

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

**TESE**

**Caracterização genotípica, estudo filogenético e  
algumas considerações epidemiológicas de  
*Cryptosporidium* spp. parasitando aves domésticas e  
exóticas no Estado do Rio de Janeiro**

**Raquel Saucier Gomes**

**2010**



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

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA, ESTUDO FILOGENÉTICO E  
ALGUMAS CONSIDERAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS DE  
*Cryptosporidium* SPP. PARASITANDO AVES DOMÉSTICAS E  
EXÓTICAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**RAQUEL SAUCIER GOMES**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Teresa Cristina Bergamo do Bomfim**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2010

616.96

G631c

T

Gomes, Raquel Saucier, 1979-.

Caracterização genotípica, estudo filogenético e algumas considerações epidemiológicas de *Cryptosporidium* SPP. parasitando aves domésticas e exóticas no estado do Rio de Janeiro / Raquel Saucier Gomes - 2010.

81 f.: il.

Orientador: Teresa Cristina Bergamo do Bomfim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 67-78.

1. *Cryptosporidium* - Teses. 2. Aves doméstica - Rio de Janeiro (RJ) - Teses. 3. Epidemiologia - Rio de Janeiro (RJ) - Teses. I. Bomfim, Teresa Cristina Bergamo do. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.



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

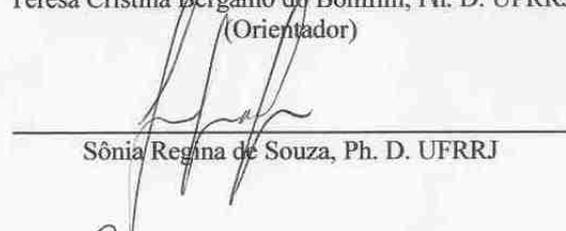
**RAQUEL SAUCIER GOMES**

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

TESE APROVADA EM 09/02/2010



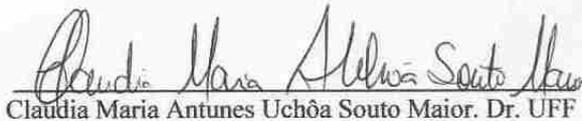
Teresa Cristina Bergamo do Bomfim, Ph. D. UFRRJ  
(Orientador)



Sônia Regina de Souza, Ph. D. UFRRJ



Rodrigo Caldas Menezes. Dr. FIOCRUZ/RJ



Cláudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior. Dr. UFF



Luciano Antunes Barros. Dr. UFF

*Dedico a Deus*

*Aos meus pais, Paulo e Lena*

*Ao meu irmão Daniel*

*E ao meu namorado Felipe*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à professora Teresa Cristina Bergamo do Bomfim pela orientação, carinho e atenção a mim dedicada.

A amiga Franziska Huber pela amizade constante e companheirismo nessa pesquisa.

Ao Sidnei da Silva da Fundação Oswaldo Cruz/RJ, na colaboração e confiança nesse trabalho.

A todos os professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Parasitologia Veterinária da UFRRJ, pelo carinho com que sempre me trataram ao longo destes anos.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

GOMES, Raquel Saucier. **Caracterização genotípica, estudo filogenético e algumas considerações epidemiológicas de *Cryptosporidium* spp. parasitando aves domésticas e exóticas comercializadas no Estado do Rio de Janeiro.** 2010. 81 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.2010.

O presente trabalho teve por objetivo diagnosticar e caracterizar geneticamente espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves domésticas e exóticas comercializadas no Estado do Rio de Janeiro, associando possíveis fatores de risco da infecção. Foram analisadas 180 aves domésticas comercializadas em mercados locais e 103 aves exóticas de criadouros e *petshops*. Para as análises, o DNA extraído de suspensão de amostra fecal foi utilizado na amplificação das seqüências do 18S rDNA através da técnica Nested-PCR. Os amplicons gerados foram submetidos à RFLP, utilizando as enzimas *SspI* e *VspI*, e ao seqüenciamento, para a confirmação das espécies. Foram identificadas espécies de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves domésticas e exóticas. Durante as análises dos sítios de corte enzimático dos produtos da Nested-PCR do gene 18S rDNA, a espécie *C. baileyi* foi a única que apresentou padrão de corte característico, porém nas demais amostras foi necessária a confirmação através do sequenciamento e estudo filogenético. Foi diagnosticado *C. baileyi* (GU082387) infectando patos (*Anas platyrhynchos domesticus*); *C. parvum* em codornas (*Coturnix coturnix japonica*) (GU082384 e GU082386), pintos (*Gallus gallus domesticus*) (GU082390 e GU082391), pato (GU082388) e manon (*Lonchura striata domestica*) (GU074390). O genótipo aviário III foi identificado pela primeira vez em calafate (*Lonchura paddy oryzivora*) (GU074384) e em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) (GU074385, GU074386 e GU074387). As seqüências de canários (*Serinus canarius*) receberam os números de acesso GU074388 e GU074389, porém não foi possível a identificação da espécie de *Cryptosporidium*, devido à grande distância genética entre elas e aquelas já depositadas no GenBank, sugerindo novo genótipo ou uma nova espécie. Embora *C. baileyi* e o genótipo Aviário III sejam comuns em aves, o diagnóstico de *C. parvum* é um achado preocupante, já que esta espécie está mais associada com mamíferos. Aves podem ser consideradas como reservatórios e disseminadoras ambientais da forma infectante do protozoário, possibilitando a infecção para um amplo número de espécie de hospedeiros incluindo, nesta cadeia epidemiológica, o ser humano.

**Palavras-chave:** *Cryptosporidium*, aves domésticas, aves exóticas, diagnóstico molecular, filogenia, epidemiologia.

## ABSTRACT

GOMES, Raquel Saucier. **Genotypic characterization, phylogenetic analysis and some epidemiological considerations of *Cryptosporidium* spp. parasitizing poultry and exotic marketed in State of Rio de Janeiro.** 2010. 87 p .Thesis (Ph.D. in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Institute of Veterinary, Department of Veterinary Parasitology, Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

This study aimed to diagnose and characterize genetically the species and genotypes of *Cryptosporidium* in stool samples from poultry and exotic birds marketed in Rio de Janeiro involving possible risk factors for infection. We analyzed 180 poultry sold in local markets and 103 exotic birds from breeding and pet shops. For analysis, the DNA extracted from fecal sample suspension was used to amplify the 18S rDNA sequences by nested-PCR technique. The amplicons generated were subjected to RFLP using the enzymes *SspI* and *VspI*, and sequencing and phylogenetic analysis, to confirm the species. Different species of *Cryptosporidium* were identified in faecal samples of poultry and exotic birds. In the analysis of sites of enzymatic cutting products of nested-PCR gene 18SR DNA, the species *C. baileyi* was the only one that displayed a characteristic cut-off, but other samples were. The following species were diagnosed: *C. baileyi* (GU082387) infecting ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*), *C. parvum* in quails (*Coturnix japonica*) (GU082384 and GU082386), chicks (*Gallus gallus domesticus*) (GU082390 and GU082391), duck (GU082388) and Manon (*Lonchura striata domestica*) (GU074390). The Avian genotype III was identified in caulker (*Lonchura padderia oryzivora*) (GU074384) and cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) (GU074385, GU074386 and GU074387). The sequences of canaries (*Serinus canarius*) received access numbers GU074388 and GU074389, but it was not possible to identify the species of *Cryptosporidium*, because of the large genetic distance between them and those already deposited in GenBank, suggesting a new genotype or a new specie. Although *C. baileyi* and Avian genotype III are common in birds, the diagnosis of *C. parvum* is a worrying finding, since this species are more associated with mammals. Birds can be considered as reservoirs and disseminators of environmental infective form of the parasite, allowing the infection to a large number of species of hosts, including in the man in the epidemiological chain.

**Key Word:** *Cryptosporidium*, poultry, exotic birds, molecular diagnosis, phylogeny, epidemiology.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | 1  |
| 2.1 Histórico   | 2  |
| 2.2 Classificação taxonômica  | 3  |
| 2.3 Criptosporidiose  | 4  |
| 2.3.1 Humanos   | 4  |
| 2.3.2 Aves  | 6  |
| 2.4 Epidemiologia   | 9  |
| 2.5 Diagnóstico   | 10 |
| 2.5.1 Convencional  | 10 |
| 2.5.2 Métodos Imunológicos  | 10 |
| 2.6 A biologia molecular do gênero <i>Cryptosporidium</i>                           | 11 |
| 2.6.1 O genoma de <i>Cryptosporidium</i>  | 11 |
| 2.6.2 Genes de <i>Cryptosporidium</i>   | 14 |
| 2.7 Diagnósticos Moleculares – Métodos de detecção de ácido nucléicos               | 15 |
| 2.7.1 Técnicas de biologia molecular aplicadas ao <i>Cryptosporidium</i>            | 15 |
| 2.7.2 Obtenção do DNA para a realização das análises - Extração do DNA              | 15 |
| 2.8 PCR   | 16 |
| 2.8.1 Nested -PCR   | 18 |
| 2.8.2 PCR da transcriptase reversa  | 18 |
| 2.8.3 PCR em Tempo Real   | 19 |
| 2.8.4 Técnica do Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição-RFLP       | 19 |
| 2.8.5 Amplificação Randomizada do DNA Polimórfico – RAPD                            | 19 |
| 2.8.6 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados – AFLP                 | 19 |
| 2.8.7 Técnicas de identificação de genótipos e subgenótipos - <i>Fingerprinting</i> | 21 |
| 2.8.7.1 Uso de micro e minisatélites  | 21 |
| 2.8.7.2 Polimorfismo da conformação de fitas únicas – SSCP                          | 22 |
| 2.9 Sequenciamento e estudo filogenético  | 22 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>   | 25 |
| 3.1 Locais de realização da pesquisa  | 25 |
| 3.2 Coletas das amostras fecais e obtenção de oocistos para as análises             | 25 |
| 3.2.1 Coletas de aves domésticas  | 25 |
| 3.2.2 Coletas das aves exóticas   | 27 |
| 3.3 Procedimentos laboratoriais   | 27 |
| 3.3.1 Processamentos das amostras fecais  | 27 |
| 3.3.2 Extração de DNA de amostras fecais  | 30 |
| 3.3.3 Realização do PCR primário e Nested-PCR                                       | 30 |
| 3.4 Sequenciamento e análises filogenéticas   | 31 |
| 3.4.1 Purificação dos produtos da Nested-PCR  | 31 |
| 3.4.2 Sequenciamento  | 31 |
| 3.4.3 Análises Filogenéticas  | 31 |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | 33 |
| 4.1 Aves domésticas   | 33 |
| 4.1.1 Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> em aves domésticas                      | 33 |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1.2 Morfometria dos oocistos das aves domésticas  | 35        |
| 4.1.3 PCR das amostras de aves domésticas   | 35        |
| 4.1.4 Nested-PCR das aves domésticas  | 35        |
| 4.1.5 RFLP-PCR de aves domésticas   | 38        |
| 4.1.6 Sequenciamento das aves domésticas  | 41        |
| 4.1.7 Filogenia das aves domésticas   | 41        |
| 4.2 Aves exóticas   | 47        |
| 4.2.1 Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> em aves exóticas  | 47        |
| 4.2.2 Morfometria dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> das aves exóticas  | 49        |
| 4.2.3 PCR primária de amostras de aves exóticas   | 49        |
| 4.2.4 Nested-PCR de aves exóticas   | 50        |
| 4.2.5 RFLP-PCR das amostras de aves exóticas  | 50        |
| 4.2.6 Sequenciamento das aves exóticas  | 51        |
| 4.2.7 Filogenia das aves exóticas   | 51        |
| <b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>   | <b>60</b> |
| 5.1 Aves domésticas   | 60        |
| 5.2 Aves exóticas   | 62        |
| <b>6 CONCLUSÕES</b>   | <b>66</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>67</b> |
| <b>ANEXO</b>  | <b>79</b> |
| A- Lista das aves exóticas utilizadas no trabalho: nome comum, nome científico, ordem e localidade da coletas das amostras fecais | 79        |

## LISTA DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Figura 1</b> Relação filogenética entre as espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> , analisadas pelo Neighbor-Joining de seqüências parciais do SSU rRNA gene. Os valores nos ramos são as percentagens do Bootstrap, usando 1000 replicas. Os números após os nomes das espécies ou genótipos são as identificações dos isolados usados na construção da árvore filogenética. Os números entre parênteses representam a quantidade de isolados seqüenciados (FAYER; XIAO et al. 2008).                 | 24     |
| <b>Figura 2</b> Imagem geral do mercado (A e B) com a disposição das gaiolas com as diversas espécies de animais comercializados.   | 26     |
| <b>Figura 3</b> Imagem detalhada das várias espécies de animais dispostos nas gaiolas (A); criança observando os animais (B).   | 28     |
| <b>Figura 4</b> Imagem geral de um <i>pet shop</i> . Animais dispostos em gaiolas (A e B); um gato criado à solta em uma das lojas de comercialização próximo a gaiolas de aves (B).  | 28     |
| <b>Figura 5</b> Imagem geral externa de um criadouro de aves exóticas: Vista frontal do galpão com parede e tela, com acesso por porta de madeira e tela (A); Vista posterior com cortina de proteção em material plástico (B); Vista interna do galpão com chão de terra batida, com comedouros e bebedouros pendulares, aves exóticas em poleiros (C, D e E); Aves domésticas criadas soltas na propriedade: patos e galinhas juntos em chão de terra batida (F e H); gansos e patos criados solto no lago (G). | 29     |
| <b>Figura 6</b> Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. provenientes de amostras fecais de aves domésticas de mercados municipais do Rio de Janeiro, utilizando a técnica de diagnóstico de centrífugo flutuação em solução saturada de açúcar. Oocistos de codornas em contraste de fase – A; oocistos de patos em contraste de fase - B; oocistos de pintos C e D.   | 34     |
| <b>Figura 7</b> Amplificação pela PCR primária do gene 18S rDNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. Marcador de tamanho (pares de bases); amostra positiva para <i>Cryptosporidium</i> sp. provenientes de bezerros, C+: controle positivo, C-: controle negativo.  | 36     |
| <b>Figura 8</b> Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. 1-22: amostras de <i>Cryptosporidium</i> sp. provenientes de pintos. M: marcador de tamanho (pares de bases), C <sup>+</sup> : controle positivo bovino e C <sup>-</sup> : controle negativo.   | 36     |
| <b>Figura 9</b> Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. 1-16: amostras de <i>Cryptosporidium</i> sp. de codornas. M:  | 37     |

marcador de tamanho (pares de bases), C<sup>+</sup>: controle positivo bovino e C<sup>-</sup>: controle negativo.

**Figura 10** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. 1-14: *Cryptosporidium* sp. provenientes de patos. M: marcador de tamanho (pares de bases), C<sup>+</sup>: controle positivo bovino e C<sup>-</sup>: controle negativo. 37

**Figura 11** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de patos. Colunas 1 a 4: produto da digestão *SspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pares de bases). 38

**Figura 12** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de patos. Colunas 1 a 4: produto da digestão *VspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pares de bases). 39

**Figura 13** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de pintos. Colunas 1 a 5: produto da digestão *SspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pares de bases). 39

**Figura 14** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de pintos. Colunas 1 a 5: produto da digestão *VspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pb). 40

**Figura 15** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de codornas. Colunas 1 a 6: produto da digestão *SspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pb). 46

**Figura 16** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de codornas. Colunas 1 a 6: produto da digestão *VspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pb). 41

**Figura 17** Árvore filogenética de seqüências do gene 18S rRNA de isolados de *Cryptosporidium* de aves domésticas do Brasil (em negrito) e outras espécies do GenBank. Os números mostram valores maiores que 50 % do bootstrap para neighbor joining e maximum parsimony (entre parênteses e negrito). 46

**Figura 18** Oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de amostras fecais de aves exóticas de *pet shops* do Rio de Janeiro observados na microscopia após a 48

- utilização da técnica de centrífugo flutuação em solução saturada de açúcar. A) Oocistos deformados pela ação da solução saturada de açúcar (→).
- Figura 19** Amplificação pela PCR primária do gene 18S rDNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. Marcador de tamanho (pares de bases); amostra positiva para *Cryptosporidium* sp. provenientes de bezerros, C<sup>+</sup>: controle positivo, C<sup>-</sup>: controle negativo. 50
- Figura 20** Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. 1-14: *Cryptosporidium* sp. provenientes de Produtos da Nested-PCR de amostras fecais de aves exóticas. Colunas 1, 3 e 4: Calopsita, 2: Manon, 5: Calafate e 6: Canário.. M: marcador de tamanho (pares de bases), C<sup>+</sup>: controle positivo bovino e C<sup>-</sup>: controle negativo. 50
- Figura 21** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de aves exóticas. Colunas 1, 3 e 4: Calopsita; coluna 2: Manon; coluna 5: Calafate e na 6: Canário. A) Produto da digestão *SspI*, B) Produto da digestão *VspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso Molecular. 52
- Figura 22** Árvore filogenética de seqüências do gene 18S rRNA de isolados de *Cryptosporidium* de aves exóticas do Brasil (em negrito) e outras espécies do GenBank. Os números mostram valores maiores que 50 % do bootstrap para neighbor joining e maximum parsimony (entre parênteses e em negrito). 58
- Figura 23** Pinto (*Gallus gallus domesticus*) de mercado local em gaiola no biotério. 60
- Figura 24** Pato (*Anas platyrhynchos domesticus*) de mercado local em gaiola no biotério. 60
- Figura 25** Codorna (*Coturnix coturnix japonica*) de mercado local em gaiola no biotério. 61
- Figura 26** Manon (*Lonchura striata domestica*) exposto em gaiolas em um dos locais de comercialização. 62
- Figura 27** Calafate (*Lonchura paddy oryzivora*) expostos em gaiola de *Pet Shop* da baixada fluminense. 63
- Figura 28** Canários (*Serinus canaria*) expostos em gaiolas em um dos locais de comercialização. 64
- Figura 29** Calopsita (*Nymphicus hollandicus*) exposta a comercialização em *Pet Shop* da baixada fluminense. 65



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> Espécies de <i>Cryptosporidium</i> consideradas válidas, e seus principais hospedeiros.  | 5  |
| <b>Tabela 2</b> Morfometria das espécies de <i>Cryptosporidium</i> consideradas válidas para aves.   | 6  |
| <b>Tabela 3</b> Genótipos de <i>Cryptosporidium</i> relatados até o momento.   | 7  |
| <b>Tabela 4</b> Genótipos de <i>Cryptosporidium</i> provenientes de vários hospedeiros.  | 12 |
| <b>Tabela 5</b> Genes utilizados na biologia molecular do gênero <i>Cryptosporidium</i>  | 13 |
| <b>Tabela 6</b> Primers utilizados na caracterização dos genes SSu rRNA, HSP70 e actina, para várias espécies de <i>Cryptosporidium</i> .  | 17 |
| <b>Tabela 7</b> Fragmentos gerados pelas enzimas <i>SspI</i> e <i>VspI</i> de espécies e/ou genótipos de <i>Cryptosporidium</i> .  | 20 |
| <b>Tabela 8</b> Primers utilizados na amplificação do gene 18 SrRNA.   | 30 |
| <b>Tabela 9</b> Dados morfométricos (médias e desvio-padrão) dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. provenientes de patos, codornas e pintos de mercados municipais do Rio de Janeiro. | 35 |
| <b>Tabela 10</b> Distâncias filogenéticas calculadas pelo Parâmetro Kimura 2, entre seqüências de <i>Cryptosporidium</i> de aves domésticas do estudo e seqüências do Genbank.             | 44 |
| <b>Tabela 11</b> Similaridades genéticas dos isolados de patos, pintos e codornas com espécies do Genbank e códigos de acesso.   | 45 |
| <b>Tabela 12</b> Dados morfométricos (médias e desvio-padrão) dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. provenientes de aves exóticas no Rio de Janeiro.                                  | 49 |
| <b>Tabela 13</b> Distância Genética usando Parâmetro Kimura-2, entre seqüências de <i>Cryptosporidium</i> em aves exóticas e as seqüências do GenBank.                                     | 56 |
| <b>Tabela 14</b> Similaridades genéticas com seqüências do Genbank e seqüências obtidas no estudo de aves exóticas no Brasil.:   | 57 |

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Alinhamento das sequências de *C. parvum* e *C. baileyi* (isolados de domésticas) e *C. parvum* e *C. baileyi* do GenBank. Lacunas são marcadas por (-) e nucleotídeos idênticos por (.). 42
- Quadro 2** Alinhamento das sequências de *C. parvum* e Genótipo Aviário III (isolados de domésticas) e *C. parvum* e Genótipo Aviário III do GenBank. Lacunas são marcadas por (-) e nucleotídeos idênticos por (.). 53

## 1 INTRODUÇÃO

A família Cryptosporidiidae é composta por um único gênero, *Cryptosporidium* que tem a capacidade de parasitar células epiteliais do trato gastrointestinal e respiratório de grande variedade de hospedeiros invertebrados e vertebrados.

Das várias espécies que compõem o gênero, algumas apresentam fraca especificidade por hospedeiros. Nestas enfatiza-se a importância para a saúde pública, já que o homem tem susceptibilidade à infecção provocada por algumas espécies do gênero, caracterizadas como zoonóticas.

