, O.; LOPEZ, J.; BUISSON, J. C.; BONNIN, A. Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. meleagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1454-1458, 1998.

CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; LANGER-CURRY, R.; WIDMER, G.; AKIYOSHI, D. E.; TANRIVERDI, S.; TZIPORI, S. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 5, p. 851-857, 2006.

CHELLADURAI, J. J.; CLARK, M. E.; KVÁČ, M.; HOLUBOVÁ, N.; KHAN, E.; STENGER, B. L.; MCEVOY, J. *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* Avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). **Parasitology Research**, p. 1-6, 2016.

CHOMEL, B. B., BELOTTO, A., MESLIN, F. X. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. **Emerging infectious diseases Journal**, v. 13, n. 1, p. 6, 2007.

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, p. 211-218, 2006.

COKLIN, T.; FARBER, J.M.; PARRINGTON, L.J.; COKLIN, Z.; ROSS, W.H.; DIXON, B.R. Temporal changes in the prevalence and shedding patterns of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in a herd of dairy calves in Ontario. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 8, p. 841, 2010.

CUBAS, Z. S. Piciformes (Tucano, Araçari, Pica-pau). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca. p.210-221, 2006.

CURRENT, W. L. Human cryptosporidiosis. **New England Journal of Medicine**, 309:1326-1327, 1983

CURRENT, WILLIAM L.; UPTON, STEVE J.; HAYNES, THOMAS B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **The Journal of Protozoology**, v. 33, n. 2, p. 289-296, 1986.

CURTISS, J. B.; LEONE, A. M.; WELLEHAN Jr, J. F.; EMERSON, J. A.; HOWERTH, E. W.; FARINA, L. L. Renal and cloacal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* Avian Genotype V) in a major mitchell's cockatoo (*Lophochroa leadbeateri*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 46, n. 4, p. 934-937, 2015.

DARABUS, G. H; 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, 2002.

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 in Veterinary Science**, v. 91, n. 2, p. 246-250, 2011.

DOSTER, A. R.; MAHAFFEY, E. A.; MCCLEAREN, J. R. Cryptosporidia in the cloacal coprodeum of red-lored parrots (*Amazona autumnalis*). **Avian Diseases**, p. 654-661, 1979.

EGYED, Z.; SRETER, T.; SZELL, Z.; BESZTERI, B.; DOBOS-KOVACS, M.; MARIALIGETI, K.; CORNELISSEN, A. W. C. A.; VARGA, I. Polyphasic typing of *Cryptosporidium baileyi*: a suggested model for characterization of cryptosporidia. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 237-243, 2002.

ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; CHALMERS, R.M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 7, p. 675-682, 2012.

FAYER, R.. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 90-97, 2010.

FAYER, R.; SPEER, C.; DUBEY, J. The general biology of *Cryptosporidium*, p 1–41. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**, 1st ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 1997.

FAYER. General Biology, p. 1-35. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, p.560. 2007.

FENG, Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 128-137, 2010.

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.

FERNANDEZ, A. R.; MAZAS, E. A.; CACCIO, S. M.; GOMEZ-COUSO, H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). **Parasitology**, v. 142, n. 07, p. 917-925, 2015.

FORSHAW, J. M.. **Parrots of the world**. London: Blandford, 1989.

GALETTI, M.; SCHUNCK, F.; RIBEIRO, M.; PAIVA, A. A.; TOLEDO, R.; FONSECA, L. Distribuição e tamanho populacional do papagaio-de-cara-roxa *Amazona brasiliensis* no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ornitologia**, p. 239-247, 2006.

GALVAN, A. L.; MAGNET, A.; IZQUIERDO, F.; FERNANDEZ-VADILLO, C.; PERALTA, R.H.; ANGULO, S.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. **Science of The Total Environment**, v. 468, p. 368-375, 2014.

GARDINER, C. H.; IMES JR, G. D. *Cryptosporidium* sp. in the kidney of a black-throated finch. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, n. 11, p. 1401-1402, 1984.

GEURDEN, T.; GOOSSENS, E.; LEVECKE, B.; VERCAMMEN, F.; VERCROYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in captive wild ruminants in Belgium. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 1, p. 126-130, 2009.