Atualmente estão descritas 21 espécies de *Cryptosporidium*. Com o auxílio da genética foi possível concluir que existem vários genótipos dentro de espécies já descritas. Este fato é considerado de grande relevância para o estabelecimento de estratégias de controle da doença baseados em estudos taxonômicos associados à epidemiologia.

O uso de ferramentas moleculares tem auxiliado no entendimento das espécies de *Cryptosporidium*, relacionando: a especificidade por hospedeiro, a transmissão, a clínica da doença, estabelecimento de espécies que podem infectar o homem, associação das variáveis sócio-econômicas, epidemiológicas, temporais e geográficas, a heterogeneidade dentro de cada espécie, a identificação dos meios de infecção ou contaminação, a caracterização das dinâmicas de transmissão, do espectro clínico e a biologia da criptosporidiose (FAYER; XIAO, 2008; XIAO et al., 2000).

A correta classificação das espécies de *Cryptosporidium* é baseada na proposta da caracterização polifásica, que envolve a investigação de aspectos como: morfologia (diferenças no tamanho e formato do oocisto), biologia (especificidade em relação ao hospedeiro, local de parasitismo, patogenicidade, períodos patente e pré-patente, intensidade de eliminação de oocistos) e a genética (diferenças na sequência de nucleotídeos de genes como SSU rRNA, HSP70 e COWP) (EYGED et al., 2003), desta forma auxiliando no entendimento da taxonomia e sustentando uma classificação segura de espécies do gênero.

A criptosporidiose é uma das infecções parasitárias mais prevalentes em aves silvestres, domésticas e de cativeiro em várias partes do mundo (SRÉTER; VARGA, 2000), e já foi relatada em mais de 30 espécies de aves pertencentes a várias ordens como Anseriformes, Chadriformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes e Struthiniformes (KUHN et al., 2002; JELLISON et al., 2004 ; RYAN et al. 2004; KIM et al., 2005; KWON et al., 2005; MEIRELES et al., 2006), podendo causar morbidade e mortalidade nas aves.

Atualmente a atenção dos pesquisadores está voltada para a capacidade de espécies de *Cryptosporidium*, denominadas aviárias, serem capazes de infectar humanos. Além disso, relatos de dispersão mecânica de formas infectantes por aves indicam que estas são as principais responsáveis pela contaminação de reservatórios de água, provocando grandes surtos da doença em humanos, principalmente para os indivíduos inseridos no grupo de risco : imunocomprometidos, gestantes, idosos e crianças.

Apesar da importância da identificação das espécies presentes na epidemiologia da criptosporidiose aviária, poucos são os estudos relacionados com a caracterização destas espécies e/ou genótipos capazes de causar a infecção em aves.

O estudo teve como objetivo realizar o diagnóstico morfológico de *Cryptosporidium* sp. e submeter amostras positivas à caracterização genotípica para verificar a diversidade genética de espécie(s) e/ou genótipo(s) presentes na infecção natural de aves domésticas e exóticas comercializadas em mercados, *pet shops* e criadouros localizados no estado do Rio de Janeiro, associando possíveis fatores de risco à infecção, sendo um estudo inédito no estado do Rio de Janeiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

A primeira descrição de um protozoário que infectava as células epiteliais do estômago de camundongos foi feita em 1907 por TYZZER, que nomeou o gênero de *Cryptosporidium*. Em 1910, observando a localização gástrica do parasito nominou a primeira espécie do gênero, *C. muris* (TYZZER, 1912).

A família Cryptosporidiidae foi estabelecida somente em 1911 por LÉGER e em 1912, TYZZER descreveu outra espécie do mesmo gênero, tendo esta, como local de parasitismo, as células epiteliais intestinais de camundongos, denominando-a *C. parvum*.

A primeira descrição do protozoário em aves foi realizada em 1929, por TYZZER, que descreveu *Cryptosporidium* sp. em cecos de frangos nomeando a espécie de *C. parvum*, o que mais tarde foi considerado como sinônimo de *C. baileyi* (CURRENT et al., 1986), sendo esta a primeira descrição do protozoário em aves. SLAVIN (1955) relatou um protozoário, estruturalmente similar, em perus, nomeando de *C. meleagridis* e atribuindo ao protozoário causa de mortalidade em animais jovens de uma criação comercial.

Em 1971, foi descrito o primeiro caso de diarreia em bezerros tendo como agente etiológico *Cryptosporidium* (PANCIERA et al., 1971).

Em 1976, dois relatos simultâneos de criptosporidiose em pacientes humanos imunocompetentes e com imunodepressão chamaram a atenção na medicina humana, pelo fato de o protozoário ainda não ter sido diagnosticado nesse hospedeiro (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976).

Em 1993, o interesse no estudo da criptosporidiose humana aumentou depois de um surto, devido à contaminação de reservatórios de água, em Milwaukee, Wisconsin, que atingiu um número estimado de 403 mil pessoas (MACKENZIE et al., 1994).

A significância do gênero foi inicialmente reconhecida, pelo fato de ser um patógeno oportunista em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (NANNINI; OKHUYSEN, 2002) e atualmente, a criptosporidiose é uma doença bem estudada e relatada em várias espécies de hospedeiros.

Com o aperfeiçoamento dos métodos moleculares para detecção e identificação de espécies envolvidas com a infecção em determinados hospedeiros, esta se tornou o alicerce para estudos taxonômicos e epidemiológicos, assim como a subgenotipagem genômica, proteômica e investigações bioquímicas, todas direcionadas para elucidar novas descobertas e caracterização de novas espécies de *Cryptosporidium* (FAYER; XIAO, 2008).

Em relação as aves, três espécies de *Cryptosporidium* são consideradas válidas, tanto para aves domésticas e quanto para as silvestres: *C. baileyi* (CURRENT et al., 1986), *C. meleagridis* (SLAVIN, 1955) e *C. galli* (RYAN et al., 2003).

A espécie *Cryptosporidium meleagridis* foi originalmente descrita parasitando células epiteliais intestinais de perus, *C. baileyi* foi descrita parasitando a bursa de Fabricius, cloaca e trato respiratório de frangos, e *C. galli* foi caracterizada parasitando proventrículo de pássaros (RYAN et al., 2003).

Estudos recentes têm demonstrado que novos genótipos de *Cryptosporidium* estão sendo identificados infectando aves e sugerem que pode ser muito maior o número de espécies que infectam esses hospedeiros (MORGAN et al., 2001; XIAO et al., 2002).

Um destes estudos de genotipagem de *Cryptosporidium* em aves identificou o protozoário em patos negros e gansos do Canadá, que apresentavam doença intestinal. Este estudo revelou que esses hospedeiros não estavam sendo infectados por nenhuma das espécies anteriormente descritas para aves, e devido a grande diferença genética e poucos dados de

biologia foram denominados de genótipos, o Genótipo de Pato e os Genótipos de Ganso I, II, III e IV (MORGAN et al., 2001; JELLINSON et al., 2004).

A identificação de isolados de *Cryptosporidium* proveniente de avestruzes, apresentou oocisto similar a espécie *Cryptosporidium meleagridis*. Porém em estudos biológicos não demonstrou efetividade de infecção para outras espécies de aves, como pintos, perus e codornas, demonstrando ser diferente desta espécie. Mais tarde, com estudos moleculares foi caracterizada como Genótipo II ou Genótipo de Avestruz (MEIRELES et al. 2006).

Ng et al. (2006), encontraram quatro novos genótipos (genótipo I, II, III e IV) de *Cryptosporidium* infectando aves de cativeiro.

Além da ampla diversidade genética encontrada em isolados de aves, espécies que usualmente não eram encontradas parasitando esta classe de animais estão cada vez mais sendo identificadas infectando aves. Estudos demonstraram as espécies *C. muris* e *C. andersoni*, que usualmente infectam mamíferos, foram encontradas em gansos do Canadá (GRACZYK, 1996; ZHOU et al., 2004), *C. parvum* vem sendo uma das espécies mais encontrada em aves de cativeiro e domésticas (LYNDSAY et al., 1990; GRACZYK et al., 1998; ZYLAN et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009) indicando que, além do aumento da diversidade genética, uma ampliação nos hospedeiros para determinadas espécies vem ocorrendo.

## 2.2 Classificação Taxonômica

O gênero *Cryptosporidium* tem sido classificado, juntamente com outros coccídios entéricos, na ordem Eucoccidiorida com base em muitas similaridades de suas características morfológicas e ciclos de vida (O'DONOGHUE, 1995).

Com base na proposta de classificação por Levine em 1985, esse protozoário pertence ao Filo Apicomplexa, caracterizado por apresentar estrutualmente um complexo apical que lhe confere a capacidade de penetrar em células, e todos os seus representantes serem obrigatoriamente parasitas da Classe Sporozoasida. Apresenta reprodução assexuada e sexuada, com a produção de oocisto, forma infectante ao hospedeiro; subclasse Coccidiasina, com ciclo de vida que envolve merogonia ou esquizogonia, gametogonia e esporogonia; ordem Eucoccidiorida. No seu ciclo biológico desenvolve a merogonia ou esquizogonia; subordem Eimeriona com o desenvolvimento independente de macrogamonte e microgamontes, sem a produção de zigoto móvel, família Cryptosporidiidae, que apresenta oocisto contendo quatro esporozoítas, esporocisto ausente com todos os estágios endógenos isoladamente se desenvolvem em vacúolo parasitóforo na superfície das células parasitadas considerados como intracelulares extracitoplasmáticos e tendo um ciclo biológico essencialmente monoxeno.

Desde as primeiras descrições, diversas espécies foram nomeadas em função dos hospedeiros nos quais foram encontradas. Os critérios para designar espécies válidas incluíam a especificidade por hospedeiro, a morfologia dos oocistos e o local de parasitismo. Contudo, para designar espécies pertencentes ao gênero *Cryptosporidium*, somente através desses critérios não há validação. Os oocistos das diferentes espécies são idênticos morfológicamente, e existe similaridade de morfometria entre muitas delas. Essas similaridades na estrutura têm causado confusão na nomenclatura de várias espécies de *Cryptosporidium* (PEDRAZA-DIAZ et al., 2000) associada à baixa especificidade de hospedeiro que algumas possuem e, portanto não são critérios que sustentam uma classificação segura (GASSER; O'DONOGHUE, 1999; XIAO et al., 2004a). Estudos genéticos têm descoberto a existência de grande diversidade dentro desse gênero (FAYER et al., 2000). É observado que o protozoário, em seus estágios sexuados, pode realizar recombinações intra-específicas e isto tem sido demonstrado com *C. parvum* (MALLON et al.,

2003a); porém outros pesquisadores afirmam que há grande número de parasitas similares geneticamente e, como resultado, o *Cryptosporidium* tem um grande número de população clonal, como é demonstrado por análise de multilocus de populações (SULAIMAN et al., 2001). Atualmente, a morfologia, especialmente a morfometria dos oocistos, representa o alicerce para taxonomia dos protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, onde a estrutura de oocistos é usualmente uma das exigências para estabelecimento de espécies já consolidadas e de novas espécies (XIAO et al., 2004a), porém, para o gênero *Cryptosporidium*, a caracterização molecular que tem ajudado a clarificar e compreender a sua taxonomia e somente através destes estudos as espécies podem ser validadas (EYGED et al., 2003).

O gênero *Cryptosporidium* possui 21 espécies consideradas válidas (Tabela 1). Além dessas espécies, existem aproximadamente 40 genótipos, que são distintos e, em sua maioria, pertencem provavelmente a espécies crípticas (SMITH et al., 2006). Porém, não há dúvida de que muitas outras possam existir, assim como genótipos isolados de muitos hospedeiros. Para que esses genótipos sejam designados como espécies, devem ser estudadas, bem como comprovadas diferenças moleculares, biológicas e morfológicas entre eles, e poderão futuramente ser redescritos como novas espécies (FAYER; XIAO, 2008).

## 2.3 Criptosporidiose

### 2.3.1 Humanos

O gênero *Cryptosporidium* é reconhecido como um patógeno causador de diarreia (TZIPORI; WIDMER, 2000). Em pacientes imunocompetentes, as infecções levam à invasão e destruição do epitélio intestinal, causando distúrbio na absorção de nutrientes. Geralmente a doença é assintomática nesse grupo. Quando apresenta sintomatologia clínica, destaca-se por dores abdominais, diarreia, vômito e perda de peso.

Em indivíduos imunodeficientes como aqueles portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida humana (AIDS) e em pacientes transplantados, etc., desenvolvem-se diarreias crônicas, causando perda de peso acentuada e podendo levar à morte (O'DONOGHUE, 1995).

A transmissão de *Cryptosporidium*, de animais domésticos para humanos, tem sido observada por vários autores, havendo muitos relatos de humanos que adquiriram a protozoose após a exposição a animais infectados (O'DONOGHUE, 1995).

No histórico das espécies endêmicas de *Cryptosporidium* que infectam humanos em várias partes do mundo, cinco espécies são responsáveis pela maioria das infecções, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto em imunocomprometidos, sendo estas, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*. Ocasionalmente, outras poucas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* são encontrados em humanos, como *C. muris*, *C. suis*, *C. andersoni*, e genótipos de *Cryptosporidium* de cervo e do macaco (XIAO; FENG, 2008).

Estudos de epidemiologia molecular em países em desenvolvimento revelaram que a complexidade na transmissão de *C. hominis* depende do país em que possa ocorrer esta. Nesses países, geralmente, há uma alta endemicidade de *Cryptosporidium* e baixa ocorrência de surtos, sendo as crianças e os indivíduos imunocomprometidos os mais afetados. É importante ressaltar que a baixa prevalência de infecções mistas, reportadas em crianças, deve-se ao fato de ser detectado apenas o genótipo dominante. Os resultados de estudos de subtipagem de *C. hominis* (alelos Ia, Ib, Id, Ie) revelaram a diversidade da transmissão em áreas endêmicas e enfatizaram a necessidade de extensos estudos de epidemiologia da criptosporidiose (CHALMERS et al., 2005; CAMA et al., 2007, 2008). Atualmente, a atenção dos pesquisadores tem se voltado para a capacidade de o *C. meleagridis* infectar o homem.

**Tabela 1** Espécies de *Cryptosporidium* consideradas válidas e seus principais hospedeiros.

| ESPÉCIES              | REFERÊNCIAS                                | PRIMEIROS HOSPEDEIROS             |                     |
|-----------------------|--|-----------------------------------|---------------------|
| <i>C. andersoni</i>   | Lindsay et al., 2000                       | <i>Bos taurus</i>                 | boi                 |
| <i>C. baileyi</i>     | Current et al., 1986                       | <i>Gallus gallus</i>              | Galinha             |
| <i>C. bovis</i>       | Fayer, 2005                                | <i>Bos taurus</i>                 | Boi                 |
| <i>C. canis</i>       | Fayer et al., 2001                         | <i>Canis familiaris</i>           | Cão                 |
| <i>C. fayeri</i>      | Ryan et al., 2008                          | <i>Macropus rufus</i>             | Canguru             |
| <i>C. felis</i>       | Iseki, 1989                                | <i>Felis catus domesticus</i>     | Gato                |
| <i>C. fragile</i>     | Jirků et al., 2008                         | <i>Duttaphrynus melanostictus</i> | Sapo                |
| <i>C. galli</i>       | Ryan et al., 2003                          | <i>Gallus gallus</i>              | Galinha             |
| <i>C. hominis</i>     | Ryan et al., 2002                          | <i>Homo sapiens</i>               | Homem               |
| <i>C. macropodum</i>  | Power; Ryan, 2008                          | <i>Macropus giganteus</i>         | Canguru             |
| <i>C. meleagridis</i> | Slavin, 1955                               | <i>Meleagris gallopavo</i>        | Peru                |
| <i>C. molnari</i>     | Alvarez-Pellitero<br>Sitjá-Bobadilla, 2002 | <i>Sparus aurata</i>              | Peixe               |
| <i>C. muris</i>       | Tyzzar, 1910                               | <i>Mus musculus</i>               | Camundongo          |
| <i>C. parvum</i>      | Tyzzar, 1910                               | <i>Mus musculus</i>               | Camundongo          |
| <i>C. ryanae</i>      | Fayer et al., 2008                         | <i>Bos taurus</i>                 | Boi                 |
| <i>C. saurophilum</i> | Koudela Modry, 1998                        | <i>Scophthalmi maximus</i>        | Peixe óseo          |
| <i>C. serpentis</i>   | Levine, 1980                               | <i>Elaphe guttata</i>             | Serpente            |
| <i>C. suis</i>        | Ryan et al., 2004                          | <i>Sus scrofa</i>                 | Suíno doméstico     |
| <i>C. varanii</i>     | Pavlassek et al., 1995                     | <i>Varanus prasinus</i>           | Lagarto             |
| <i>C. wrairi</i>      | Vetterling et al., 1971                    | <i>Cavia porcellus</i>            | Porquinho-<br>Índia |
| <i>C. xiaoi</i>       | Fayer; Santín, 2009                        | <i>Ovis aries</i>                 | Ovelha              |

Esta é a terceira espécie mais encontrada na infecção em humanos, a primeira é por *C.hominis* e a segunda por *C.parvum* (FAYER;XIAO, 2008). A infecção por esta espécie foi verificada em sete crianças, em Lima, no Peru. Nesse estudo investigativo de causas de diarreia, foi observado que em três casos, ocorreu a infecção por *C. meleagridis* (XIAO et al., 2001). Cama et al. (2003) estudaram as espécies de *Cryptosporidium* em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e constataram que a infecção por *C. hominis* ocorreu em 67,5% dos pacientes, e por *C. meleagridis*, presente em 12,6% das amostras fecais examinadas.

Além disso, *C.parvum*, uma espécie comumente encontrado em humanos e mamíferos, está sendo cada vez mais diagnosticada em aves domésticas e silvestres (GRACZYK et. al., 1996; ZYLAN et al., 2008; NAKAMURA et al. 2009). Não se sabe ao certo o mecanismo de transmissão para essas aves, porém, apesar de ser sugerido que estas são contaminadores mecânicos dos ambientes em que vivem, podem também serem infectados pela espécie em questão (LINDSAY et al., 1990; ZYLAN et al., 2008).

### 2.3.2 Aves

Até o momento apenas três espécies de *Cryptosporidium* capazes de infectar aves são reconhecidas; *C. meleagridis* (SLAVIN, 1955), *C.baileyi* (CURRENT et al.,1986) e *C.galli* (RYAN et al.,2003) (Tabela 2), e dez novos genótipos aviários já foram descritos (Tabela 3).

**Tabela 2** Morfometria das espécies de *Cryptosporidium* consideradas válidas para aves.

| ESPÉCIES              | DIÂMETRO MAIOR (µm) | DIÂMETRO MENOR (µm) | ÍNDICE MORFOMÉTRICO | REFERÊNCIA           |
|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| <i>C. meleagridis</i> | 4.5–6.0             | 4.2–5.3             | 1.00–1.33           | Lindsay et al., 1989 |
| <i>C. baileyi</i>     | 6.0–7.5             | 4.8–5.7             | 1.05–1.79           | Lindsay et al., 1989 |
| <i>C. galli</i>       | 8.0–8.5             | 6.2–6.4             | 1.3                 | Ryan et al., 2003    |

Fonte: Modificado de Xiao e Fayer, 2010.

*Cryptosporidium meleagridis* é uma espécie encontrada no intestino delgado e grosso e bolsa cloacal e é uma espécie que tem sido associada à causa de enterite e mortalidade (SLAVIN, 1955). Parece ter uma grande variedade de hospedeiros sendo descrita infectando várias espécies de aves, incluindo perus, papagaios, galinhas, calopsitas (MORGAN et al., 2000; SRÉTER ; VARGA, 2000; HUBER et al., 2007). Esse parasito também é um patógeno dito emergente para humanos, sendo a terceira espécie de *Cryptosporidium* mais encontrada em humanos (XIAO; FAYER, 2008). Alguns autores sugerem que *C.meleagridis* poderia se *C. parvum* (SRÉTER; VARGA, 2000), porém a análises moleculares tem demonstrado a singularidade genética e biológica desta espécie (XIAO et al., 1999, MORGAN et al. 2001; SULAIMAN et al. 2002). Porém, análises filogenéticas sugerem que *C.meleagridis* foi originalmente um parasita de mamíferos que se estabeleceu em aves através da ingestão de presas infectadas (XIAO et al.,2001). Análises filogenéticas sugerem que a espécie *C.meleagridis* possivelmente foi originalmente um parasita de mamíferos que posteriormente se estabeleceu em aves através da ingestão de presas infectadas (XIAO et al., 2002). *Cryptosporidium baileyi* é provavelmente o mais comum espécie aviária, sendo relatada em perus, patos, gansos, calopsitas, codorna marrom, avestruz, periquito e falcões (RYAN, 2010).

**Tabela 3** Genótipos de *Cryptosporidium* relatados até o momento.

| <b>GENÓTIPO</b>          | <b>ESPÉCIE DE HOSPEDEIRO</b>  | <b>REFERÊNCIA</b>  |
|--------------------------|---|--|
| Aviário I                | Canário<br>( <i>Serinus canaria</i> )   | Ng et al., 2006  |
| Aviário II               | Papagaio ( <i>Eclectus roratus</i> )<br>Cacatua ( <i>Eolophus roseicapilla</i> )<br>Calopsita ( <i>Nymphicus hollandicus</i> ),<br>Cacatua ( <i>Cacatua leadbeateri</i> , | Meiros et al., 2006<br>Ng et al., 2006                             |
| Aviário III              | Galah ( <i>Eolophus roseicapilla</i> ),<br>Calopsita ( <i>Nymphicus hollandicus</i> ),<br>Aratinga ( <i>Aratinga solstitialis</i> )                                       | Ng et al., 2006  |
| Aviário IV               | <i>Japanese whiteeye</i><br>( <i>Zosterops japonica</i> )   | Ng et al., 2006  |
| <i>Eurasian Woodcock</i> | <i>Eurasian woodcock</i><br>( <i>Scolopax rusticola</i> )   | Ryan et al., 2003<br>Ng et al., 2006                               |
| Pato                     | Pato negro ( <i>Anas rubripes</i> )<br>Ganso ( <i>Branta canadensis</i> )   | Morgan et al., 2001<br>Zhou et al., 2004<br>Jellinson et al., 2004 |
| Ganso I                  | Ganso ( <i>Branta canadensis</i> )  | Xiao et al. 2002,<br>Zhou et al., 2004<br>Jellinson et al., 2004   |
| Ganso II                 | Ganso ( <i>Branta canadensis</i> )  | Zhou et al., 2004<br>Jellinson et al., 2004                        |
| Ganso III                | Ganso ( <i>Branta canadensis</i> )  | Jellinson et al., 2004   |
| Ganso IV                 | Ganso ( <i>Branta canadensis</i> )  | Jellinson et al., 2004   |

Fonte: Modificado de Ryan, 2010.

Geneticamente essa espécie está mais intimamente relacionada genótipo I e II e sua analisando a filogenia desta espécie a relação com os parasitas intestinais e gástricos não está claro, mas a análise do gene HSP70 este ficou em um cluster das espécies de *Cryptosporidium* gástricos ao invés do cluster parasita intestinal (XIAO et al., 2002).

A terceira espécie aviária de *Cryptosporidium* foi descrita por Pavlasek (1999) com base em diferenças biológicas. Infecções naturais provocadas por *C.galli* têm sido relatados em passarinhos, galinhas, papagaios, flamingos, pássaros exóticos e selvagens (RYAN, 2010)

Mais recentemente estudos morfométricos dos oocistos apresentaram diferenças estatisticamente significativas com as duas outras espécies de *Cryptosporidium* aviário, apresentando um tamanho maior que os das outras espécies (RYAN et al., 2003).

A localização gástrica de *C. galli* no hospedeiro e seu grande tamanho sugerem que é mais estreitamente relacionado com espécies e genótipos de *Cryptosporidium* gástricos como: genótipo aviário IV, *C.muris*, *C.andersoni* e *C.serpentis* (RYAN, 2010).

Em aves, a criptosporidiose manifesta-se em três formas clínicas, podendo causar doença gastrintestinal, respiratória e renal (FAYER;XIAO, 2008).

Espécies do gênero *Cryptosporidium* podem invadir glândulas esofágicas e salivares, proventrículo, intestino delgado, ceco, cólon e bolsa cloacal, em aves. Podem gerar letargia, decréscimo de peso, menor pigmentação e diarreias, sendo estes os mais comuns sinais clínicos observados nesses animais (SRÉTER; VARGA, 2000).

A infecção de aves por *Cryptosporidium meleagridis* geralmente é assintomática. As infecções entéricas têm sido associadas a moderada diarreia, e a diarreia severa, levando a desidratação, depressão, perda de peso e fraqueza. Como alterações histopatológicas têm sido relatadas atrofia e fusão das microvilosidades, hiperplasia e hipertrofia epitelial, hiperplasia das criptas intestinais, atrofia dos folículos da bursa de Fabrício e moderado infiltrado celular na lâmina própria (O'DONOGHUE, 1995).

Das três espécies que infectam aves, somente *Cryptosporidium baileyi* causa doença respiratória e é provavelmente a espécie mais comum encontrada em aves, como pintos, perus, codornas e avestruzes (LINDSAY et al., 1990; MORGAN et al., 2001).

Rhee et al. (1997), estudaram a infecção por *Cryptosporidium baileyi* em pintinhos e relataram que o parasitismo pode causar bursites difusas, crônicas, superficiais e purulentas, com moderada depleção de linfócitos e folículos linfóides.

Em estudos sobre a influência do parasitismo na capacidade imunológica de pintinhos com dois dias de idade, os pesquisadores constataram que a criptosporidiose apresenta um efeito imunossupressivo nos animais expostos a outros tipos de infecções, como a doença de Newcastle e a bronquite infecciosa. Este distúrbio imunológico é gerado pelas alterações morfofisiológicas da bursa de Fabrício, impostas pela presença e a reprodução do *Cryptosporidium baileyi*, sendo que boas medidas de manejo sanitário nas criações comerciais devem ser empregadas para controle da criptosporidiose, como as medidas preconizadas para a prevenção das doenças infecciosas (RHEE et al., 1998).

Recentes estudos indicam que o *Cryptosporidium baileyi* tem um importante papel na patogenia da doença respiratória, gerando perdas na produção, causando alta mortalidade e morbidade, especialmente em pintos de corte (LINDSAY et al., 1990). A presença de sinais clínicos, caracterizados por espirros e ronqueira, em aves inoculadas por via intratraqueal, sugere que *C.baileyi* pode ser considerado um dos agentes etiológicos do complexo respiratório das aves (MEIRELES et al., 1998).

Até o momento somente dois relatos de *Cryptosporidium* causando a criptosporidiose renal em aves foram feitos. O primeiro feito por Abassi et al. (1999) que relatou a doença depois da indução por infecção experimental com a espécie *C.baileyi* em galinhas co-infectadas com a doença de Marek. Os resultados observados mostraram que os rins ficaram pálidos e inchados com cristais visíveis nos ureteres e na superfície. Os oocistos foram

observados na microscopia de material raspado do rim através de técnica de centrífugo-flutuação. Observados histológicos revelaram nefrite intersticial subaguda, uretrite aguda. Vários estágios de desenvolvimento do parasita estavam presentes nas secções dos rins.

O segundo relato da criptosporidiose renal em aves feito por Tappel et al. 2000, observou uma mortalidade média de 1-2% ao dia. Também encontrou estágios de desenvolvimento na superfície das células epiteliais apicais dos túbulos renais e ureteres. A microscopia de varredura e a microscopia de transmissão eletrônica possibilitou a visualização do estabelecimento da criptosporidiose nas vilosidades e seu rompimento com esfoliação de células epiteliais parasitadas. Infiltração linfoplasmocítica na parede da uretra e hiperplasia das células epiteliais resultou na obstrução parcial da uretra, que pode ter induzido a gota visceral nas galinhas afetadas.

## 2.4 Epidemiologia

O protozoário do gênero *Cryptosporidium* tem sido detectado em vários reservatórios de abastecimento de água, conforme consta de vários relatos, da origem de surtos da doença, encontrada mundialmente (WIDMER et al., 2002).

Vários fatores são responsáveis pela distribuição e disseminação do protozoário, as quais ocasionam grande número de oocistos eliminados pelos seus hospedeiros: a) pequenas quantidades de oocistos podem estabelecer uma infecção; b) baixa especificidade de algumas espécies por hospedeiros; c) grande diversidade de hospedeiros; d) o pequeno tamanho dos oocistos; e) resistência dos oocistos às adversidades ambientais e aos tratamentos de águas convencionais, causando uma maior dispersão epidemiológica; f) os oocistos são eliminados sob forma infetante, esporulados, não necessitando de permanecer no ambiente para ser capaz de provocar o estabelecimento de uma infecção (XIAO et al., 2004b).

Todas essas características do gênero *Cryptosporidium* podem favorecer sua epidemiologia. A capacidade das espécies do gênero de infectar uma ampla variedade de animais vertebrados, incluindo o ser humano, o tornou um dos patógenos mais importantes causadores da doença nessa classe de hospedeiros (EYGED et al., 2003).

As rotas de transmissão podem ser de pessoa para pessoa, através do contato direto ou indireto, de animal para animal e, possivelmente, através de atividades sexuais. Podem ser disseminados através da água, alimentos e aerossóis (FAYER et al., 2000).

Apesar de a criptosporidiose ser um dos maiores problemas em saúde pública, tanto em países desenvolvidos, quanto em países em desenvolvimento, pesquisas têm demonstrado maior prevalência da infecção em países mais pobres que em países industrializados (XIAO et al., 2004a).

Nos países menos industrializados, encontram-se populações com grupos específicos de maior risco para a infecção, incluindo crianças, indivíduos com deficiências nutricionais, imunocomprometidos incluindo aqueles com HIV, pacientes fazendo uso de drogas imunossupressoras prolongadamente, pacientes recebendo quimioterapia e com infecções imunossupressivas (FAYER et al., 2000). Por ser um patógeno oportunista, o estado imunológico do hospedeiro determina a evolução da infecção (O'DONOGHUE et al., 1995).

Aves selvagens podem ter um papel muito importante na epidemiologia de criptosporidioses. As espécies do gênero *Cryptosporidium* em aves selvagens estão entre um dos patógenos mais disseminados pelo ganso do Canadá (*Branta canadensis*) (GRACZYK et al., 1998; ZHOU et al., 2004), o qual por ser ave migratória, pode contaminar outros ambientes aquáticos e conseqüentemente outras espécies de aves.

Apesar da maioria das infecções em aves terem sido detectadas em aves domésticas, e de alguns poucos trabalhos terem examinado a ocorrência de *Cryptosporidium* em populações de

aves silvestres poucos são os estudos relacionados a identificação das espécies causadoras da criptosporidiose aviária.

## 2.5 Diagnóstico

### 2.5.1 Convencional

A microscopia é utilizada para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* e é a metodologia mais antiga aplicada em amostras ambientais de água, de alimentos, de fezes e de tecidos (O'DONOGHUE, 1995; QUINTERO - BETANCOURT et al., 2003), porém utilizada isoladamente não é capaz de identificar as espécies envolvidas, além de ser muito demorada e requerer um observado bem treinado (FALL et al., 2003).

As técnicas utilizadas na visualização de oocistos na microscopia podem ser as de concentração e de coloração. Entre as técnicas de coloração podemos destacar a Dimetil Sulfoxido (DMSO) (POHJOLA et al., 1985), Kinyoun (MA; SOAVE, 1983), Safranina-azul de metileno (BAXBY et al., 1984) e Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), porém todas são de baixa especificidade e/ou sensibilidade, em especial para amostras contendo pequenas quantidades de oocistos (MORGAN; THOMPSON 1998).

Os métodos de concentração dos oocistos passaram a ser utilizados com grande sucesso na detecção da infecção, já que a concentração das 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), porém não são totalmente eficientes. Assim como as de coloração, são incapazes de identificar as espécies envolvidas com a infecção do hospedeiro.

Quando se utilizam técnicas de flutuação em solução de açúcar, os oocistos podem ser observados ligeiramente róseos; na microscopia de campo claro ou no contraste de fase, são claros e refringentes. Os oocistos encarquilham a partir de 15 minutos de observação, quando estão em solução saturada de açúcar, perdendo sua forma esférica, assim como, também, a sua coloração rósea (CURRENT; GARCIA, 1991).

### 2.5.2 Métodos Imunológicos

Os métodos imunológicos podem oferecer algumas vantagens em relação à microscopia, para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e diagnóstico da criptosporidiose.

A microscopia de fluorescência e da imunofluorescência direta (DFA) reconhece epítomos na superfície oocistos, tem demonstrado elevada especificidade (96-100%) e sensibilidade (98,5-100%) na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em esfregaços fecais e amostras ambientais (GRACZYK al. de 1996; SMITH, et al., 2003).

A detecção de antígenos de *Cryptosporidium* em amostras fecais ("coproantígenos") é outra abordagem diagnóstica. Imunoensaios como o teste ELISA e o teste Imunocromatografia (IC) (NEWMAN et al., 1993; GARCIA; SHIMIZU, 1997), demonstraram especificidade elevada (98-100%), porém mesmo assim a sensibilidade de detecção de coproantígenos pode ser menor do que a maioria das abordagens microscópicas (GARCIA; SHIMIZU, 2000; JOHNSTON et al., 2003).

Kits de diagnóstico podem também ser utilizados, porém estes dependem de uma inspeção visual da intensidade de coloração, o que pode levar a uma interpretação subjetiva dos resultados dos testes. As vantagens de alguns testes de coproantígenos com ensaios de microscopia é que estes podem detectar o estágio da infecção (pré-patência), podem ser utilizados com mais rapidez, são mais eficazes em relação aos custos e são capazes de rastrear um grande número de amostras fecais (GARCIA; SHIMIZU, 2000; JOHNSTON et al., 2003),

em menor tempo. Porém, vale ressaltar que os métodos imunológicos também não permitem que uma espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* seja identificado.

## **2.6 A biologia molecular do gênero *Cryptosporidium***

Dadas as limitações na detecção de espécies de *Cryptosporidium* utilizando microscópico e/ou imunológicos, uma variedade de métodos baseados em pesquisas de ácidos nucleicos tem sido desenvolvidas e avaliadas para a identificação de espécies. Observou-se que existem variações genéticas dentro do gênero, entre as espécies de amostras provenientes de fezes humanas e animais e em amostras ambientais ou de água (ABE et al., 2002; JEX et al., 2008).

Por causa da ampla habilidade de algumas espécies de *Cryptosporidium* infectarem humanos, e da variedade de animais hospedeiros que facilmente se infectam em ambientes contaminados, as ferramentas moleculares tem sido desenvolvidas para detectar e diferenciar espécies/genótipos e subgenótipos envolvidos na epidemiologia da criptosporidiose (XIAO; RYAN, 2004 ; CACCIO, 2005).

O uso dessas técnicas tem auxiliado na compreensão da biologia e na epidemiologia de espécies de *Cryptosporidium*, incluindo o conhecimento da estrutura das espécies e população genética, das suas várias rotas de transmissão na sua epidemiologia, e da significância do parasito na patogenia e manifestações clínicas (FAYER; XIAO, 2008).

Com o advento da biologia molecular, muitos métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos. Informações de seqüências de genes conhecidas deram lugar à descoberta de duas seqüências completas do genoma (FAYER; XIAO, 2008), o que foi muito importante para o melhoramento dos métodos de identificação e caracterização de estruturas e diversidade das espécies de *Cryptosporidium*.

Numerosos genótipos vêm sendo descritos (Tabela 4), isso ocorre pela incerteza associada com a taxonomia das espécies do gênero, e essas só podem ser nominadas após a diferença substancial da seqüência da subunidade SSU rRNA ou de outros genes (FAYER; XIAO, 2008).

A aplicação dessas ferramentas genéticas levou a um melhor conhecimento e compreensão da sistemática, biologia, epidemiologia, ecologia e genética de populações de espécies de *Cryptosporidium* (GASSER, 2006; SMITH et al., 2006), melhorando estratégias para a prevenção, vigilância e controle da criptosporidiose no homem e em várias espécies de animais.

### **2.6.1 O genoma de *Cryptosporidium***

O cariótipo é um conjunto cromossômico de uma espécie, ou seja, o número total de cromossomos de uma célula somática. Caracterizações do cariótipo de *C. parvum* revelaram cinco bandas eletroforéticas relativamente pequenas, 1Mb ou menos (MEAD et al., 1988).

A espécie *C. parvum* tem um genoma pequeno para um eucarioto (FAYER; XIAO, 2008). O tamanho do genoma foi estimado por Blunt et al. (1997) que encontraram um genoma de tamanho estimado de 10,4 Mb, com oito cromossomos, confirmado por análises dos cortes com enzimas de restrição (CACCIO et al., 1998).

Os genes descritos até o momento na literatura, os quais podem ser utilizados para caracterização molecular de isolados de *Cryptosporidium* são: o codificante da subunidade menor ribossomal (SSU rDNA ou SSU rRNA ou 18S rDNA ou 18S rRNA), o da proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP), o codificante da glicoproteína 60 kDa (GP60), o codificante da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP-70) e o gene codificante da Actina (GASSER et al., 2003; XIAO; RYAN, 2004; JEX et al., 2008) (Tabela 5).

**Tabela 4** Genótipos de *Cryptosporidium* provenientes de vários hospedeiros.

| <b>GENÓTIPOS INTESTINAIS</b>                       | <b>GENÓTIPOS GÁSTRICOS</b>           |
|--|--------------------------------------|
| <i>C. sp.</i> Bear                                 | <i>C. sp.</i> Caribou                |
| <i>C. sp.</i> Cervine 1,2,3                        | <i>C. sp.</i> lizard                 |
| <i>C. sp.</i> Deer                                 | <i>C. sp.</i> tortoise               |
| <i>C. sp.</i> Deer-like                            | <i>C. sp.</i> Woodcock               |
| <i>C. sp.</i> Deer mice                            | <i>C. galli</i> Finch                |
| <i>C. sp.</i> Duck                                 | <i>C. muris</i> Japanese field mouse |
| <i>C. sp.</i> Ferret                               |                                      |
| <i>C. sp.</i> Fox e Fox II                         |                                      |
| <i>C. sp.</i> Goose I e II                         |                                      |
| <i>C. sp.</i> Horse                                |                                      |
| <i>C. sp.</i> Marsupial I e II                     |                                      |
| <i>C. sp.</i> Mongoose                             |                                      |
| <i>C. sp.</i> Monkey                               |                                      |
| <i>C. sp.</i> Mouse                                |                                      |
| <i>C. sp.</i> Muskrat I e II                       |                                      |
| <i>C. sp.</i> Opossum I e II                       |                                      |
| <i>C. sp.</i> Ostrich                              |                                      |
| <i>C. sp.</i> Ovine                                |                                      |
| <i>C. sp.</i> Pig II ( Pig I sin. <i>C. suis</i> ) |                                      |
| <i>C. sp.</i> Rabbit                               |                                      |
| <i>C. sp.</i> Raccoon                              |                                      |
| <i>C. sp.</i> Seal 1 e 2                           |                                      |
| <i>C. sp.</i> Sheep novel genotype                 |                                      |
| <i>C. sp.</i> Sheep novel genotype                 |                                      |
| <i>C. sp.</i> Skunk                                |                                      |
| <i>C. sp.</i> Snake                                |                                      |
| <i>C. canis</i> coyote; Dog; Fox                   |                                      |

Fonte: Modificado de Fayer e Xiao, 2008

**Tabela 5** Genes utilizados na biologia molecular do gênero *Cryptosporidium*

| <b>MARCADORES GENÉTICOS<br/>OU LOCUS</b>                               | <b>VARIABILIDADE</b> | <b>PROPRIEDADES DOS<br/>MARCADORES</b>  |
|--|----------------------|---|
| RNA da subunidade menor ribossomal (SSU rRNA)                          | Baixa                | Específico ou identificação genotípica (Taxonomia, diagnóstico e epidemiologia).                        |
| Gene 70 kDa proteínas de choque térmico (HSP 70)                       | Baixa                | Específico ou identificação genotípica (Taxonomia, diagnóstico e epidemiologia)                         |
| Gene Actina (Actin)  | Baixa                | Específico ou identificação genotípica (Taxonomia, diagnóstico e epidemiologia)                         |
| Gene da proteína da parede do oocisto de <i>Cryptosporidium</i> (COWP) | Baixa                | Específico ou identificação genotípica (Taxonomia, diagnóstico e epidemiologia)                         |
| Espaços internos transcritos do DNA ribossômico nuclear (ITS-2)        | Moderado             | Identificação específica e alguns subespecífico caracterização (Taxonomia, diagnóstico e epidemiologia) |
| Genes Trombospondina-relacionadas à proteína (TRAP)                    | Moderado             | Específico ou identificação genotípica (Taxonomia, diagnóstico e epidemiologia)                         |
| Microssatélites locus 1 (ML1)  | Alta                 | Genotípica e / ou subgenotípica identificação (População genética e estudos epidemiológicos)            |
| Microssatélites Locus 2 (ML2)  | Alta                 | Genotípica e / ou subgenotípica identificação (População genética e estudos epidemiológicos)            |
| Gene Glicoproteica 60 kDa (gp60)                                       | Alta                 | Genotípica e / ou subgenotípica identificação (População genética e estudos epidemiológicos)            |

Fonte: Modificado de Jex et al., 2008.

## 2.6.2 Genes de *Cryptosporidium*

Por causa da diversidade de seqüência entre espécies de *Cryptosporidium* existentes nos genes HSP70, COWP e Actina, é difícil desenhar um primer de PCR gênero-específico baseados nestes genes, os quais são considerados de uso limitado na epidemiologia e na biologia molecular (FAYER; XIAO, 2008).

Além de o gene COWP apresentar alto grau de polimorfismo, o que gerou uma mistura de cinco ou seis conjuntos de primers para a detecção das variações interespecíficas, fazendo com que o gene possa ser utilizado na diferenciação entre *C. parvum*, *C. meleagridis* e *C. hominis* (AMAR et al., 2004). Ele possui uma cópia no genoma inteiro, o que resulta em uma menor sensibilidade dos métodos que utilizam o gene COWP, em levantamentos epidemiológicos, quando comparado ao SSU rRNA (McLAUHLIN et al., 1999).

As seqüências do gene SSU rRNA são as mais utilizadas, por serem universais e mostrarem grande número de seqüências conhecidas de espécies de *Cryptosporidium* (XIAO; RYAN, 2004) depositadas nos bancos de dados públicos. É uma região hipervariável localizada entre os nucleotídeos 615-850 com três regiões polimórficas que estão entre os nucleotídeos 179-271 (COUPE et al., 2005).