GHARAGOZLOU, M. J.; DEZFOULIAN, O.; RAHBARI, S.; BOKAIE, S.; JAHANZAD, I.; RAZAVI, A. N. E. Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 53, n. 6, p. 282-285, 2006.

GOMES, R. S.; BOMFIM, T. C. B.; 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, 2009.

GOMES, R. S.; HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T. C. B. *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.

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

GUEDES, N. M. R. Sucesso reprodutivo, mortalidade e crescimento de filhotes de araras azuis *Anodorhynchus hyacinthinus* (Aves, Psittacidae) no Pantanal, Brasil. 2009.

HAFFER, J. Avian speciation in tropical South America, with a systematic survey of the toucans (Ramphastidae) and jacamars (Galbulidae). 1974.

HAFIZ S.; SPENCER, R.C.; LEE, M.; GOOCH, H.; DUERDEN, B.I. Use of microwaves for acid and alcohol fast staining. **Journal of Clinical Pathology**, 38(9):1073-6, 1985.

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. In: **Nucleic Acids Symposium Series**. 1999. p. 95-98.

HEMSWORTH, S.; PIZER, B. Pet ownership in immunocompromised children—a review of the literature and survey of existing guidelines. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 10, n. 2, p. 117-127, 2006.

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.

HÖFLING, E. Anatomia do crânio e da cintura escapular dos Ramphastidae (Aves: Piciformes) e de alguns grupos próximos, com implicações sistemáticas. **Anatomia do crânio e da cintura escapular dos Ramphastidae (Aves: Piciformes) e de alguns grupos próximos com implicações sistemáticas**, 1995.

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

HUBER, F.; DA SILVA, S.; BOMFIM, T. C. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; BELLO, A. R.. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1, p. 65-74, 2007.

IUCN, IUCN. Red List of Threatened Species: Version 2011.2. 2012.

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, J.; ALDERISIO, K. A.; SINGH, A.; XIAO, L. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1135-1141, 2005.

JIANG, J.; ALDERISIO, K.A.; XIAO, L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. **Applied and Environmental Microbiology**, 71, 4446 - 4454, 2005.

JUNIPER, T.; YAMASHITA, C. The conservation of Spix's Macaw. **Oryx**, v. 24, n. 04, p. 224-228, 1990.

KARESH, W. B.; COOK, R. A.; BENNETT, E. L.; NEWCOMB, J. Wildlife trade and global disease emergence. **Emerging infectious diseases Journal**, v. 11, n. 7, p. 1000-1002, 2005.

KIK, M. J.; VAN ASTEN, A. J.; LENSTRA, J. A.; KIRPENSTEIJN, J. Cloaca prolapse and cystitis in green iguana (*Iguana iguana*) caused by a novel *Cryptosporidium* species. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1, p. 165-167, 2011.

KILANI, R. T. 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 and 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. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 7, p. 879-881, 2004.

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

KOOMPAPONG, K.; SUKTHANA, Y. Seasonal variation and potential sources of *Cryptosporidium* contamination in surface waters of Chao Phraya River and Bang Pu Nature Reserve pier, Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 43, 832 - 840, 2012.

KOYAMA, Y.; SATOH, M.; MAEKAWA, K.; HIKOSAKA, K.; NAKAI, Y. Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughter house in the northern island of Japan. **Veterinary Parasitology**, 30; 130(3-4):323-6, 2005.

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.

LEONI, F.; GALLIMORE, C. I.; GREEN, J.; MCLAUCHLIN, J. Characterisation of small double stranded RNA molecule in *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium meleagridis*. **Parasitology International**, v. 55, n. 4, p. 299-306, 2006.

LEVINE, Norman D. Protozoan parasites of domestic animals and of man. **Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man.**, 1961.

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

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

LI, J.; QI, M.; CHANG, Y.; WANG, R.; LI, T.; DONG, H.; ZHANG, L. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in Captive Wildlife at Zhengzhou Zoo, China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 833-839, 2015.

LI, N.; NEUMANN, N.F.; RUECKER, N.; ALDERISIO, K.A.; STURBAUM, G.D.; VILLEGAS, E.N.; CHALMERS, R.; MONIS, P.; FENG, Y.; XIAO, L. Development and evaluation of three real-time PCR assays for genotyping and source tracking *Cryptosporidium* spp. in water. **Applied and Environmental Microbiology**, 81, 5845 - 5854, 2015.