As técnicas associando a PCR do gene SSU rDNA e ao uso de enzimas de restrição (RFLP), são capazes de identificar praticamente todas as espécies de *Cryptosporidium*. Também há primers para a PCR primária e o Nested, que amplificam todas as espécies do gênero, possibilitando o posterior seqüenciamento ou RFLP para a determinação das espécies (XIAO; RYAN, 2004), além de possuir regiões conservadas, muito importantes para estudos filogenéticos.

Outros genes podem ser utilizados, porém com diversas finalidades diferentes. Os espaçadores internos transcritos (ITS) do DNA ribossomal são úteis para a detecção da variabilidade genética dentro de uma determinada espécie (GASSER et al., 2003, CHALMERS et al., 2005; SCHINDLER et al., 2005), pois suas seqüências possuem maior variação intraespecífica do que o gene RNA da subunidade menor ribossomal nas regiões examinadas (CARRAWAY et al., 1996; MORGAN et al., 1999). Porém devido a grandes diferenças na seqüência de diferentes cópias de ITS-1 dentro de um único isolado, somente espécies limitadas e genótipos de *Cryptosporidium* foram caracterizadas neste loci (Le BLANCQ et al., 1997).

O gene codificante das glicoproteínas presentes na superfície de esporozoítos gp 40 e gp15 (Cpgp 40/15), por ser um “locus” altamente variável. É de alta utilidade na sub-geotipagem de diferentes isolados de *Cryptosporidium*, particularmente o de *C. hominis*, o qual pode ser capaz de identificar quatro sub-genótipos (CEVALLOS et al., 2000; WINTER et al., 2000; COHEN et al., 2006).

A proteína adesiva relacionada à Trombospondina (TRAP) é membro de uma classe de proteínas presente nos apicomplexos. A proteína está associada com a superfície celular e o complexo micronemal destes parasitos, e acredita-se que esteja envolvida com o processo de aderência à superfície da célula hospedeira, e mudanças nesta proteína poderiam afetar a especificidade de aderência e, conseqüentemente, a especificidade quanto às espécies hospedeiras do parasito (PENG et al., 1997).

Mais recentemente, com “lôcus” altamente variável, regiões microssatélites, incluindo a gp60 (STRONG et al., 2000; SULAIMAN et al., 2005), locus 1 microssatélite (ML1) e 2 (ML2) (CHALMERS et al., 2005, HUNTER et al., 2007; LEONI et al., 2007), foram utilizadas, em investigações genéticas, de populações de *Cryptosporidium*, especialmente as das espécies humanas: *C. hominis* e *C. parvum*.

A escolha do gene alvo deverá ser feita mediante o objetivo da pesquisa, já que há diferenças entre a utilização de determinado gene e resposta esperada. Quando fazemos

pesquisa de genotipagem é necessária a escolha de genes com “loci” conservados, para posterior filogenia e com isso, o gene mais utilizado para avaliar as seqüências de nucleotídeos é a pequena subunidade ribossomal (SSU rRNA), pois apresenta limitadas variações nas seqüências em diversas regiões do gene, o que é ideal para estudos posteriores de filogenia. Porém se o objetivo da pesquisa é a determinação de subgenótipos, a variação dentro de uma determinada espécie ou genótipo, requer-se o uso de “loci” mais variáveis, como o gene hiper-variável da glicoproteína 60-kDa (GP-60) e o uso de micro-satélites (FERGUSON et al., 2006).

## **2.7 Diagnósticos Moleculares – Métodos de detecção de ácido nucléicos**

Com a impossibilidade de identificação de espécies envolvidas em isolados de *Cryptosporidium* utilizando-se somente a microscopia ou as técnicas imunológicas, as técnicas de estudo da biologia molecular foram sendo criadas e aperfeiçoadas, para o melhor entendimento da epidemiologia das espécies do gênero.

Atualmente, já sabemos que os métodos moleculares baseados em PCR são mais sensíveis que os convencionais, porém são freqüentemente restritos a laboratórios especializados, e são necessários para determinar espécies, genótipos e subgenótipos (FAYER; XIAO, 2008).

Muitos são os tipos de PCR que foram desenvolvidas para a melhor identificação e utilização da pesquisa baseada em ácido nucléico e incluem vários formatos de detecção e diferenciação como, PCR simples e Nested PCR, PCR da Transcriptase Reversa (Reverse Transcription PCR), PCR de Tempo Real (Real time PCR), Técnica do Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição – RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfism), Amplificação Randomizada do DNA Polimórfico – RAPD, uso de Micro e minisatélites, Polimorfismo da conformação de fitas únicas – SSCP (EYGED et. al., 2003).

As técnicas de detecção devem ser escolhidas cuidadosamente, porque somente algumas amplificam DNA gênero-específico, e já outras são espécie-específico de DNA, assim o entendimento é necessário para saber o que usar para a identificação (EYGED et. al., 2003; FAYER; XIAO, 2008; JEX et. al., 2008).

O ideal seria que essas ferramentas moleculares tivessem a habilidade de identificar todas as espécies do gênero, ou pelo menos as que infectam humanos. Porém poucas técnicas são capazes de fazer isto, porque a diversidade genética das espécies e genótipos só pode ser analisada através de poucos genes, o que torna difícil desenhar primers (Os primers de PCR são baseados em variação antigênicas, estruturais, em genes governantes, fragmentos genômico não conhecidos) de PCR - gênero específico eficiente, o que torna seu uso limitado na biologia molecular (FAYER; XIAO, 2008). Alguns primers descritos na literatura, baseados em genes alvos utilizados para PCR, estão descritos na Tabela 6.

### **2.7.1 Técnicas de biologia molecular aplicadas ao *Cryptosporidium***

#### **2.7.2 Obtenção do DNA para a realização das análises - Extração do DNA**

Para a utilização de qualquer técnica de biologia molecular, a primeira etapa é o isolamento do DNA. A obtenção de DNA é um grande problema quando nos referirmos à extração de DNA de espécies de *Cryptosporidium*, já que a ação de alguns fatores pode causar dificuldades no emprego da PCR como: a distribuição desigual de oocistos nas fezes fazendo com que a alíquota utilizada no procedimento não contenha oocistos ou possua uma

quantidade ínfima, a 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 (SCORZA et al., 2003).

Os oocistos de *Cryptosporidium* apresentam dupla parede rígida que não rompe com facilidade. Não havendo o rompimento da membrana, conseqüentemente a liberação do DNA não ocorrerá e, para que isto não ocorra, o primeiro passo seria o rompimento dos oocistos por vários meios físicos e químicos (GASSER al., 2006).

Os protocolos mais utilizados para promover a lise dos oocistos utilizam inúmeras combinações de técnicas, inserção e/ou retirada de certos reagentes, utilização por meios físicos, através de ciclos de congelamento e descongelamento usando-se nitrogênio líquido seguido de fervura do material contendo oocistos.

A extração do DNA ocorre posteriormente em soluções com proteinase K e pelo fenol-clorofórmio (WARD; WANG, 2001; NICHOLS et al., 2006), com o uso de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro e uso do vórtex, para promover a lise dos oocistos e a liberação do DNA. Esta lise mecânica é realizada na presença de Tiocianato de Guanidina 10M, podendo ser usada a solução comercial (Dnazol®) ou preparada no laboratório, que promove a diluição do DNA. O DNA fica retido na solução de Tiocianato de Guanidina, podendo ser precipitada pelo álcool 80% (McLAUHLIN et. al, 1999). Para inibir a formação de espuma durante o processo de extração com o uso do Tiocianato de Guanidina, o álcool isoamílico pode ser acrescentado ao processo (McLAUHLIN et. al, 1999). Estes métodos se apresentam eficientes e resolvem o problema da ruptura dos oocistos e liberação do DNA.

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). Portanto, protocolos para melhorar o isolamento de ácidos nucleicos a partir de gama de amostras biológicas ou ambientais contendo todas as espécies de *Cryptosporidium*, que de forma eficaz e consistente remova componentes que são inibitórios para o processo de amplificação enzimática, foram desenvolvidos (GASSER et. al., 2006).

Alguns destes protocolos, com objetivo de evitar o impacto negativo de tais substâncias, utilizam previamente técnicas de concentração e purificação dos oocistos, aumentando assim a sensibilidade da PCR. São diversas as técnicas descritas na literatura, indicadas para amostras fecais, sendo que, para aquelas que não sofreram congelamento antes do processamento, 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 um gradiente de sacarose (COUPE et al., 2005) ou Percoll ou outras soluções hipertônicas (KUCZYNSKA; SHELTON, 1999). Nichols et. al (2006) relatam altas taxas de amplificação na PCR, utilizando uma concentração prévia dos oocistos contidos nas amostras fecais utilizando água e éter para esta metodologia. 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. Porém 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). Para a remoção de inibidores também pode ser adicionado polivinilpirolidona (PVP) no processo de extração (COUPE et. al, 2005) ou na própria reação da PCR (NICHOLS et al., 2006)

## 2.8 PCR

Na PCR, regiões específicas do gene são amplificadas e um segmento específico do DNA pode ser amplificado através de sucessivos ciclos (SAIKI et al., 1988).

**Tabela 6** Primers utilizados na caracterização dos genes SSu rRNA, HSP70 e actina, para várias espécies de *Cryptosporidium*.

| GENE     | NOME DOS PRIMERS      | SEQÜÊNCIA (5' A 3')  | TAMANHO DO AMPLICON (BP) | USO   | REFERÊNCIA            |
|----------|-----------------------|--|--------------------------|---|-----------------------|
| SSU rRNA | SSU-F1<br>SSU-R1      | AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AGT C F<br>TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC G R     | ~1,750                   | Amplifica o gene rRNA completo da maioria de organismos eucariotos                            | Xiao et al., 1999     |
| SSU rRNA | SSU-F2<br>SSU-R2      | TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG F<br>CCCATTCCTTCGAAACAGGA R                         | ~1,325                   | Ambos os primers são específicos para <i>Cryptosporidium</i> e podem ser usados no nested PCR | Xiao et al., 2000     |
|          | SSU-F3<br>SSU-R3      | GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG F<br>AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A R        | ~820                     |   |                       |
| HSP70    | HSP-F1<br>HSP-R1      | ATG TCT GAA GGT CCA GCT ATT GGT ATT GA F<br>TTA GTC GAC CTC TTC AAC AGT TGG R  | ~2,010                   | Ambos os primers amplificam a maioria dos parasitos apicomplexas e são usados no nested PCR.  | Sulaiman et al., 2000 |
|          | HSP-F2<br>HSP-R2      | TAC TTC ATG CTG TTG GTG TAT GGA GAA A F<br>CAA CAG TTG GAC CAT TAG ATC C R     | ~1,950                   |   |                       |
| Actina   | Act-F1<br>Act-R1      | ATG AGA TGA AGA AGA TAA GCT ATC AAG C F<br>AGA AGA CAC TTT TCT GTG TGA CAA T R | ~1,095                   | Ambos os primers amplificam a maioria dos parasitos apicomplexas e são usados no nested PCR.  | Sulaiman et al, 2002  |
|          | Act-F2<br>Act-R2      | CAA GCA TTT GAG TTG TTG ATC AA R F<br>TTT CTG TGT GAC AAT ATG CAT TGG R        | ~1,066                   |   |                       |
| COWP     | COWP 1 F<br>COWP 2 R  | GGA AGA GAT TGT GTT CG F<br>GCA GGA GCT ACA TAT AG R                           | ~422                     | Ambos os primers amplificam a maioria dos parasitos apicomplexas e são usados no nested PCR.  | Kato et al., 2003     |
|          | COWP 3 F<br>COWP 4 R  | GTG TTC AAT CAG ACA CAG F<br>CTB TAT ATC CTG GTG GGC AGA R                     |                          |   |                       |
| COWP     | BCOWP F<br>BCOWP R    | ACC GCT TCT CAA CAA CCA TCT TGT CCT C F<br>CGC ACC TGT TTC CCA CTC AAT GTAA R  | ~312                     |   | Pedraza-Diaz, 2000    |
| TRAP C1  | TRAPC1F2<br>TRAPC1-R1 | TAA GGG TGG TGA TAA TGG CTG TA F<br>CCT TCT GAT AAA GTT GCA TTA TAC GAC C R    | ~769                     | Específico <i>C. parvum</i>   | Akiyoshi et al., 2002 |
| TRAP C1  | TRAPC1F1<br>TRAPC1-R1 | TAA AAG TGG TGA TAA CAF ATG CG F<br>CCT TCT GAT AAA GTT GCA TTA TAC GAC C R    | ~769                     | Específico <i>C. hominis</i>  | Akiyoshi et al., 2002 |

O princípio da técnica de PCR baseia-se na desnaturação de uma amostra de DNA de fita dupla através do aquecimento. Em seguida a temperatura é diminuída para permitir que seqüências conhecidas de oligonucleotídeos, chamados de iniciadores ou primers, realizem o anelamento nas seqüências complementares em fitas opostas do DNA molde o que gera a extensão ou síntese de DNA ao longo da fita molde, em ambas as direções, que é catalisada pela enzima termoestável DNA polimerase, obtendo-se duas fitas duplas de DNA que é usualmente repetida 20 a 40 vezes, utilizando-se um termociclador automatizado. Durante cada ciclo, o DNA molde é multiplicado por um fator dois, de forma que ao final do processo existem milhões de cópias do DNA moldes disponíveis para análises subseqüentes (GASSER, 2006). A primeira pesquisa de *Cryptosporidium* utilizando a PCR foi feita por Laxer et al. (1991), e desde de então muitas técnicas foram descritas para detecção de oocistos tanto em amostras biológicas quanto em ambientais (EYGED et al., 2003).

### **2.8.1 Nested -PCR**

Algumas vezes a detecção do DNA por meio da PCR simples foi considerada inviável, devido à baixa quantidade de DNA ou inibidores enzimáticos presentes na amostra. Assim foi desenvolvida a técnica da Nested PCR, para aumentar a especificidade e sensibilidade dos testes (MORGAN; THOMPSON, 1998). Esta técnica consiste em realizar uma amplificação primária da PCR simples, usando um par de primers específicos. Após, uma quantidade determinada do produto é utilizada como DNA molde numa nova PCR, utilizando-se geralmente um segundo par de primers específicos.

A Nested-PCR é um método sensível de PCR no qual o produto amplificado é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando produtos homólogos às seqüências internas dos produtos já amplificados, empregando iniciador gênero-específico. Portanto torna o PCR mais específico (JEX et al., 2008), com a mesma repetição de ciclos de resfriamento e aquecimento.

Apesar do uso da Nested-PCR aumentar os riscos de contaminação, podendo estes ser controlados pela observação de protocolos preventivos padrões (MORGAN; THOMPSON, 1998), este é especialmente importante quando é necessário detectar poucos organismos específicos, contidos em uma amostra, como ocorre na extração de DNA a partir de material fecal (AMAR et al., 2004).

### **2.8.2 PCR da transcriptase reversa**

Uma crítica à PCR convencional é que esta não diferencia entre oocistos de *Cryptosporidium* viáveis e inviáveis. Porém, esta informação é de grande importância para a estimativa do risco real ao qual a população humana está exposta, bem como à avaliação da eficácia dos sistemas de tratamento de água (HALLIER-SOULIER; GUILLOT, 2003; FERGUSON et al., 2006).

Como resposta ao problema foi desenvolvido um teste de PCR usando a detecção de RNAm pela PCR da Transcriptase Reversa (RT-PCR), baseado na informação de que organismos vivos utilizam a transcrição para formar RNAm, os quais sofrem rápida degradação após a morte do organismo (MORGAN; THOMPSON, 1998).

Esta técnica pesquisa a quantidade de RNAm presente na amostra, podendo ser produzido por diversos genes. Sob condições de estresse, o RNAm da proteína heat shock 70 (HSP70) é um dos maiores produtos de síntese, ocorrendo um aumento de 1000 a 10.000 vezes de sua quantidade, assegurando uma quantidade suficiente para a detecção. Este fato é importante, pois o resultado positivo na PCR indica a ocorrência de oocistos viáveis na amostra e risco de infecção para um hospedeiro. Porém têm sido sugeridos que a instabilidade

e meia-vida curta do HSP-70 não permitem a sua conservação em oocistos inviáveis (MORGAN; THOMPSON, 1998).

### **2.8.3 PCR em Tempo Real**

É um tipo de PCR que permite o monitoramento em tempo real. A técnica usa um corante SYBR Green em um termociclador/fluorômetro de capilar de vidro especialmente desenhado. O monitoramento em tempo real elimina a necessidade da detecção dos produtos amplificados por eletroforese, com a possibilidade de determinar qual ciclo à amplificação se inicia (GASSER, 2006).

Uma vantagem da PCR de Tempo Real é que ela pode diferenciar as espécies testadas, sem o uso adicional de RFLP ou seqüenciamento (RAMIREZ, et al., 2006), o que diminui o tempo necessário para o processamento das amostras.

A dificuldade no uso da PCR de Tempo Real é que produtos de amplificação inespecífica não são diferenciados dos produtos de amplificação desejados. Este fato torna a seleção cuidadosa de primers. Alternativamente o instrumento pode ser ajustado para monitorar a intensidade da fluorescência em temperaturas elevadas, nestas condições ocorre à desestabilização de produtos de PCR inespecíficos (ZARLENGA; HIGGINS, 2001).

### **2.8.4 Técnica do Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição – RFLP**

É uma técnica baseada em PCR utilizando primers específicos para amplificação de "locis" genéticos diferentes, seguidos por clivagem enzimática para caracterizar e classificar espécies ou "genótipos" de *Cryptosporidium* (FAYER et al., 2000; XIAO et al., 2004a).

Apesar de ser uma técnica relativamente simples, sua aplicação é limitada por não diferenciar subgenótipos contidos em uma mesma espécie ou de genótipos de diferentes regiões geográficas (WIDMER et al., 2002). A RFLP não é capaz de detectar infecções mistas, quando o genótipo minoritário representa menos de 25% do total de oocistos presentes em uma amostra. Foi observado que em infecções mistas experimentais conduzidas utilizando dois genótipos distintos, ocorre primeiro um pico de eliminação de um dos genótipos, seguido pelo pico de eliminação do segundo um destes tende a deslocar o outro, que não pode mais ser detectado, sendo que a infecção acaba sendo relacionada apenas ao genótipo predominante. Este fato ocorre na infecção mista de *C. parvum* e *C. hominis* e naquelas em que são usados subgenótipos distintos de *C. parvum* (WIDMER et al., 2002).

Na Tabela 7 estão alguns tamanhos de fragmentos gerados pelas enzimas *SspI* e *VspI* presentes na literatura (FAYER; XIAO, 2008).

### **2.8.5 Amplificação Randomizada do DNA Polimórfico – RAPD**

A técnica é baseada na amplificação de fragmentos de DNA, usando normalmente primers isolados de seqüências arbitrárias e posteriormente ocorre a separação dos amplicons pela eletroforese em gel de agarose. Apesar de possuir vantagens como facilidade e rapidez de execução, o padrão de bandas do RAPD pode ser influenciado por vários fatores, tais como a qualidade do DNA, a especificidade do primer, co-migração de fragmentos não homólogos e/ou o uso de diferentes termocicladores, resultando numa falha na reprodutibilidade (GASSER, 2006). Poucos são os estudos que utilizam RAPD para investigação de espécies do gênero *Cryptosporidium*, já que a baixa reprodutibilidade da técnica impossibilita a aplicação de RAPD podendo gerar resultados não confiáveis, tendo que aplicar outra técnica para sustentar classificação segura para novas espécies e/ou genótipos (GASSER, 2006).

### **2.8.6 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados – AFLP**

**Tabela 7** Fragmentos gerados pelas enzimas *SspI* e *VspI* de espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium*.

| <i>Cryptosporidium</i> | PRODUTO<br>PCR (*pb) | PRODUTOS<br><i>SspI</i> (pb) | PRODUTOS<br><i>VspI</i> (pb) |
|------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>C.hominis</i>       | 851                  | 450, 267, 11, 12,11          | 561, 115, 104,71             |
| Rabbit genotype        | 849                  | 473, 267, 109                | 559, 115, 104,71             |
| Monkey genotype        | 849                  | 462, 267, 109,11             | 559, 115, 104,71             |
| <i>C.parvum</i>        | 848                  | 450, 267, 108, 12,11         | 629, 115, 104                |
| <i>C.wrairi</i>        | 848                  | 450, 267, 109,11             | 629, 115, 104                |
| Marsupial I            | 851                  | 441, 267, 109,34             | 632, 115, 104                |
| Opossum I              | 848                  | 440, 267, 107,34             | 629, 115, 104                |
| Duck genotype          | 835                  | 432, 267, 102,34             | 616, 115, 104                |
| <i>C.bovis</i>         | 836                  | 432, 107, 103,34             | 617, 115, 104                |
| Deer-like genotype     | 836                  | 432, 107, 103,34             | 617, 115, 104                |
| <i>C.bovis</i> in yak  | 836                  | 413, 267, 103, 34,19         | 629, 115, 104                |
| <i>C.canis</i>         | 843                  | 417, 267, 105, 34,20         | 628, 115, 104                |
| <i>C.varanii</i>       | 847                  | 418, 267, 109, 34,19         | 628, 115, 104                |
| Bear genotype          | 847                  | 418, 267, 106, 34,22         | 628, 115, 104                |
| Skrunk genotype        | 852                  | 418, 267, 110, 34, 12,11     | 460, 173, 115, 104           |
| Horse genotype         | 849                  | 450, 267, 109, 12,11         | 497, 133, 115, 104           |
| <i>C.meleagridis</i>   | 847                  | 450, 267, 108, 11,11         | 457, 171, 115, 104           |
| Mouse genotype         | 852                  | 450, 273, 112, 12,11         | 458, 175, 115, 104           |
| Ferret genotype        | 851                  | 450, 267, 111, 12,11         | 458, 174, 115, 104           |
| <i>C.baileyi</i>       | 840                  | 573, 267                     | 621, 115, 104                |
| Goose I                | 835                  | 534, 267,34                  | 616, 115, 104                |
| Goose II               | 835                  | 534, 267,34                  | 616, 115, 104                |
| Opossum II             | 924                  | 495, 429                     | 668, 115, 104,37             |
| <i>C.muris</i>         | 847                  | 449, 398                     | 732, 115                     |
| <i>C.andersoni</i>     | 846                  | 449, 397                     | 731, 115                     |
| <i>C.serpentis</i>     | 845                  | 414, 383, 34,14              | 730, 115                     |
| Cervine genotype       | 849                  | 454, 384,11                  | 461, 169, 115, 104           |
| <i>C.suis</i>          | 852                  | 454, 378, 11,9               | 633, 115, 104                |
| Muskrat I              | 863                  | 449, 380,34                  | 608, 115, 104,36             |
| Fox genotype           | 846                  | 448, 377,21                  | 627, 115, 104                |
| <i>C.felis</i>         | 878                  | 426, 404, 34,14              | 659, 115, 104                |
| Muskrat II             | 847                  | 417, 375, 34,21              | 592, 115, 104,36             |
| <i>C.galli</i>         | 843                  | 843                          | 728, 115                     |
| Tortoise genotype      | 845                  | 811,34                       | 730, 115                     |
| Snake genotype         | 838                  | 804,34                       | 619, 115, 104                |

\*pb = n ° de pares de bases

Fonte: Modificado de Xiao e Fayer, 2008.

O método original foi desenvolvido por Vos et. al (1995), e é aplicado como uma ferramenta para a ciência forense na análise do grau de parentesco e na investigação genética de propagação de doenças em animais. Fundamenta-se em: (I) digestão do DNA genômico com um conjunto de duas enzimas restrição, (II) ligadura de restrição em sítios específicos adaptados para o 3'- e 5'-final da restrição fragmentos, (III) ampliação da restrição fragmentos usando primers de anelamento para as seqüências dos adaptadores, e (IV) análises eletroforéticas da restrição fragmentos. As principais vantagens de AFLP é que ela pode ser aplicada ao complexo DNA de qualquer origem, a PCR é realizada em alta severidade, e pode atingir elevados níveis de discriminação. Uma limitação é que pode ser relativamente demorado, em comparação com outras abordagens de *fingerprinting*. Às vezes, um elevado nível de variabilidade entre os perfis, com um número limitado de marcadores homólogos, pode tornar-se uma limitação do AFLP. No entanto, esta abordagem tem sido utilizada para diferenciar *C. hominis* e *C. parvum* (BLEARS et al., 2000).

### **2.8.7 Técnicas de identificação de genótipos e subgenótipos - *Fingerprinting***

As técnicas de “Fingerprinting” são utilizadas para a detecção de variação genética. Vários métodos, associados a PCR convencional, possibilitam o Fingerprint genético de uma amostra de parasitos ou indivíduo. Estes métodos se baseiam na busca no genoma por variações na seqüência e/ou organização sendo que os dados gerados para populações podem ser usados para investigar a diversidade e relações genéticas. A vantagem de algumas destas técnicas é que não são necessárias informações prévias de seqüências do genoma do parasito a ser analisado. A desvantagem pode ser que, quando os organismos são analisados como “pool”, o fingerprint genético vai representar a população de organismos e não um indivíduo, assim marcadores individuais podem não representar todos os indivíduos na população (GASSER, 2006).

#### **2.8.7.1 Uso de micro e minisatélites**

Outra técnica é o uso de satélites no DNA para a análise da estrutura genética e a população de parasitos (GASSER, 2006). São considerados satélites seqüências repetitivas no genoma e microsátélites, quando as seqüências repetitivas são extremamente curtas de até três bases, minisátélites e macrosátélites, quando as seqüências repetidas são mais longas (FENG et al., 2000).

Microsátélites e macrosátélites têm sido descritos como abundantes no genoma de todos os Eucariotos. Estas seqüências consistem em repetições que tendem a curtas seqüências que são aleatoriamente dispersas pelo genoma. Geralmente não são transcritas e mantêm polimorfismo devido ao acúmulo de mutações. A variação no número de repetições permite aos alelos presentes num locus serem classificados pelo tamanho, em géis de eletroforese. Os satélites são caracterizados pela hiper-variabilidade alelica. O comprimento da repetição tem sido usado no estudo da estrutura genética de populações bem como na análise de linkage e mapeamento genético (GASSER, 2006).

Regiões não codificantes do genoma são mais sujeitas a mutações que seqüências de regiões codificantes para proteínas, devendo ter preferência sobre estas, por permitirem a identificação de subgenótipos. Em contraste com RAPD e AFLP, os fingerprints de microsátélites não são afetados por DNA exógeno, tornando a técnica mais adequada para a análise de amostras ambientais (FENG et al., 2000).

O princípio da técnica é fundamentado na existência de vários alelos possíveis para determinado microsátélite presente no genoma. Os fragmentos de tamanhos diferentes são gerados quando submetemos a amostra de DNA a uma reação de PCR utilizando-se *primers*

que flanqueiam essas regiões de repetição. O produto dessa reação pode ser analisado por separação eletroforética em gel de poliacrilamida ou seqüenciamento. Essa técnica tem algumas vantagens sobre a de minissatélites estudados com sondas. Estas seqüências consistem em repetições que tendem a curtas seqüências que são aleatoriamente dispersas pelo genoma. Geralmente não são transcritas e mantêm polimorfismo devido ao acúmulo de mutações. A variação no número de repetições permite aos alelos presentes num "locus" serem classificados pelo tamanho, em géis de eletroforese. Os satélites são caracterizados pela hipervariabilidade alélica. Utilizando primers desenhado para únicas seqüências, a PCR pode ser usada para amplificar a região que possam ser analisadas por eletroforese em gel. A análise técnica é relativamente simples e permite uma análise simultânea de grande número de marcadores (JEX et al., 2008).

Mais recentemente a técnica foi utilizada para a identificação de genótipos distintos de *C. parvum* e sua aplicação na definição de subgenótipos específicos isolados de bovinos de várias propriedades. Tanriverdi et al (2006) utilizaram 16 marcadores de mini e microsatélites, sendo que foram encontrados genótipos específicos confinados a certas propriedades. Em contraste ao descrito por Mallon et al (2003b), os autores sugerem que populações genéticas distintas podem emergir dentro de um grupo em relativamente pouco tempo. Isso pode explicar a freqüente detecção de genótipos específicos ao hospedeiro, com status taxonômico desconhecido, como ocorre em águas superficiais e a existência de genótipos geograficamente restritos de *C. hominis* no homem.

O uso de micro e minissatélites evidenciaram que *C. hominis* e *C. parvum* possuem um mesmo ancestral, tendo evoluído em espécies distintas recentemente, sugeriu-se ainda que a evolução diferencial dos micro e minissatélites de diferentes isolados podem estar ligados à adaptação a diferentes hospedeiros (TANRIVERDI ; WIDMER, 2006).

#### **2.8.7.2 Polimorfismo da conformação de fitas únicas – SSCP**

É uma técnica que possibilita a detecção de mutações e apresenta as vantagens de ser prática e com aplicação versátil. O princípio da SSCP é que a mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA de fita simples em um gel de poliacrilamida depende da sua estrutura e tamanho. Moléculas de fita única assumem estruturas com conformações secundárias ou terciárias, quando em soluções, causadas pelo pareamento das bases entre nucleotídeos dentro de cada fita. Estas conformações são altamente dependentes da seqüência primária e do comprimento da molécula, sua localização e número de regiões aonde ocorrem o pareamento das bases. Assim, moléculas que possuem seqüências distintas, devido a uma única base, podem ser separadas num gel de poliacrilamida por causa de suas diferenças na mobilidade distintas das conformações geradas. O método SSCP pode ser usado para evidenciar mutações pontuais de amplicons pequenos (200-300bp), porém a técnica pode ser usada também com amplicons de até 530pb (GASSER, 2006).

### **2.9 Sequenciamento e estudo filogenético**

O seqüenciamento direto do DNA continua a ser o "padrão-ouro" na abordagem de detecção de variabilidade genética ou polimorfismo e ser aplicado a uma única cópia ou a multi-cópias do gene. Além disso, as seqüências de dados do DNA têm a vantagem de estarem aptos para algumas aplicações, tais como estudos filogenéticos que podem ser usados em qualquer fase de investigação genética comparativa. No entanto, o seqüenciamento direto de DNA pode ter algumas limitações, por exemplo, na PCR a partir de pequenas quantidades de DNA genômico, utilizando um número ínfimo de oocistos de *Cryptosporidium*. Nesse

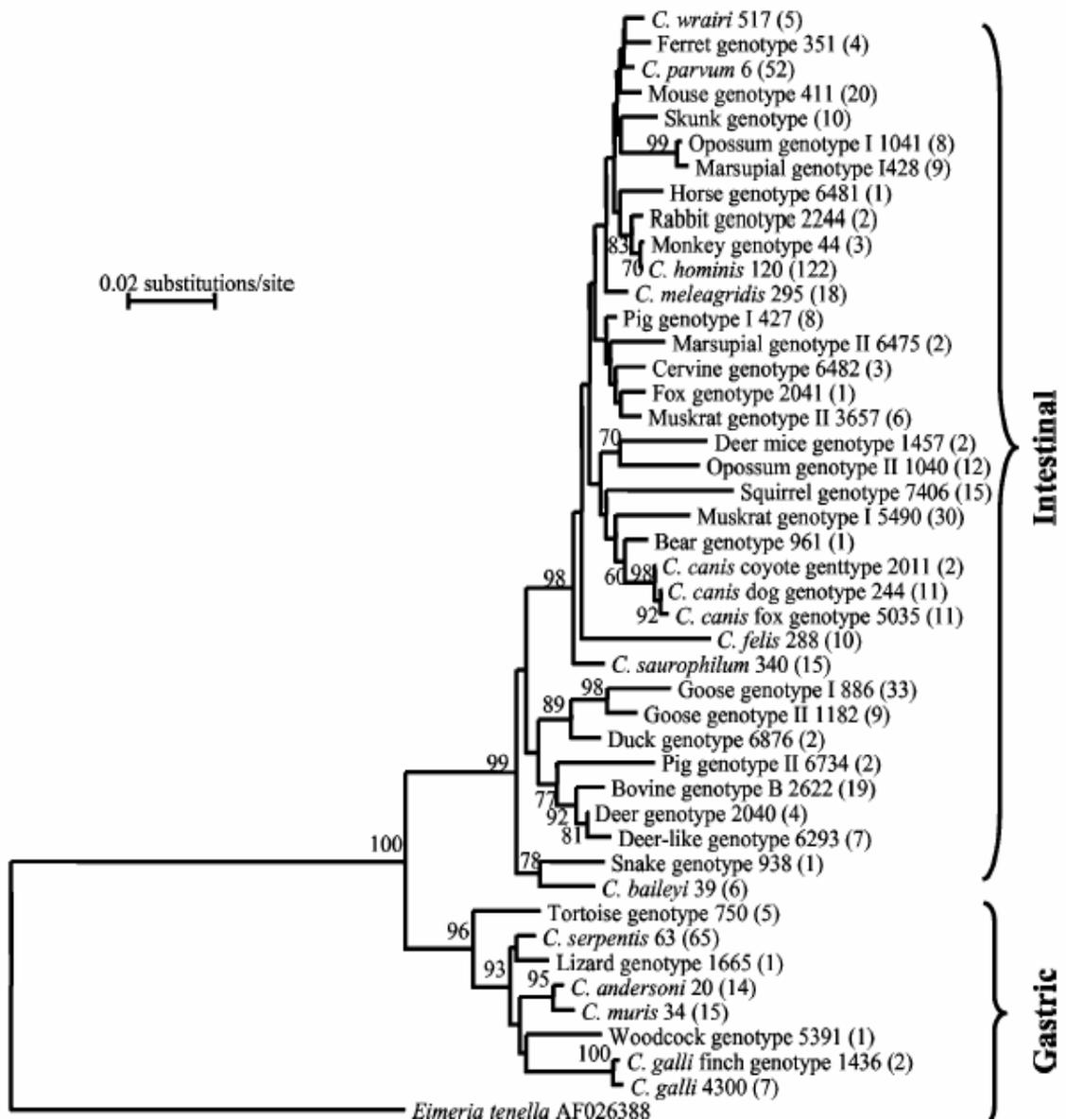
caso, os amplicons quase sempre são produzidos a partir de um isolado, e este é representativo de uma população de oocistos significativa (FAYER; XIAO, 2008).

O gênero *Cryptosporidium* é um Apicomplexa, mas seu exato lugar dentro do Filo é polêmico. Existem várias características que comprovam que espécies do gênero *Cryptosporidium* pertencem ao filo Apicomplexa (1988) e baseado em outras características de desenvolvimento e do ciclo de vida tem sido colocado tradicionalmente dentro da classe dos coccídios. Porém, análises de dados de seqüências são mais complexas e, dependendo da molécula analisada, a colocação filogenética é variável (FAYER; XIAO, 2008).

Existe uma controvérsia da proximidade de *Cryptosporidium* com a subclasse Gregarina (parasitos de invertebrados). Baseada em algumas características morfológicas, biológicas e bioquímicas, tem-se demonstrado que *Cryptosporidium* spp. não é “coccidia” stricto sensu. Utilizando reação sorológica cruzada de *Cryptosporidium* com *Monocystis* sp (Gregarina) e de métodos moleculares alguns autores evidenciaram que *Cryptosporidium* possui um ancestral comum, e consideram que não são coccidia e sim pequenas gregarinas (CARRENO et al., 1999; BARTA; THOMPSON, 2006). A análise filogenética do 18S RNA revelou que *Cryptosporidium* forma um grupo irmão das gregarinas (CARRERO et al., 1999).

Análises filogenéticas de *Cryptosporidium* spp. usando os loci do SSU rRNA, 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 as maiorias das espécies encontradas em mamíferos formam os ramos mais distantes (XIAO et al., 2004a).

Filogeneticamente as espécies e os genótipos formam dois grupos: intestinal e gástrico. Cada um dos grupos contém parasito de mamíferos, aves e répteis. O local de parasitismo em peixes ainda não é claro. Muitos genótipos relatados nos últimos anos foram redescritos como espécie e muitos, com mais dados de suas biologies serão redescritos como espécies (RYAN, 2009). 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 os dois tipos de localização do protozoário (XIAO et al., 2004a) (Figura 1).



**Figura 1** Relação filogenética entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, analisadas pelo Neighbor-Joining de seqüências parciais do SSU rRNA gene. Os valores nos ramos são as percentagens do Bootstrap, usando 1000 replicas. Os números após os nomes das espécies ou genótipos são as identificações dos isolados usados na construção da árvore filogenética. Os números entre parênteses representam a quantidade de isolados seqüenciados (FAYER; XIAO et al. 2008).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Locais de realização da pesquisa

Os procedimentos laboratoriais foram realizados em três etapas. A primeira na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no laboratório de protozoologia do Departamento de Parasitologia Veterinária, foram feitas as análises morfológicas e medidas morfométricas. Na segunda, foram realizados os procedimentos de extração e amplificação de DNA genômico, e a identificação das espécies pela técnica RFLP no laboratório de Biologia Molecular na mesma universidade e no mesmo departamento. A última etapa, o sequenciamento dos isolados de *Cryptosporidium*, com objetivo da confirmação das espécies envolvidas, foram realizados na Plataforma Genômica Sequenciamento de DNA - PDTIS / Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ).

### 3.2 Coletas das amostras fecais e obtenção de oocistos para as análises

#### 3.2.1 Coletas de aves domésticas

Para a obtenção das amostras fecais de aves domésticas foram adquiridos 180 aves, 60 patos (*Anas platyrhynchos domesticus*), 60 pintos (*Gallus gallus domesticus*) e 60 codornas (*Coturnix coturnix japonica*) comercializadas em mercado municipal localizado no município do Rio de Janeiro/RJ. As aves foram adquiridas nos locais de comercialização por apresentarem baixo custo e por serem aves domésticas de fácil manejo. Os patos e pintos eram comercializados com menos de um mês de idade, porém, as codornas, devido a sua alta mortalidade nessa faixa etária (menos de 30 dias), com pelo um mês de idade.

Estes mercados apresentavam estrutura física de alvenaria com paredes fechadas em suas laterais. Mais de 100 lojas, com grande diversidade de produtos para comercialização. Dentre estas variedades, existiam lojas de comercialização de animais vivos, como pintos, codornas, patos, e pequenos mamíferos (coelhos, cobaias e hamsters) (Figura 2 e 3). As lojas onde foram adquiridos os animais para esse estudo, localizavam-se no centro dos mercados. No entorno destas existiam outras destinadas à comercialização de carnes e verduras para consumo, além de restaurantes.

Os animais apresentavam-se expostos para comercialização e ficavam alojadas em gaiolas com telas de arame, dispostas em prateleiras, com fundo removível para a limpeza, apresentando vários indivíduos por gaiola. Várias espécies de animais eram mantidas separadas por gaiolas, mas não havia uma separação distinta destas gaiolas para aves e pequenos mamíferos, e às vezes eram observadas gaiolas de pequenos mamíferos e aves uma ao lado das outras, apresentando certo contato entre os animais. Devido ao empilhamento, muitas vezes observavam-se fezes e alimentos de uma espécie de animal no interior de outras gaiolas. Adicionalmente nesses ambientes de comercialização, não havia uma separação que impedisse o contato direto, dos animais e com as pessoas que comumente transitavam nesses mercados.

A cada ida aos mercados, um lote com 10 aves de cada espécie era encaminhado ao biotério do laboratório de protozoologia, onde só estavam os animais do estudo. Estes foram alojados em gaiolas individuais, com fundo gradeado, recebendo água e ração à vontade. Amostras fecais diárias eram coletadas para verificação da positividade ou negatividade de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes dos animais.



**Figura 2** Imagem geral do mercado (A e B) com a disposição das gaiolas com as diversas espécies de animais comercializados.



**Figura 3** Imagem detalhada das várias espécies de animais dispostos nas gaiolas (A); criança observando os animais (B).

As aves positivas permaneciam no biotério até cessar a eliminação dos oocistos. As negativas eram descartadas do estudo após comprovada negatividade, por três exames negativos consecutivos, sendo posteriormente doadas para criações de subsistência.

As amostras fecais dos animais foram identificadas, e registradas o número da amostra, a data da coleta, idade do animal (quando era possível), a origem da amostra e os resultados do exame parasitológico de fezes.

### **3.2.2 Coletas das aves exóticas**

Para a obtenção das amostras fecais de aves exóticas (Anexo A) foram feitas visitas em criadouros e *pet shops* de algumas regiões do estado do Rio de Janeiro (município do Rio de Janeiro – zona norte e zona oeste, baixada fluminense e municípios do norte do estado – Friburgo e Miracema) (Figuras 4 e 5) e foram coletadas 103 amostras de aves exóticas.

Os animais apresentavam-se expostos para comercialização e ficavam alojados em gaiolas com telas de arame, dispostas lado a lado, com fundo removível para a limpeza, espécies de animais eram mantidas separadas por gaiolas, e apresentavam separação por tela.