LI, N.; XIAO, L.; ALDERISIO, K.; ELWIN, K.; CEBELINSKI, E.; CHALMERS, R.; SANTIN, M.; LI, X.; PEREIRA, M.; LARSEN, R.; XIAO, C.; PHILLIPS, R.; STRIBY, K.; MCCOWAN, B.; ATWILL, E. R. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. 4 (3), 343 - 350, 2015

LI, W.; DIAO, Y.; GONG, P.; SUO, X.; LI, J.; ZHANG, X. Transient reporter gene expression in oocysts and sporozoites of *Cryptosporidium parvum* controlled by endogenous promoters. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 194, n. 1, p. 33-35, 2014.

LIM, Y. A. L.; AHMAD, R. A.; SMITH, H. V. Current status and future trends in *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology in Malaysia. **Journal of Water and Health**, v. 6, n. 2, p. 239-254, 2008.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Cryptosporidiosis in birds. **Cryptosporidiosis of man and animals**, DUBEY, J.P. SPEER, C. A. and FAYER, R., Eds. CRC Press, Boca Raton, p. 133-148, 1990.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; SUNDERMANN, C. A. Host specificity of *Cryptosporidium* sp. isolated from chickens. **The Journal of Parasitology**, p. 565-568, 1986.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; SUNDERMANN, C. A.; HOERR, F. J. Experimental infections in domestic ducks with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. **Avian Diseases**, p. 69-73, 1989.

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; HOERR, F.J.; GIAMBRONE, J.J. Experimental *Cryptosporidium* infections in chickens: oocyst structure and tissue specificity. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 4, p. 876-879, 1986.

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; SUNDERMANN, C.A.; HOERR, F.J.; ERNEST, J.A.; Experimental *Cryptosporidium baileyi* infections in chickens and turkeys produced by ocular inoculation of oocysts. **Avian Diseases**, p. 355-357, 1987.

LIU, H.; SHEN, Y.; YIN, J.; YUAN, Z.; JIANG, Y.; XU, Y.; PAN, W.; HU, Y.; CAO, J. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China. **BMC Infectious Diseases** 14, 25, 2014.

MAHMOUDI, M. R.; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E.; KAZEMI, B.; HAGHIGHI, A.; MIRZAEI, A.; MOHAMMADIHA, A.; KARANIS, P. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes distribution in river water in Iran. **Journal of Water and Health**, v. 13, n. 2, p. 600-606, 2015.

MAJEWSKA, A. C.; GRACZYK, T. K.; SŁODKOWICZ-KOWALSKA, A.; TAMANG, L.; JĘDRZEJEWSKI, S.; ZDUNIAK, P.; NOWOSAD, P. The role of free-ranging, captive, and domestic birds of Western Poland in environmental contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1093-1099, 2009.

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, n. 3, p. 1102-1107, 2010.

MARTINEZ, J.; PRESTES, N. P. Ecologia e conservação do papagaio-charão *Amazona pretrei*. **Ecologia e Conservação de Psitacídeos no Brasil**, p. 173-192, 2002.

MATOS, D. J.; MANHOSO, F. F. R.; BRESCIANI, K. D. S. Importância da criptosporidiose em saúde pública. **Unimar Ciências** 18 (1-2), p. 19-21, 2009.

MATOS, O.; ALVES, M.; XIAO, L.; CAMA, V.; ANTUNES, F. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. **Emerging infectious diseases Journal**, v. 10, n. 12, p. 2256-7, 2004.

MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; ISEKI, M.; HAJIRI, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Cross-reactivities with *Cryptosporidium* spp. by chicken monoclonal antibodies that recognize avian *Eimeria* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 47-57, 2005.

MCLAUCHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DIAZ, S.; NICHOLS, G. L. Molecular Epidemiological Analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of Genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 Fecal Samples from Humans and 105 Fecal Samples from Livestock Animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 3984-3990, 2000.

MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M.; DOS 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.

MMA- Ministério do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: IBAMA. **Plano de Ação GT-CITES**. Brasília, p. 01-17, 2005.

MMA- Ministério do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: IBAMA. Institui e normatiza as categorias de uso e manejo da fauna Silvestre em cativeiro em território brasileiro. D.OU., DF, 15 abr. Brasília, p. Fauna - Legislação, 2006.