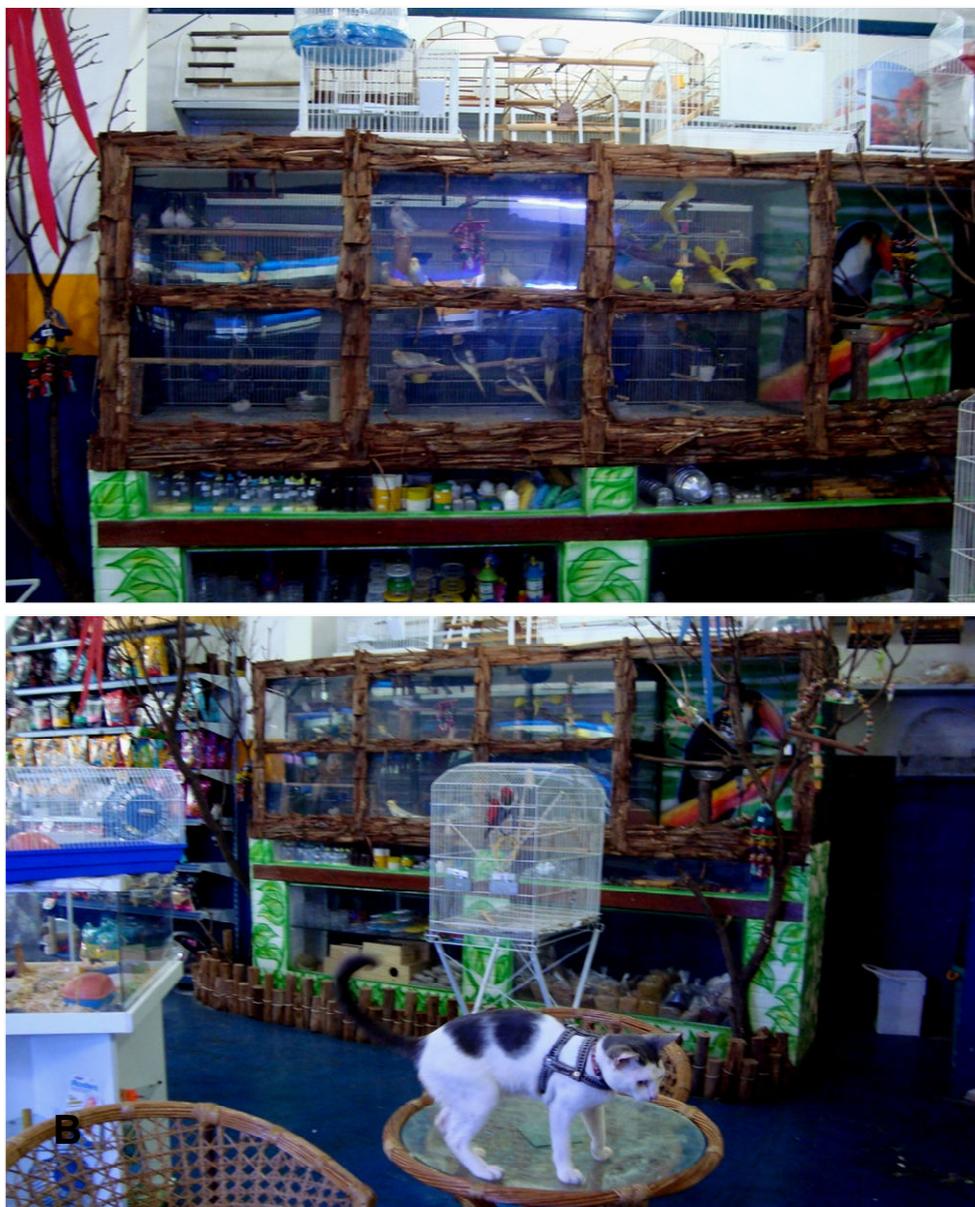
Desses locais de comercialização, as aves não foram adquiridas, já que estas apresentavam alto valor de custo, e, além disso, cada grupo tinha manejo diferenciado de criação, o que dificultaria a manutenção desses animais em um biotério. A organização dos *pet shops* era semelhante. Possuíam estrutura para comercialização de rações a granel ou não, produtos veterinários, produtos para aquarismo, além de apresentarem locais de banho e tosa para cães e gatos. Nesses locais as aves eram dispostas em gaiolas, por espécie, não apresentando barreiras entre elas, sendo a única divisão constituída por arame. A procedência das aves era muito diversificada, algumas eram provenientes de várias regiões do estado do Rio de Janeiro e outras de fora do estado.

Tanto nos pet shops como nos criadouros, como não foi possível a aquisição destas aves, as coletas foram realizadas nos locais. Para isto foi colocado um plástico transparente que cobria o fundo das gaiolas e após 12 horas eram retirados as todas as fezes eliminadas nesse período. A coleta do material fecal foi realizada com o auxílio de uma espátula descartável. As fezes foram transferidas para recipientes estéreis proporção de 1/3 de solução de NaCl a 0,9%, acondicionadas em isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e eram processadas no mesmo dia.

## **3.3 Procedimentos laboratoriais**

### **3.3.1 Processamentos das amostras fecais**

Foi utilizado o protocolo de Huber et al. (2005), no laboratório as amostras fecais foram processadas, inicialmente homogeneizadas com água destilada e, logo após, filtradas em tamis de plástico descartável com gaze para reter ao máximo os resíduos grosseiros. Após a filtragem, cada amostra foi colocada em dois tubos de ensaio com fundo cônico de 15 ml e centrifugada a 402,48g por 10 minutos. Posteriormente, foi desprezado o sobrenadante, e um dos tubos foi guardado sob refrigeração. Ao sedimento do segundo tubo foi adicionada solução saturada de açúcar com densidade específica de 1,30 g/ml. Após homogeneização, o material foi centrifugado a 402,48g por, 10 minutos. Após a centrifugação, o tubo foi completado com a solução saturada de açúcar até a borda formando um pequeno menisco e sobre este foi colocada uma lamínula, ficando em repouso por quatro minutos. Após este tempo, a lamínula foi montada sobre uma lâmina de vidro e examinada no microscópio, com e sem contraste de fase. Nas amostras diagnosticadas positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium*, do sedimento contido no primeiro tubo acondicionado na refrigeração, foi



**Figura 4** Imagem geral de um *pet shop*. Animais dispostos em gaiolas (A e B); um gato criado à solta em uma das lojas de comercialização próximo a gaiolas de aves (B).



**Figura 5** Imagem geral externa de um criadouro de aves exóticas: Vista frontal do galpão com parede e tela, com acesso por porta de madeira e tela (A); Vista posterior com cortina de proteção em material plástico (B); Vista interna do galpão com chão de terra batida, com comedouros e bebedouros pendulares, aves exóticas em poleiros (C, D e E); Aves domésticas criadas soltas na propriedade: patos e galinhas juntos em chão de terra batida (F e H); gansos e patos criados solto no lago (G).

*Cryptosporidium*, do sedimento contido no primeiro tubo acondicionado na refrigeração, foi realizada a extração de DNA e as análises subseqüentes.

### 3.3.2 Extração de DNA em amostras fecais

Para a extração de DNA foram usados os protocolos preconizados por Huber et al. (2007). Para o procedimento, foram usados 200 µl de suspensão de fezes semipurificados pela técnica de sedimentação acondicionado em um microtubo de 1,5 ml, onde foram adicionados 500µl de DNAzol (Invitrogen ®), 0,5% (concentração final) de solução de polivinilpirrolidona (PVP-Sigma®) e aproximadamente 0,2g de pérolas de vidro com 425-600µm de diâmetro (Sigma®). Os microtubos foram agitados três vezes em vórtex e incubados a 96° C por 60 minutos. Posteriormente, foram centrifugados por 20 min e o sobrenadante aspirado e depositado em outro microtubo, precipitado com 1000µl de etanol absoluto e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com 500µl etanol 95% por duas vezes por 5 min. O sobrenadante da última lavagem foi desprezado e o pellet foi resuspenso com 500µl de DNAzol, centrifugado e o sobrenadante transferido para novo tubo. O DNA foi precipitado com etanol absoluto e a lavagem foi repetida, sendo o sedimento resultante resuspenso em 100 µl de tampão Tris-EDTA (TE). Os microtubos contendo o DNA foram mantidos a – 20° C até serem utilizados.

### 3.3.3 Realização do PCR primário e Nested-PCR

O gene alvo para amplificação foi RNA da subunidade menor ribossomal (18S RNA). A Tabela 8 apresenta os primers utilizados.

**Tabela 8** Primers utilizados na amplificação do gene 18 SrRNA.

| GENE ALVO | TÉCNICA | SEQÜÊNCIAS DO PRIMER                      |
|-----------|---------|---|
| 18 SrRNA  | PCR     | 18 SF: 5'- TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'`       |
|           |         | 18 SR: 5'- CCCATTTCC TTCGAAACAGGA-3'      |
|           | Nested  | 18 SNF: 5'- GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' |
|           |         | 18 SNR 5'- AAGG AGTAAGGAACAACCTCCA-3'     |

Na PCR primária (tamanho esperado do amplicon: 1.325pb) foram utilizados os primers: 18 SF: 5'- TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'` (Forward) e 18 SR: 5'- CCCATTTCC TTCGAAACAGGA-3' (Reverse). Para o nested PCR (tamanho esperado do amplicon: 819 a 865pb, dependendo da espécie) foram utilizados os primers 18 SNF: 5'- GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' (Forward) e 18 SNR 5'- AAGG AGTAAGGAACAACCTCCA-3' (Reverse). Como controle positivo para *Cryptosporidium* foi utilizado uma amostra de bezerro na amplificação da PCR primária e para nested-PCR.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se um volume final de 50µl, onde se usou na reação primária 6mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2µM de cada primer (18 SF e 18SR), tampão da Taq 1x, 200 µM de cada desoxirribonucleotideo, 2,5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 2 µl de DNA da amostra e água milliQ até completar o volume de

50 µl. As condições para a realização do Nested PCR foram idênticas às do primário, exceto pelo uso do outro par de primers e de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

As concentrações de MgCl<sub>2</sub> foram determinadas através de teste prévio das seguintes concentrações: 6mM, 4mM, 3mM e 2mM, encontrando-se os valores ideais de 6mM na PCR primária e 3mM na PCR secundária, quando utilizada a Taq DNA Polimerase (Invitrogen®).

Os ciclos, para ambos os procedimentos foram: 30 ciclos de 94° C/1 min, 65° C/1min, 72° C/1 min. Ao final do programa foi realizada uma etapa adicional de extensão de 72° C/ 10 min.

Para o controle negativo foi utilizada a mesma reação para PCR primária e Nested, porém ao invés de adicionar a quantidade de D9NA foi utilizada água ultra- pura.

### **3.3.4 Digestão dos produtos do nested PCR com enzimas de restrição**

Para a identificação das espécies de *Cryptosporidium* foi realizada a digestão dos produtos do Nested-PCR com a enzima *SspI*, isolado de *Sphaerotilus species* ATCC 13925 (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Para diagnóstico preciso, foi realizado também a digestão com a enzima *VspI*, isolado de *Vibrio species* (Fermentas), também seguindo as recomendações do fabricante.

Após a realização da digestão foi feito uma eletroforese em gel de agarose a 3%, usando o marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen). A imagem do gel foi visualizada através do sistema de captura de imagem (Bio-Rad) e fotografada o seu produto. Para a análise, utilizou-se o programa para calcular os pares de bases Quantity one (Bio-Rad).

## **3.4 Sequenciamento e análises filogenéticas**

### **3.4.1 Purificação dos produtos da Nested-PCR**

Para o sequenciamento foram utilizados os produtos positivos da nested PCR. Estes foram submetidos à purificação utilizando-se o Kit GFX da GE Healthcare ®. Após a purificação estes foram quantificados e encaminhados à plataforma de sequenciamento de DNA.

### **3.4.2 Sequenciamento**

As seqüências foram determinadas em um sequenciador de DNA automático (3730 DNA Analyzer, Applied-Biosystems) (OTTO et al., 2008). Após o procedimento foram alinhadas utilizando-se CLUSTAL W (HIGGINS et al., 1994) e ajustes manuais. Foram analisadas com o software MEGA 4.1 (TAMURA et al., 2007) e BioEdit (HALL, 1999)(submetidas a uma busca no BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) para determinar suas identidades e encontrar homologias e similaridades com as seqüências depositadas de cada grupo de *Cryptosporidium* no GenBank.

### **3.4.3 Análises Filogenéticas**

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o software MEGA versão 4.1. Como teste filogenético foi realizado bootstrap com 1000 réplicas, das quais foram construídas as árvores consenso pelo método Neighbor joining, utilizando-se o logaritmo Parâmetro Kimura 2. Também foi realizada a análise filogenética pelo método da Maximum parcimony, com 1000 bootstrap. As seqüências do presente trabalho foram depositadas no

Genbank, utilizando-se o programa computacional SeqIn, disponibilizado pelo banco de dados. As análises filogenéticas comparativas entre as seqüências consenso obtidas no presente estudam para aves domésticas foram feitas comparando as seguintes seqüências depositadas no Genbank: *C.meleagris*: EU827312; *C.parvum*: GQ259149, AB441687, EU553557; *C.suis*: AF115377; *C.canis*: EU754833; *C.felis*: AF108862; *C.saurophilum*: EU553556; *C.bovis*: AY120911; *C.ryanae*: FJ463193; Genotipo Aviario I: GQ227479; Genotipo Aviario II: DQ002931; Genotipo Aviario III: DQ650341; *C.baileyi*: GQ227476, AF093495; *C.serpentis*: AF093502; *C.galli*: AY168848; *C. muris*: AF093498 *C. andersoni*: AB089285; *E.tenella*: AF026388, e para aves exóticas foram utilizadas: *C.meleagris*: EU827312, EU717830, EU814439; *C.baileyi*: AF093495; EU814431; DQ898161; *C.galli*: AY168848; AY168846; EU543269; Genotipo Aviario I: DQ650339; Genotipo Aviario II: DQ650340; Genótipo Aviário III: DQ650342; Genótipo Aviário IV: DQ650344; AY324641, *C.parvum*: EU553557; AB441687; AF16102; DQ067566; DQ656354; AF093489.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Aves domésticas

#### 4.1.1 Prevalência de *Cryptosporidium* em aves domésticas

A presença de *Cryptosporidium* foi confirmada nas três espécies estudadas (Figura 6). A capacidade da infecção por espécies de *Cryptosporidium* em aves foi relatada anteriormente em perus, faisões, pavão, gansos, papagaios e pombos (LINDSAY; BLAGBURN, 1990). Nas espécies de aves domésticas utilizadas no estudo, já foi relatada a infecção em patos (GRACZYK et al., 1996; KUHN et al., 2002, HUBER et al., 2007), pintos (LINDSAY et al., 1990; HUBER et al. 2007) e codornas (HOER et al., 1986; GUY et al., 1987; MORGAN et al., 2001; HUBER et al., 2007).

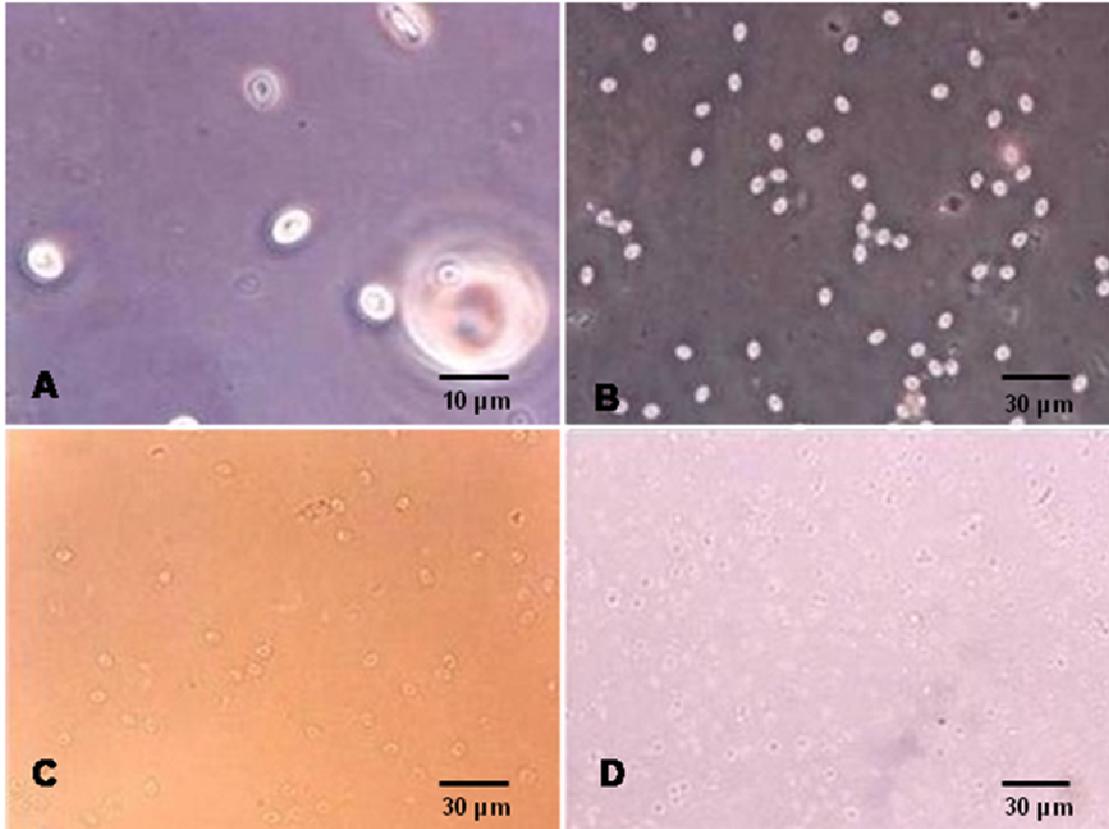
Nesse estudo foram observadas elevadas taxas de ocorrência da infecção por *Cryptosporidium*. Do total de 180 aves domésticas analisadas para presença de *Cryptosporidium*, 86,7 % dos pintos, 76,7% dos patos e 55 % das codornas apresentavam-se positivas.

Em patos, altas taxas já foram relatadas na literatura por Graczyk et al. (1996). Estes observaram 100% dos animais eliminando oocistos de *Cryptosporidium*, demonstrando a alta susceptibilidade do hospedeiro para a infecção. Richter et al. (1994) identificaram a positividade para a infecção em 73 patos de 128 estudados. Morgan et al. (2001) estudaram a susceptibilidade de codornas e pintos na infecção pelo protozoário, e concluíram que essas aves eram susceptíveis a *Cryptosporidium* e pintos apresentavam mais indivíduos eliminando oocistos do que as codornas.

Além da menor susceptibilidade a infecção, o menor percentual encontrado nas codornas poderia estar relacionada à idade das aves comercializadas. As codornas são animais que apresentam alta mortalidade até um mês de vida, e por isso, nos mercados visitados, os comerciantes só aceitavam revender estas aves com idade superior a 30 dias. Assim, pode-se sugerir que o menor percentual encontrado em codornas estaria relacionado a idade dos animais, já que o mais provável é que o sistema imunológico mais desenvolvido confere a essas aves uma resistência à infecção quando comparado a pintos e patos, que eram comercializados com até uma semana de idade.

Estes dados são confirmados por alguns estudos que concluem que a infecção parasitária alta é influenciada pela idade das aves, que em aves mais jovens o sistema imunológico poderia apresentar menor eficiência no combate à infecção (HOER et al., 1986; ANTUNES et al., 2008). Este fato também foi observado no presente estudo já que as aves após três meses de idade começavam a apresentar diminuição das taxas de eliminação de oocisto levando ao cessar da infecção.

Um outro fator associado às altas taxas pode estar relacionado ao manejo destas aves. Ng et al. (2006) verificaram que de 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. Porém, no presente estudo as condições sanitárias observadas foram de baixa higiene nos estabelecimentos de comercialização, não havendo limpeza periódica das gaiolas, a água e ração encontravam contaminadas com fezes, um número elevado de animais por gaiolas que eram mantidos juntos com muitas outras espécies de aves e mamíferos, e ainda a presença de animais mortos. Essas observações denotam a insalubridade nesses locais e o risco de contaminação ambiental e conseqüentemente a possibilidade de infectar hospedeiros de uma mesma espécie e de espécies diferentes.



**Figura 6** Oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de amostras fecais de aves domésticas de mercados municipais do Rio de Janeiro, utilizando a técnica de diagnóstico de centrífugo flutuação em solução saturada de açúcar. Oocistos de codornas em contraste de fase – A; oocistos de patos em contraste de fase - B; oocistos de pintos C e D.

#### 4.1.2 Morfometria dos oocistos das aves domésticas

Os dados de biometria dos oocistos encontrados no presente trabalho para patos, pintos e codornas (Tabela 9) foram semelhantes aos limites descritos para as espécies do gênero (XIAO; FAYER, 2008). Apesar das análises morfométricas terem sido suficientes para identificar a presença do gênero, não foram capazes de identificar as espécies envolvidas, já que existem similaridade de morfometria intra-espécies e inter-espécies (genótipos) (EYGED et al., 2003; XIAO et al., 2004b).

**Tabela 9** Dados morfométricos (médias e desvio-padrão) dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de patos, codornas e pintos de mercados municipais do Rio de Janeiro.

| HOSPEDEIRO                | DIÂMETRO<br>MAIOR ( $\mu\text{m}^*$ ) | DIÂMETRO<br>MENOR ( $\mu\text{m}$ ) | ÍNDICE<br>MORFOMÉTRICO |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| <b>PATO</b><br>*n = 100   | 6,0 $\pm$ 0,5                         | 4,5 $\pm$ 0,4                       | 1.3 $\pm$ 0.1          |
| <b>CODORNA</b><br>n = 100 | 6,1 $\pm$ 0,6                         | 4,8 $\pm$ 0,6                       | 1.3 $\pm$ 0.2          |
| <b>PINTO</b><br>n=100     | 5,8 $\pm$ 0,7                         | 4,6 $\pm$ 0,4                       | 1.3 $\pm$ 0.2          |

\*n = número de oocistos medidos

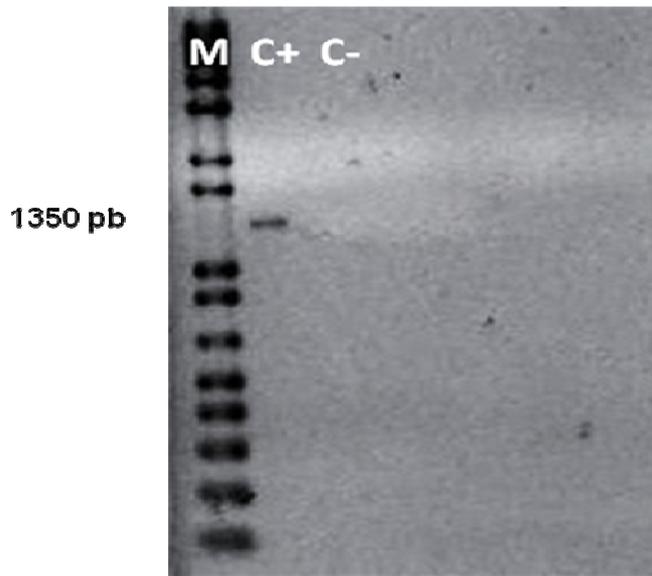
\* $\mu\text{m}$  = micrômetros

#### 4.1.3 PCR primária das aves domésticas

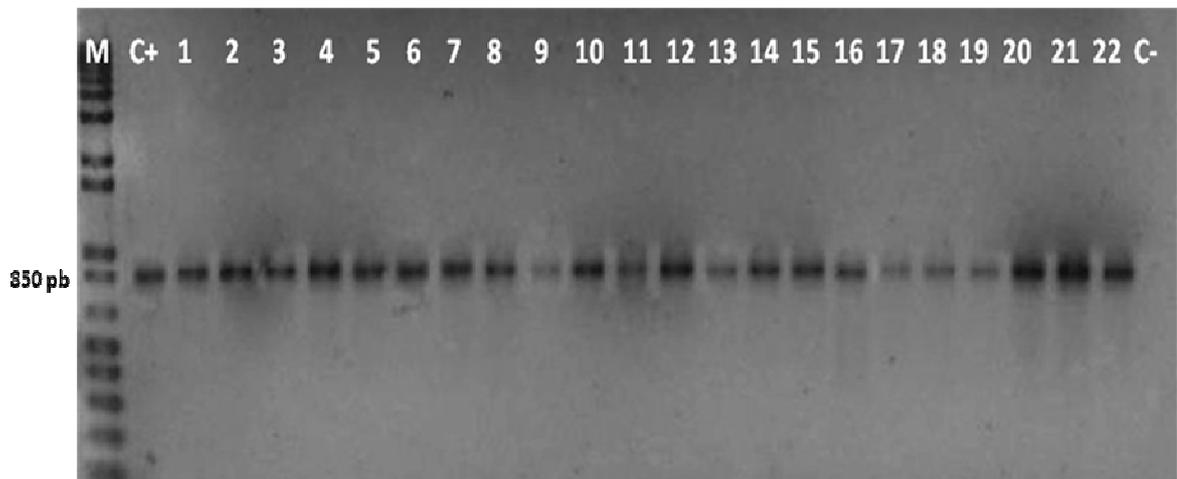
Em nenhuma das reações de PCR primária de DNA obtido de amostras de aves domésticas foram observados resultados visualizáveis em géis de agarose. Entretanto, confirmando que houve reação primária, o controle positivo foi visualizado em bandas aproximadas de 1350 pb (Figura 7). Este resultado confirma que houve amplificação primária do gene alvo para *Cryptosporidium* (XIAO et al., 2000), pelo menos nas amostras de bezerras. O resultado não observável, para amostras de aves, deve-se pelo fato de que a detecção do DNA, para o gênero *Cryptosporidium*, 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.

#### 4.1.4 Nested-PCR de aves domésticas

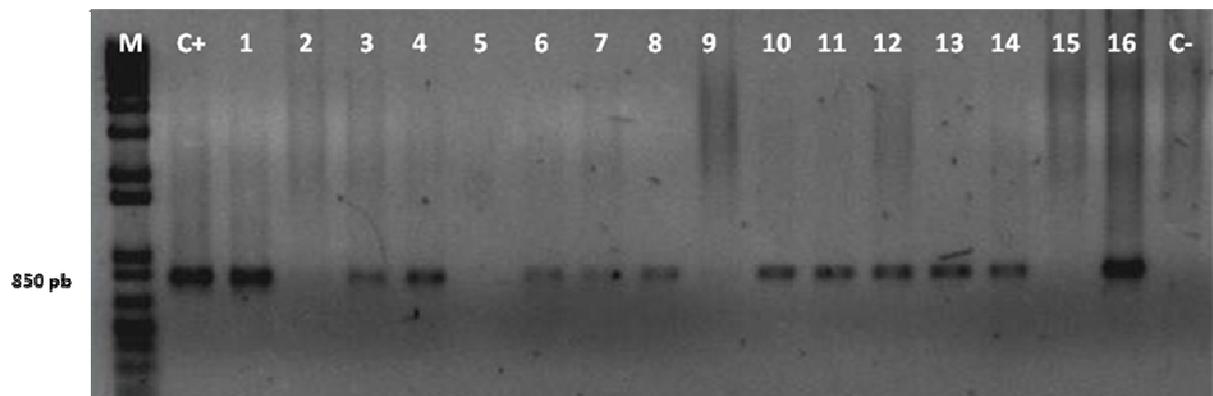
Nas reações de Nested-PCR foram observados amplicons variando de tamanho de 850-861 pb para pintos, 850-863 pb para codornas e 850-871 pb para patos (Figura 8, 9 e 10). Isto confirma que a região do gene alvo foi amplificada para *Cryptosporidium* sp. (XIAO et al., 2000). Estes dados comprovam que a PCR secundária é necessária para aumentar a sensibilidade, já que a segunda amplificação aumenta a quantidade de DNA em pelo menos o dobro e, por utilizar um par de primer espécie-específico aumenta a sensibilidade da técnica PCR (MORGAN; THOMPSON, 1998).



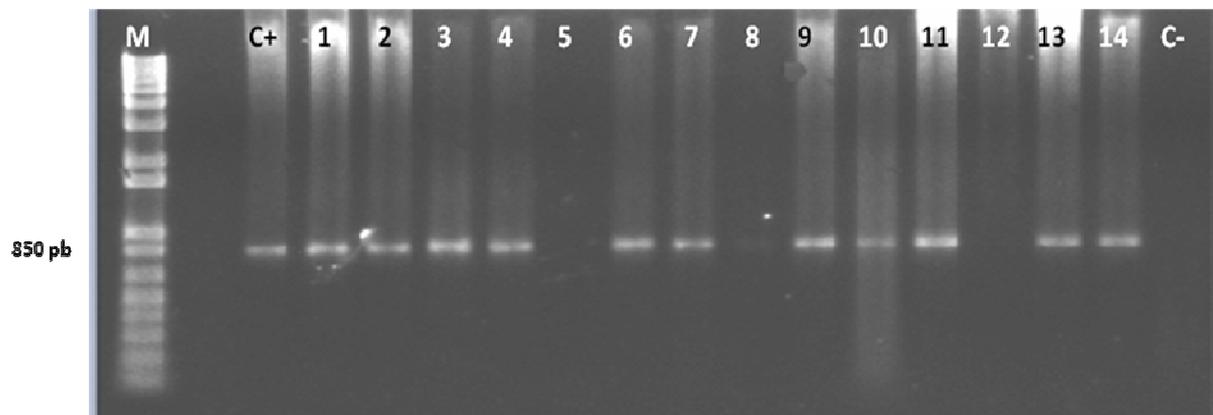
**Figura 7** Amplificação pela PCR primária do gene 18S rDNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. Marcador de tamanho (pares de bases); amostra positiva para *Cryptosporidium* sp. provenientes de bezerros, C+: controle positivo, C-: controle negativo.



**Figura 8** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. 1-22: amostras de *Cryptosporidium* sp. provenientes de pintos. M: marcador de tamanho (pares de bases), C<sup>++</sup>: controle positivo bovino e C<sup>-</sup>: controle negativo.



**Figura 9** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. 1-16: amostras de *Cryptosporidium* sp. provenientes de codornas. M: marcador de tamanho (pares de bases), C<sup>+</sup>: controle positivo bovino e C<sup>-</sup>: controle negativo.

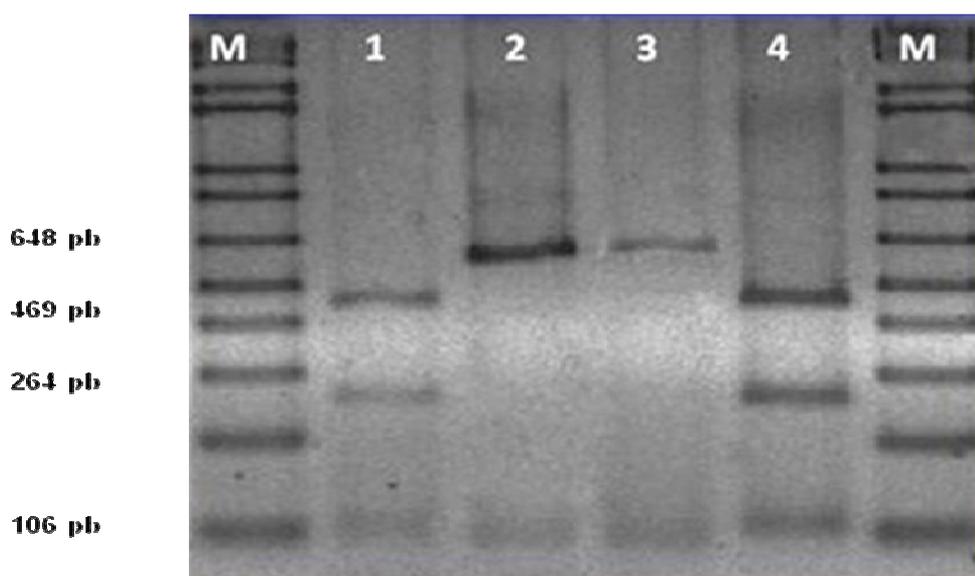


**Figura 10** Amplificação pela nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. 1-14: *Cryptosporidium* sp. provenientes de patos. M: marcador de tamanho (pares de bases), C<sup>+</sup>: controle positivo bovino e C<sup>-</sup>: controle negativo.

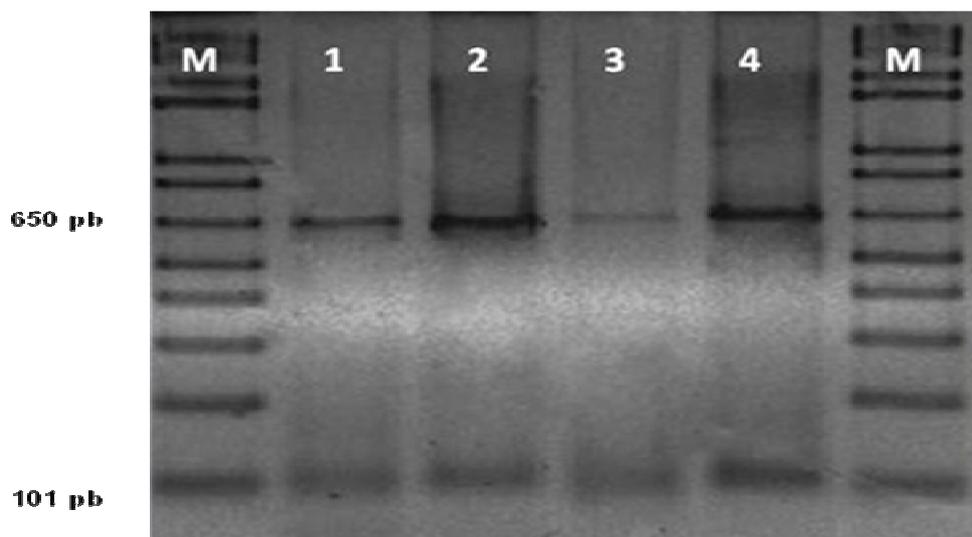
#### 4.1.5 RFLP-PCR de aves domésticas

Nas amostras de patos, dois padrões de corte diferentes foram apresentados. Os resultados da *SspI* e *VspI* podem ser visualizados na Figura 11 e 12. Os cortes aproximados foram para *SspI* e *VspI*, respectivamente, Pato 1: 469, 264, 106 pb e 650 e 100 pb; Pato 2: 605, 102 pb e 650 e 101 pb; Pato 3: 612 e 100 pb e 675 e 103 pb; Pato 4: 465, 264, 106 pb, 684 e 105 pb. Os padrões de corte para codornas e pintos foram semelhantes. Para pintos na *SspI*: 465 pb, 265 pb, 100 pb (Figura 13) e para *VspI*: 651 pb, 100 pb (Figura 14). As amostras de codornas apresentaram bandas aproximadas de 465 pb, 268 pb e 102 pb para a enzima *SspI* (Figura 15) e 655 pb, 101 pb para enzima *VspI* (Figura 16).

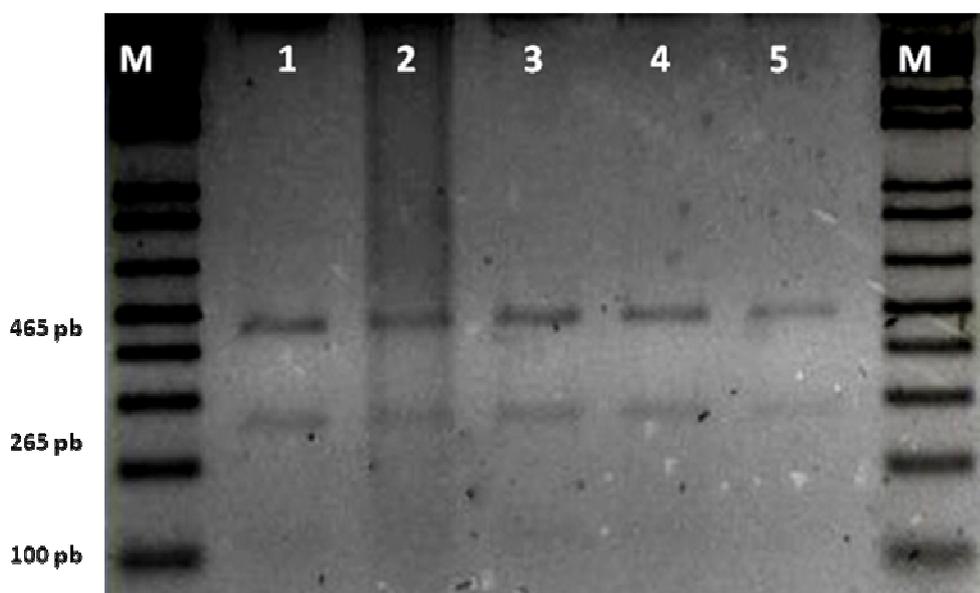
Somente os padrões de corte apresentados na RFLP não foram capazes de determinar com certeza as espécies envolvidas, já que as similaridades entre os padrões de corte das espécies do gênero não possibilitaram a identificação quando utilizada esta técnica isoladamente, já que as similaridades entre os padrões de corte das espécies do gênero não favorecem para identificação da espécie, podendo gerar confusão ou diagnóstico incorreto das espécies envolvidas. Porém o padrão de corte do Pato 2 é compatível com *C.baileyi*, que é a única espécie até o momento na literatura que apresenta um padrão de corte bem característico.



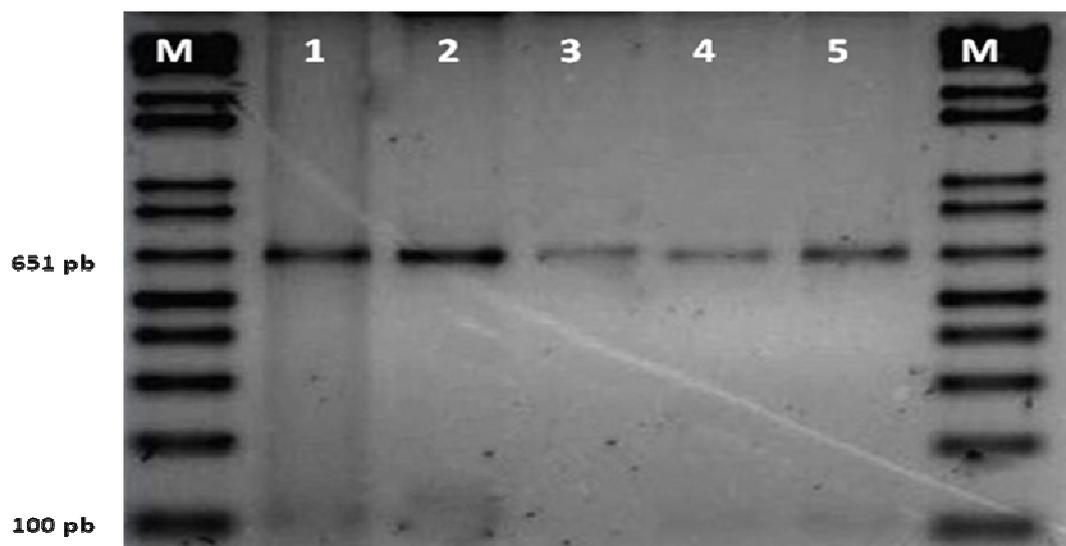
**Figura 11** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de patos. Colunas 1 a 4: produto da digestão *SspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pares de bases).



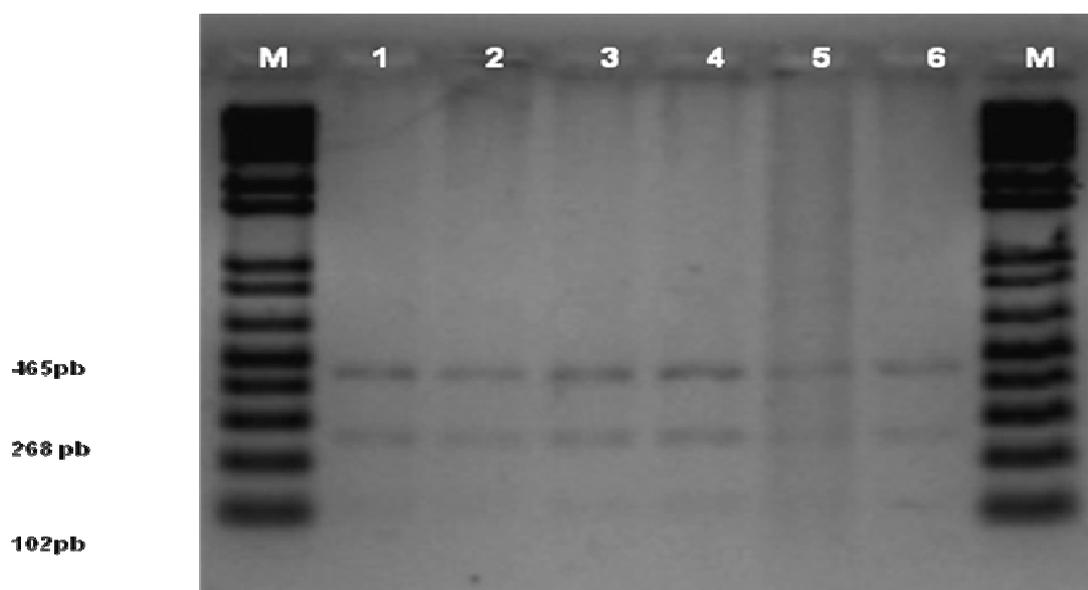
**Figura 12** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de patos. Colunas 1 a 4: produto da digestão *VspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pares de bases).



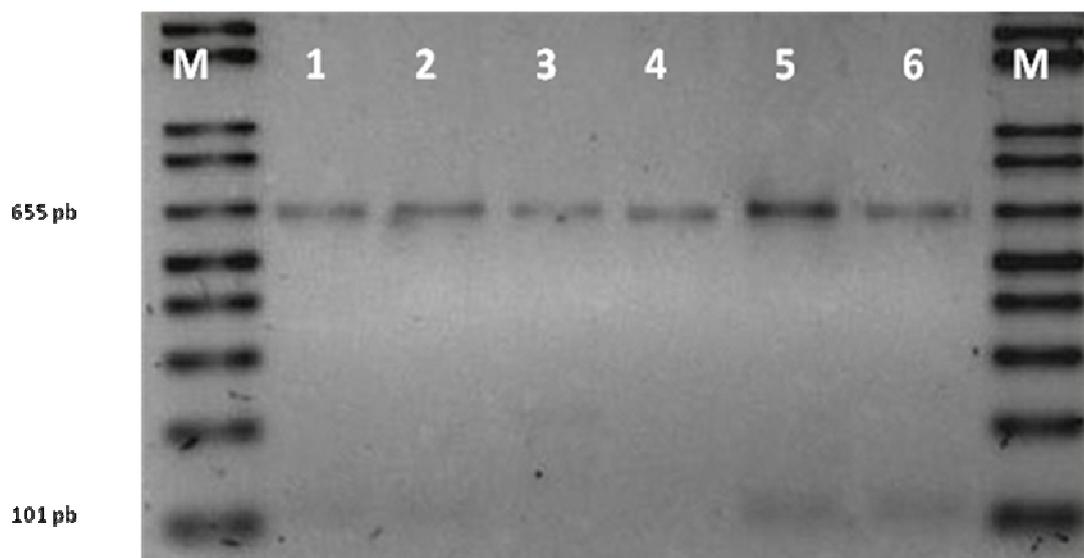
**Figura 13** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de pintos. Colunas 1 a 5: produto da digestão *SspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pares de bases).



**Figura 14** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de pintos. Colunas 1 a 5: produto da digestão *VspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pb)



**Figura 15** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de codornas. Colunas 1 a 6: produto da digestão *SspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pb)



**Figura 16** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de codornas. Colunas 1 a 6: produto da digestão *VspI* Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de tamanho (pb).

#### 4.1.6 Seqüenciamento das aves domésticas

As seqüências resultantes foram alinhadas (Quadro 1) e depositadas no GenBank, recebendo os números: GU082384-GU082392. As espécies identificadas foram: *C. parvum* e *C. baileyi* (Tabela 10 e 11).

A seqüência do isolados de *Cryptosporidium* da amostra de Codorna 1, com 600 pb, apresentou 99% de similaridade com *C. parvum* proveniente de um lagarto de estimação (PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009), e a da Codorna 2, com 543 pb, apresentou 98% de similaridade com uma seqüência de *C. parvum* proveniente de bovinos (ATHARI et al., 2009) e com uma seqüência de isolados de humanos (ABREU et al. 2007).