MORGAN, U. M.; BUDDLE, J. R.; ARMSON, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A.. Molecular and biological characterization of *Cryptosporidium* in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 1, p. 44-47, 1999.

MORGAN, U. M.; MONIS, P. T.; XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.; BLAGBURN, B. L. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 289-296, 2001.

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.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S. R.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 3, p. 182-183, 2000.

MORNER, T.; OBENDORF, D. L.; ARTOIS, M.; WOODFORD, M. H. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 21, n. 1, p. 67-76, 2002.

MORRISEY, T. **Threatened birds of the world: the official source for birds on the IUCN red list**. Cambridge,, UK: BirdLife International, 2000.

MUNSON, L.; COOK, R. A. Monitoring, investigation and surveillance of diseases in captive wildlife. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, n. 3, p. 281-290, 1993.

NAKAMURA, A. A.; HOMEM, C. G.; DA SILVA, A. M.; MEIRELES, M. V. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1, p. 7-13, 2014.

NAKAMURA, A. A.; SIMOES, 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, n. 1, p. 47-51, 2009.

NAKAMURA, K.; ABE, F. Respiratory (especially pulmonary) and urinary infections of *Cryptosporidium* in layer chickens. **Avian Pathology**, v. 17, n. 3, p. 703-711, 1988.

NASPHV - National Association of State Public Health Veterinarians et al. Compendium of animal rabies prevention and control, 2004: National Association of State Public Health Veterinarians, Inc.(NASPHV). **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports/Centers for Disease Control**, v. 53, n. RR-9, p. 1, 2004.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, 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, n. 1, p. 8-11, 2013.

NICHOLS, R. A. B.; CONNELLY, L.; SULLIVAN, C. B.; SMITH, H. V. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring period. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 17, p. 5977-5986, 2010.

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

OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; CRABB, J. H.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1275-1281, 1999.

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

PAVLÁSEK, I. [The black-headed gull (*Larus ridibundus* L.), a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae)]. **Veterinární Medicína**, v. 38, n. 10, p. 629-638, 1992.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Remedia Klin. Mikrobiol**, v. 3, p. 290-301, 1999.

PAVLÁSEK, I. Findings of cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. **Veterinarstvi (Czech Republic)**, 2001.

Plano de ação nacional para a conservação dos papagaios da Mata Atlântica. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011.

PROCTOR, S. J.; KEMP, R. L. *Cryptosporidium anserinum* sp. n. (Sporozoa) in a domestic goose *Anser anser* L., from Iowa. **The Journal of Protozoology**, v. 21, n. 5, p. 664-666, 1974.

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 and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2328-2336, 2014.

QI, M.; WANG, R.; NING, C.; LI, X.; ZHANG, L.; JIAN, F.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 336-340, 2011.

RANDALL, C. J. Renal and nasal cryptosporidiosis in a junglefowl (*Gallus sonneratii*). **Veterinary Record**, v. 119, n. 6, p. 130-131, 1986.

- RAVICH, M. L.; REAVILL, D. R.; HESS, L.; CHILDRESS, A. L.; WELLEHAN JR, J. F. 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.
- ROBERTSON, L. J.; CASAERT, S.; VALDEZ-NAVA, Y.; EHSAN, M. A.; CLAEREBOU, E. Drying of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts to slides abrogates use of vital dyes for viability staining. **Journal of Microbiological Methods**, v. 96, p. 68-69, 2014.
- ROHELA, M.; LIM, Y. A. L.; JAMAIAH, I.; KHADIJAH, P. Y. Y.; LAANG, S. T.; NAZRI, M. M.; 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, p. 34, 2005.
- RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. A molecular phylogeny of Amazona: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, n. 2, p. 421-437, 2004.
- RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I. M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 809-813, 2003.
- RYAN, U.. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 113-120, 2010.
- RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, 2014.
- RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, 2014.
- RYAN, U.; POWER, M. *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. **Parasitology**, v. 139, n. 13, p. 1673-1688, 2012.
- RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A. A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4302-4307, 2003.
- RYAN, U.M.; XIAO, L., Avian cryptosporidiosis. In: FAYER, R., XIAO, L. (Eds.), **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**, p. 395-418, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** . 2001. 2001.
- SANTÍN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2013.
- SANTOS, L. U.; BONATTI, T. R.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP,

- Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 6, p. 309-313, 2004.
- SCHLOEGEL, L. M.; DASZAK, P.; NAVA, A. Medicina da conservação: buscando causas e soluções práticas para doenças infecciosas emergentes. **Natureza & Conservação**, v. 3, n. 2, p. 29-41, 2005.
- SCHULZE, C.; KÄMMERLING, J.; KUTZER, P.; ENGELHARDT, A.; RICHTER, B.. *Cryptosporidium baileyi*-infection in Red-breasted Merganser (*Mergus serrator*) ducklings from a zoological garden. **Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 125, n. 9-10, p. 428-431, 2011.
- SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARÃES, M. B.; DE OLIVEIRA SOUZA, S.; ALLEGRETTI, L.; SOARES, R. M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1, p. 27-32, 2011.
- SHORT, L.; HORNE, J. F. M. **Toucans, barbets, and honeyguides: Ramphastidae, Capitonidae and Indicatoridae**. Oxford University Press, 2001.
- SICK, H. Ornitologia Brasileira, edição revista e ampliada por José Fernando Pacheco. **Rio de Janeiro: Nova Fronteira**, 1997.
- SIGRIST, T. **Guia de campo avis brasilis avifauna brasileira: Descrição das espécies**. Avis Brasilis Editora, 2009.
- SILVERLÅS, C.; MATTSSON, J. G.; INSULANDER, M.; LEBBAD, M. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 11, p. 963-967, 2012.
- SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 65, p. 262-IN23, 1955.
- SMITH, G. A. Systematics of parrots. **International Journal of Avian Science**, v. 117, n. 1, p. 18-68, 1975.
- SMITH, H. Diagnostics, p. 173-203. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, p.560. 2007.
- SMITH, H. V.; CACCIO, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 29-40, 2007.
- 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.
- SPENCER, L. Pets prove therapeutic for people with AIDS. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 11, p. 1664-1668, 1992.

SPENCER, L. Study explores health risks and the human/animal bond. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 11, p. 1669-1669, 1992.

SRÉTER, T.; KOVÁCS, G.; DA SILVA, A. J.; PIENIAZEK, N. J.; SZÉLL, Z.; DOBOS-KOVÁCS, M.; VARGA, I. Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 735-738, 2000.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds—a review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 261-279, 2000.

SRÉTER, T.; VARGA, I.; BÉKÉSI, L. Age-dependent resistance to *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens. **The Journal of Parasitology**, p. 827-829, 1995.

SULAIMAN, I. M.; LAL, A.A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 388-394, 2002.

SULAIMAN, I. M.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. A.; LAL, A. A.; XIAO, L. Phylogenetic Relationships of *Cryptosporidium* Parasites Based on the 70-Kilodalton Heat Shock Protein (HSP70) Gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2385-2391, 2000.

TACCONI, G.; PEDINI, V.; GARGIULO, A. M.; COLETTI, M.; PIERGILI-FIORETTI, D. Retrospective ultramicroscopic investigation on naturally cryptosporidial-infected commercial turkey poult. **Avian Diseases**, p. 688-695, 2001.

TANRIVERDI, S.; MARKOVICS, A.; ARSLAN, M. O.; ITIK, A.; SHKAP, V.; WIDMER, G. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. **Applied Environmental Microbiology**. v.72, n.4, p.2507-2413, 2006.

Tsiodras, S.; Kelesidis, T.; Kelesidis, I.; Bauchinger, U.; Falagas, M. E. Human infections associated with wild birds. **Journal of Infection**, v. 56, n. 2, p. 83-98, 2008.

TURNER, G. V. Companion Bird Medicine. Ames: Iowa State University Press, **Zoonotic Diseases**. In: BURR, E.W. p. 221-5, 1987.

TYZZER, E. E. Coccidiosis in gallinaceous birds. **American Journal of Epidemiology**, v. 10, n. 2, p. 269-383, 1929.

VAN DYKE, M. I.; ONG, C. S.; PRYSTAJECKY, N. A.; ISAAC-RENTON, J. L.; HUCK, P. M. Identifying host sources, human health risk and indicators of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural activities. **Journal of Water and Health**, v. 10, n. 2, p. 311-323, 2012.

VAN ZEELAND, Y. R. A.; SCHOEMAKER, N. J.; KIK, M. J. L.; VAN DER GIESSEN, J. W. B. 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, p. 190-196, 2015.
- 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, 2014.
- WANG, R.; JIAN, F.; SUN, Y.; HU, Q.; ZHU, J.; WANG, F.; 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.; XIAO, L. Prevalence of *Cryptosporidium baileyi* in ostriches (*Struthio camelus*) in Zhengzhou, China. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1, 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, n. 3, p. 534-537, 2012.
- XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, n. 4, p. 371-373, 2001.
- XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010.
- XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1239-1255, 2008.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.
- XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 309-323, 2008.
- XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. A.; LAL, A. A. Sequence Differences in the Diagnostic Target Region of the oocyst Wall Protein Gene of *Cryptosporidium* Parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5499-5502, 2000.
- XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999.

XIAO, L.; RYAN, U. M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinion in Infectious Diseases**, V. 17, n. 1, p. 483–490, 2004.

XIAO, L.; SULAIMAN, I. M.; RYAN, U. M.; ZHOU, L.; ATWILL, E. R.; TISCHLER, M. L.; LAL, A. A. Host adaptation and host–parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 14, p. 1773-1785, 2002.

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.

YANG, W.; CHEN, P.; VILLEGAS, E. N.; LANDY, R. B.; KANETSKY, C.; CAMA, V.; BROWN, M. H. *Cryptosporidium* source tracking in the Potomac River watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6495-6504, 2008.

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 for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, n. 1, p. 88-109, 2016.

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.

ZIEGLER, P. E.; WADE, S. E.; SCHAAF, S. L.; STERN, D. A.; NADARESKI, C. A.; MOHAMMED, H. O. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1, p. 176-184, 2007.

ZYLAN, K.; BAILEY, T.; SMITH, H. V.; SILVANOSE, C.; KINNE, J.; SCHUSTER, R. K.; HYLAND, K. An outbreak of cryptosporidiosis in a collection of Stone curlews (*Burhinus oedicnemus*) in Dubai. **Avian Pathology**, v. 37, n. 5, p. 521-526, 2008.

7. ANEXOS

Anexo 1. Informações sobre as espécies de aves da família Psittacidae, estudada neste trabalho.

Nº	IDENTIFICAÇÃO	NOME CIENTÍFICO	NOME VULGAR	IDADE	SEXO
01	HORIZONTE 11,0 648	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo (Exótico)	3 A	F
02	IFB 10.0 373	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	6 A	F
03	02 RST 718	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	3 A	M
04	CTF 167525 0462	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	6 A	F
05	98 RST 717	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	18 A	M
06	EJPE 64	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	10 A	M
07	CSJ 06 97	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	18A	F
08	VC 2013 200573 10.0 PE 2952	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	3 A	M
09	5587861 2014 SP 11 AQR 151	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	2 A	F
10	5587861 SP 2014 11 AQR 117	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	2 A	F
11	5587861 2014 SP 11 AQR 120	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	2 A	F
12	VC 2013 200573 10.0 PE 2949	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	3 A	F
13	EPL 2014 MA 11.0 13	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	2 A	M
14	5587861 SP 2014 11 AQR 116	<i>Psittacus eritachus</i>	Papagaio do Congo	2 A	M
15	LH 03 015	<i>Ara ararauna</i>	Arara Caniné	Adulto	F
16	LH 03 016	<i>Ara ararauna</i>	Arara Caniné	Adulto	M
17	LH A 04 173	<i>Ara ararauna</i>	Arara Caniné	Adulto	F
18	LH A 03 022	<i>Ara ararauna</i>	Arara Caniné	Adulto	M
19	FP 10 139	<i>Ara macao</i>	Arara Macau	6 A	M
20	LH A 03 087	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	F
21	LH A 03 089	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	M
22	LH A 03 131	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	F
23	LH A 03 132	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	M
24	LH A 04 135	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	F
25	LHA 03 133	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	M
26	CETAS 030 10 AL	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	F
27	LH A 10 484	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	M
28	IBAMA CE 2010 100	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	F
29	CETAS 001 10 AL	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	M
30	CCM 394	<i>Ecletus roratus</i>	Papagaio Ecletus (exótico)	5 A	F
31	CCM 391	<i>Ecletus roratus</i>	Papagaio Ecletus	5 A	M
32	IBAMA CE 2010 028	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	F
33	CETAS 040 10 AL	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	M
34	LH E 10 115	<i>Ecletus roratus</i>	Papagaio Ecletus	5 A	F
35	LH E 06 021	<i>Ecletus roratus</i>	Papagaio Ecletus	9 A	M
36	LH E 06 066	<i>Ecletus roratus</i>	Papagaio Ecletus	9 A	F
37	CN 04 074	<i>Ecletus roratus</i>	Papagaio Ecletus	11 A	M
38	RLP 3382	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	M
39	EJPN 99	<i>Pionites leucogaster</i>	Marianinha da cabeça amarela	10 A	F
40	TN 077	<i>Pionites leucogaster</i>	Marianinha da cabeça amarela	11 A	M
41	GJA 10,0 064	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	4 A	F
42	LH A 11 532	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Adulto	M
43	LH 03 019	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	13 A	F
44	LH 03 005	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	13 A	M
45	FCMG 205	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	3 A	F
46	CTRJ/021	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio Verdadeiro	Jovem	M
47	LH E 08 053	<i>Ecletus roratus</i>	Papagaio ecletus	6 A	F
48	JJS 1168	<i>Ecletus roratus</i>	Papagaio ecletus	6 A	M

A = Ano (s)

F = Fêmea

M = Macho

Anexo 2. Informações sobre as espécies de aves da família Ramphastidae, estudada neste trabalho.

Nº	IDENTIFICAÇÃO	NOME CIENTÍFICO	NOME VULGAR	IDADE	SEXO	DIAGNÓSTICO
01	CT RJ/030	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	F	
02	LH A 05 292	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	
03	VS OCR 11.0 004	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	F	
04	LH A 12 555	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	
05	LH A 11 513	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	F	Positivo (T1)
06	CT RJ/036	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	
07	AGC 3078	<i>Ramphastus tucanus</i>	Tucano Pacova	Adulto	F	Positivo (T2)
08	AGC 3081	<i>Ramphastus tucanus</i>	Tucano Pacova	Adulto	M	
09	AGC 3814	<i>Ramphastus tucanus</i>	Tucano Pacova	Adulto	F	Positivo (T3)
10	LH A 11 512	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	F	
11	LH A 04 516	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	
12	PET 50372	<i>Ramphastus dicolorus</i>	Tucano Bico Verde	Jovem	F	
13	SCCAB 62492 942	<i>Pteroglossus bailloni</i>	Aracari castanho	Adulto	F	Positivo (T8)
14	SC CAB 438	<i>Pteroglossus bailloni</i>	Aracari castanho	4 A	M	
15	LH A 12 561	<i>Selenidera maculirostris</i>	Aracari Poca	Adulto	M	
16	LH A 05 289	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	Positivo (T9)
17	CT RJ/038	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Jovem	F	
18	AGC GO 2232	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	5 A	F	
19	CT RJ/040	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Jovem	M	
20	GO SSDC 7122	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	1 A	M	
21	LH A 04 220	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	Positivo (T4)
22	LH A 06 331	<i>Ramphastus tucanus</i>	Tucano Pacova	Adulto	F	
23	GO SSDC 4314	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	1 A	F	
24	GO SSDC 6053	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	1 A	F	
25	LH A 05 323	<i>Ramphastus dicolorus</i>	Tucano Bico Verde	Adulto	M	
26	GO SSDC 6051	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	1A (jovem)	M	Positivo (T5)
27	GO SSDC 7004	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	1 A	M	
28	LH A 12 559	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	
29	CT RJ/035	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	
30	AGC 2234	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	4 A	M	
31	GO SSDC 6257	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	1 A	F	
32	GO SSDC 6216	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	1 A	M	
33	GO SSDC 5246	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	1 A	F	
34	AGC 4497	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	F	Positivo (T6)
35	GO SSDC 7005	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	1 A	M	
36	CT RJ/028	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	Positivo (T7)
37	LH A 04 221	<i>Ramphastus toco</i>	Tucano Toco	Adulto	M	

A= Ano (s)

F= Fêmea

M= Macho