A seqüência do Pato 1, com 679 pb, apresentou 98% de similaridade com a seqüência de isolados de *Cryptosporidium* de bovinos (ATHARI et al., 2009) e de humanos (ABREU et al., 2007), e a seqüência do Pato 2, com 532 pb, apresentou 99% de similaridade com a seqüência de *C. baileyi*, obtida de pintos (NAKAMURA et al., 2009).

As seqüências isoladas do Pinto 1 e Pinto 2, ambas com 613 pb, apresentaram similaridades 100 e 99 %, respectivamente, com a seqüência de humanos (ABREU et al., 2009).

#### 4.1.7 Filogenia das aves domésticas

Os estudos de filogenia confirmaram a presença de *C. parvum* e *C. baileyi*. A análise das distâncias genéticas das seqüências apresentou a confirmação das espécies de *C. parvum* em todos os isolados das aves estudadas, com exceção ao de um pato que foi mais próximo geneticamente de *C. baileyi*.

Observou-se que em relação às distâncias genéticas calculadas os resultados entre as seqüências do Genbank e *C. parvum* foram os que apresentaram maior variação.

**Quadro 1** Alinhamento das sequências de *C. parvum* e *C. baileyi* (isolados de domésticas) e *C. parvum* e *C. baileyi* do GenBank. Lacunas são marcadas por (-) e nucleotídeos idênticos por (.).

|                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |       |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|
| #CODORNA_1           | TAG | GGT | TCG | ATT | CCG | GAG | AGG | GAG | CCT | GAG | AAA | CGG | CTA  | CC-  | ACA | -TC  | TAA | GGA | AGG | CAG | CAG | GCG | CGC | AAA | TTA | CCC | [ 78] |       |
| #CODORNA_2           | ... | ... | ... | ..C | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | G..  | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #PATO_1              | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | -    | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #PATO_2              | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..G | ... | ... | ... | ... | ...  | ..C  | ... | -    | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #PINTO_1             | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | -    | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #PINTO_2             | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | -    | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #C._parvum_EU553557  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | -    | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #C._parvum_AB441687  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | -    | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #C._parvum_DQ523507  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | -    | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #C._baileyi_GQ227476 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | -    | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #C._baileyi_DQ898161 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | -    | ... | ... | AGG | CAG | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #CODORNA_1           | AAT | CCT | AAT | A-C | AGG | GAG | GTA | GTG | ACA | AGA | AAT | AAC | AAT  | ACA  | GGA | CTT  | TTT | -GG | TTT | TGT | AAT | TGG | AAT | GAG | TTA | AGT | [156] |       |
| #CODORNA_2           | ... | ... | ... | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ...  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #PATO_1              | ... | ... | G.C | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..G  | .C  | AAC  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #PATO_2              | ... | ... | ... | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ...  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #PINTO_1             | ... | ... | ... | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ...  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #PINTO_2             | ... | ... | ... | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..C  | ... | ...  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #C._parvum_EU553557  | ... | ... | ... | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ...  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #C._parvum_AB441687  | ... | ... | ... | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ...  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #C._parvum_DQ523507  | ... | ... | ... | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ...  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #C._baileyi_GQ227476 | ... | ... | G.C | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..G  | .C  | AAC  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #C._baileyi_DQ898161 | ... | ... | G.C | ..- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..G  | .C  | AAC  | ... | ... | -   | TTT | TGT | ... | ... | ... | ... | ... | [156] |       |
| #CODORNA_1           | ATA | AAC | CCC | TTT | ACA | AGT | ATC | AAT | TGG | AGG | GCA | AGT | CTG  | G-T  | GCC | AGC  | AGC | CGC | GGT | AAT | TCC | AGC | TCC | AAT | AGC | GTA | [234] |       |
| #CODORNA_2           | ... | ... | ... | ... | ..C | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..GT | ..GG | ... | ...  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #PATO_1              | ... | ... | ... | ... | ... | ..G | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | ...  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #PATO_2              | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | T.. | T.. | ..C  | .C   | C.. | CA.  | .AA | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..A | A.. | [234] |       |
| #PINTO_1             | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | ...  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #PINTO_2             | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | ...  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #C._parvum_EU553557  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | ...  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #C._parvum_AB441687  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | ...  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #C._parvum_DQ523507  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | ...  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #C._baileyi_GQ227476 | ... | ... | ... | ... | ... | ..G | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | ...  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #C._baileyi_DQ898161 | ... | ... | ... | ... | ... | ..G | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ..-  | ... | ...  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #CODORNA_1           | TAT | TAA | AGT | TGT | TGC | AGT | TAA | AAA | GCT | CGT | AGT | TGG | ATT  | TCT  | GTT | A--  | ATA | ATT | TAT | ATA | AAA | TAT | TTT | GA- | --- | -AT | [312] |       |
| #CODORNA_2           | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ..-- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..T | --G | A.. | [312] |       |
| #PATO_1              | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ..-- | ... | ... | ..C | ... | ... | ..C | ..C | CAC | .G- | --- | --.   | [312] |
| #PATO_2              | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ..-- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..T | --G | A.. | [312] |       |
| #PINTO_1             | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ..-- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..T | --G | A.. | [312] |       |
| #PINTO_2             | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ..-- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..T | --G | A.. | [312] |       |
| #C._parvum_EU553557  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ..-- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..- | --- | -.  | [312] |       |
| #C._parvum_AB441687  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ..-- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..T | --G | A.. | [312] |       |
| #C._parvum_DQ523507  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ..-- | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..T | --G | A.. | [312] |       |
| #C._baileyi_GQ227476 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...  | ...  | ... | ..-- | ... | ... | ..C | ... | ... | ..C | ..C | CAC | .G- | --- | --.   | [312] |

```

#C._baileyi_DQ898161 ... .. .C. ... .. C.. ..C CAC .G- --- --. [312]

#CODORNA_1      ATT --T ATA TAA CAT TAA CAT AAT TC- -AT ATT --- --- -AC TAT AT- --T TTT -T- --A GTA TAT GAA ATT TTA CTT [390]
#CODORNA_2      ... --. ... .. T.. ... .. .-.. T.. --- --- -.. .. -.. --A ... -.. --. AA. .T. ... .. .C. ... .. [390]
#PATO_1         ... --. ... .. T.. ... .. .-.. C.. --- --- -.. .. -.. --A .A. -.T AA. ... .G. ... .C. ... .. [390]
#PATO_2         ... --. ... .. T.. ... .. .-.. .. --- --- -.. .. -.. --A ... -.. --. ... .. .C. ... .. [390]
#PINTO_1       ... --. ... .. T.. ... .. .-.. .. --- --- -.. .. -.. --A ... -.. --. ... .. .C. ... .. [390]
#PINTO_2       ... --. ... .. T.. ... .. .-.. .. --- --- -.. .. -.. --A ... -.. --. ... .. .C. ... .. [390]
#C._parvum_EU553557 ... --. ... .. T.. ... .. .-.. .. --- --- -.. .. -.. --A ... -.. --. ... .. .C. ... .. [390]
#C._parvum_AB441687 ... --. ... .. T.. ... .. .-.. .. --- --- -.. .. -.. --A ... -.. --. ... .. .C. ... .. [390]
#C._parvum_DQ523507 ... --. ... .. T.. ... .. .-.. .. --- --- -.. .. -.. --A ... -.. --. ... .. .C. ... .. [390]
#C._baileyi_GQ227476 ... --. ... .. .-.. .. .-.. C.. --- --- -.. .. -.. --A .A. -.T AA. ... .G. ... .C. ... .. [390]
#C._baileyi_DQ898161 ... --. ... .. .-.. .. .-.. C.. --- --- -.. .. -.. --A .A. -.T AA. ... .G. ... .C. ... .. [390]

#CODORNA_1      TGA GAA AAT TAG AGT GCT TAA AGC AGG CAA AT- GCC TTG AAT ACT CCA GCA TGG AAT AAT A-T TAA AGA TTT TTA TCT [468]
#CODORNA_2      ... A.. ... ..A ..G ... .. .TT ..- ... .. .-.. ... .A. ... .. [468]
#PATO_1         ... .. .T. T.- ... .. .-.. ... .. [468]
#PATO_2         ... .. .T ..- ... .. .-.. ... .. [468]
#PINTO_1       ... .. .T ..- ... .. .-.. ... .. [468]
#PINTO_2       ... .. .T ..- ... .. .-.. ... .. [468]
#C._parvum_EU553557 ... .. .T ..- ... .. .-.. ... .. [468]
#C._parvum_AB441687 ... .. .T ..- ... .. .-.. ... .. [468]
#C._parvum_DQ523507 ... .. .T ..- ... .. .-.. ... .. [468]
#C._baileyi_GQ227476 ... .. .T. T.- ... .. .-.. ... .. [468]
#C._baileyi_DQ898161 ... .. .T. T.- ... .. .-.. ... .. [468]

#CODORNA_1      TT- -CT TAT TGG TT- CTA AGA TAA GAA TAA TGA TTA ATA GGG ACA GTT GGG GGC ATT TGT ATT TAA CAG TCA GAG GTG [546]
#CODORNA_2      ..- .. .T. ... .. .A. ... A.T ... .. .A. ... ..G ... .. A.. ... [546]
#PATO_1         ..- .. .T. ... .. G.. ... A.. ... .. ... .. A.. ... [546]
#PATO_2         ..- .. .T. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. [546]
#PINTO_1       ..- .. .T. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. [546]
#PINTO_2       ..- .. .T. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. [546]
#C._parvum_EU553557 ..- .. .T. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. [546]
#C._parvum_AB441687 ..- .. .T. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. [546]
#C._parvum_DQ523507 ..T .. .T. ... .. G.. ... A.. ... .. ... .. ... .. [546]
#C._baileyi_GQ227476 ..- .. .T. ... .. G.. ... A.. ... .. ... .. ... .. [546]
#C._baileyi_DQ898161 ..- .. .T. ... .. G.. ... A.. ... .. ... .. ... .. [546]

#CODORNA_1      AAA TTC TTA GAT TT- ATT -AA AGA CAA ACT AAT GCG AAA GCA TTT GCC AAG GAT [600]
#CODORNA_2      ... .. .A.. -.. G.. -.. .. .G.. ... .. [600]
#PATO_1         ... .. --. CA- GA. -.C C.T .GT .G- --- --- --- --- [600]
#PATO_2         ... .. .TC. ..T ... G.. ... .. [600]
#PINTO_1       ... .. .G.. -.. ... .. [600]
#PINTO_2       ... .. .G.. -.. ... .. [600]
#C._parvum_EU553557 ... .. .G.. -.. ... .. [600]
#C._parvum_AB441687 ... .. .G.. -.. ... .. [600]
#C._parvum_DQ523507 ... .. .G.. -.. ... .. [600]
#C._baileyi_GQ227476 ... .. .G.. -.. ... .. .C. ... .. [600]
#C._baileyi_DQ898161 ... .. .G.. -.. ... .. .C. ... .. [600]

```

**Tabela 10** Distâncias filogenéticas calculadas pelo Parâmetro Kimura 2, entre seqüências de *Cryptosporidium* de aves domésticas do estudo e seqüências do Genbank.

|                                       | <b>CODORNA<br/>1</b> | <b>CODORNA<br/>2</b> | <b>PATO 1</b> | <b>PATO 2</b> | <b>PINTO 1</b> | <b>PINTO<br/>2</b> | <b><i>C. baileyi</i><br/>AF093495</b> | <b><i>C. baileyi</i><br/>GQ227476</b> | <b><i>C. parvum</i><br/>DQ656354</b> | <b><i>C. parvum</i><br/>EU553557</b> | <b><i>C. parvum</i><br/>AB441687</b> |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------|---------------|----------------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>CODORNA 1</b>                      |                      |                      |               |               |                |                    |                                       |                                       |                                      |                                      |                                      |
| <b>CODORNA 2</b>                      | 0,022                |                      |               |               |                |                    |                                       |                                       |                                      |                                      |                                      |
| <b>PATO 1</b>                         | 0,078                | 0,087                |               |               |                |                    |                                       |                                       |                                      |                                      |                                      |
| <b>PATO 2</b>                         | 0,005                | 0,018                | 0,085         |               |                |                    |                                       |                                       |                                      |                                      |                                      |
| <b>PINTO 1</b>                        | 0,002                | 0,018                | 0,000         | 0,085         |                |                    |                                       |                                       |                                      |                                      |                                      |
| <b>PINTO 2</b>                        | 0,005                | 0,021                | 0,002         | 0,088         | 0,002          |                    |                                       |                                       |                                      |                                      |                                      |
| <b><i>C. baileyi</i><br/>AF093495</b> | 0,075                | 0,085                | 0,083         | 0,002         | 0,083          | 0,085              |                                       |                                       |                                      |                                      |                                      |
| <b><i>C. baileyi</i><br/>GQ227476</b> | 0,075                | 0,085                | 0,083         | 0,002         | 0,083          | 0,085              | 0,000                                 |                                       |                                      |                                      |                                      |
| <b><i>C. parvum</i><br/>DQ523507</b>  | 0,002                | 0,018                | 0,000         | 0,085         | 0,000          | 0,002              | 0,083                                 | 0,083                                 |                                      |                                      |                                      |
| <b><i>C. parvum</i><br/>EU553557</b>  | 0,019                | 0,002                | 0,016         | 0,090         | 0,016          | 0,018              | 0,087                                 | 0,087                                 | 0,016                                |                                      |                                      |
| <b><i>C. parvum</i><br/>AB441687</b>  | 0,000                | 0,018                | 0,000         | 0,085         | 0,000          | 0,002              | 0,083                                 | 0,083                                 | 0,000                                | 0,016                                |                                      |
| <b><i>E. tenella</i><br/>AF026388</b> | 0,317                | 0,304                | 0,309         | 0,295         | 0,308          | 0,312              | 0,295                                 | 0,295                                 | 0,311                                | 0,304                                | 0,312                                |

**Tabela 11** Similaridades genéticas dos isolados de patos, pintos e codornas com espécies do Genbank e códigos de acesso.

| ISOLADOS         | SIMILARIDADES (%)<br>COM SEQÜÊNCIAS DO<br>GENBANK | TAMANHO DAS<br>SEQUENCIAS<br>(*pb) | CÓDIGO DOS<br>ISOLADOS DO<br>ESTUDO |
|------------------|---|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>CODORNA 1</b> | 98%<br>AB441687/ DQ523507                         | 543 pb                             | GU082384                            |
| <b>CODORNA 2</b> | 99%<br>EU55357                                    | 600 pb                             | GU082386                            |
| <b>PATO 1</b>    | 98 %<br>AB441687/ DQ523507                        | 679 pb                             | GU082388                            |
| <b>PATO 2</b>    | 99%<br>GQ227476                                   | 532 pb                             | GU082387                            |
| <b>PINTO 1</b>   | 100%<br>DQ523507                                  | 613 pb                             | GU082390                            |
| <b>PINTO 2</b>   | 99%<br>DQ523507                                   | 613 pb                             | GU082391                            |

\*pb= pares de bases

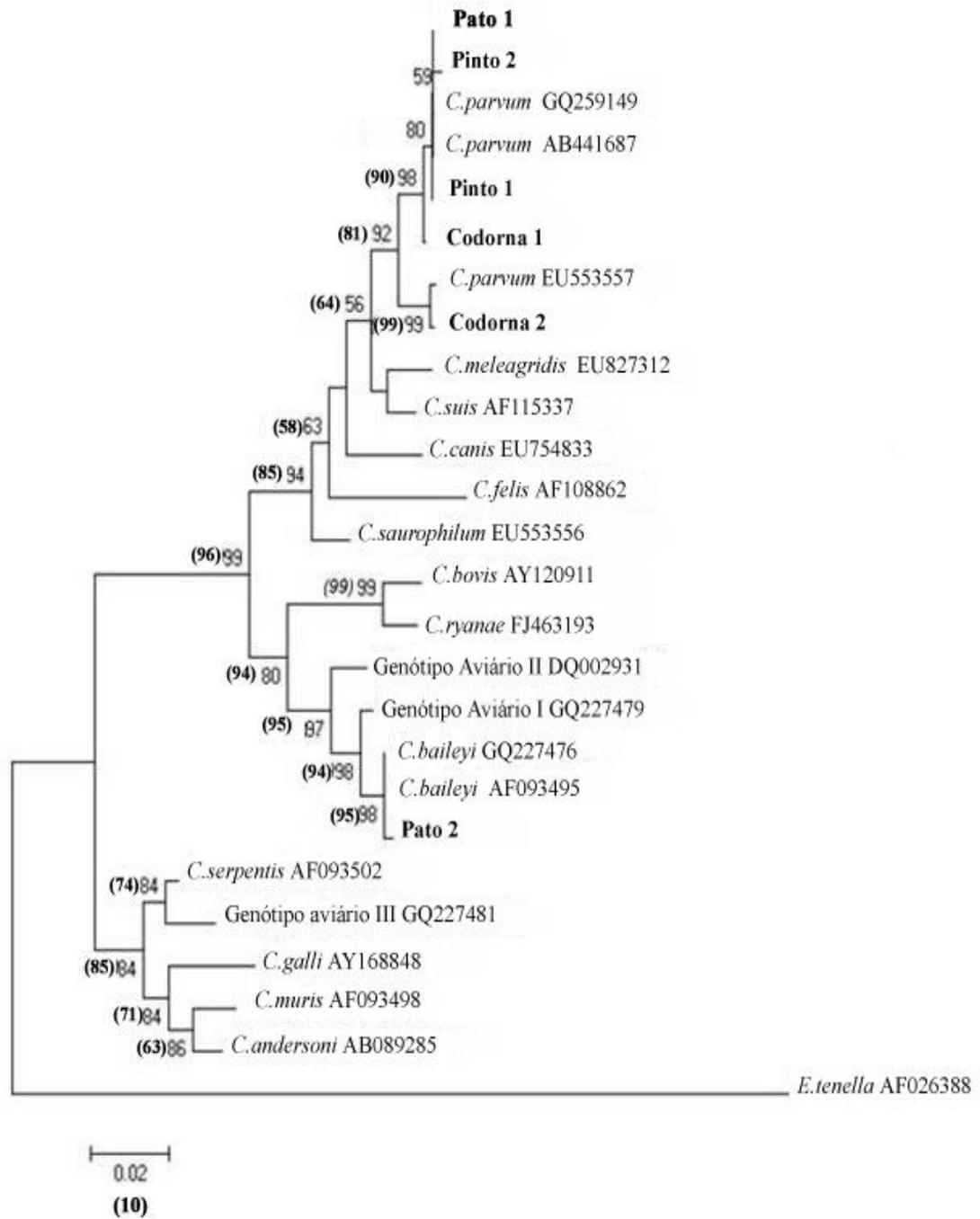
A seqüência de répteis que apresentou uma relação genética mais estreita com a codorna 2 (0,002), foi relativamente distante (0,016) das seqüências de bovinos (AB441687) e de humanos (DQ523507), porém estas duas apresentaram uma variação muito pequena (0,000 – 0,002), quando comparadas entre si e aos outros isolados do estudo.

Este fato já foi relatado na literatura por Morgan et al. (1999), Mallon et al. (2003b) e Tanriverdi et al., (2006). Esses explicaram que as populações de *C. parvum* podem apresentar grandes diferenças genéticas devido a sua ampla capacidade de reprodução em populações de *C. parvum*, e a recombinação genética favoreceria a emergência de novos genótipos. Esse mecanismo ocorre com a rápida reprodução do gênero e sua ampla habilidade para estabelecimento de população clonal, levando a emergência de populações genéticas distintas, dentro de um mesmo grupo (TANRIVERDI et al., 2006), no caso do grupo das espécies de *C. parvum*. Assim o isolado de codorna 2 estaria mais relacionado com um genótipo de *C. parvum* encontrado em répteis e os outros isolados mais intimamente relacionado com os encontrados em bovinos e humanos.

No estudo da posição taxonômica dos isolados obtidos no presente estudo, observou-se que se agruparam com espécies do gênero *Cryptosporidium* já descritas (Figura 17), e a topologia da árvore filogenética obtida pelo Neighbor Joining foi confirmada pela Maximum Parsimony. Os isolados de patos, pintos e codornas agruparam-se com as outras espécies de *C. parvum* e um isolado de pato com as espécies de *C. baileyi*, mostrando a posição taxonômica dos isolados.

Associando os dados de morfometria, dos padrões de corte apresentados pela RFLP, os dados de sequenciamento e das análises filogenéticas, foi observado *C. baileyi* e *C. parvum* em aves domésticas comercializadas no Rio de Janeiro.

Das três espécies reconhecidas capazes de infectar aves : *C. meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli*, somente foi encontrada *C. baileyi* infectando patos. Essa é uma espécie que apresenta frequência nos relatos encontrados na literatura . É a espécie identificada na maioria das aves, parasitando uma grande variedade de hospedeiros, dentre esses pintos, patos e codornas (HUBER et al.,2007). Segundo Xiao e Fayer (2007)é a espécie mais comum em aves.



**Figura 17** Árvore filogenética de seqüências do gene 18S rRNA de isolados de *Cryptosporidium* de aves domésticas do Brasil (em negrito) e outras espécies do GenBank. Os números mostram valores maiores que 50 % do bootstrap para neighbor joining e maximum parsimony (entre parênteses e negrito).

*Cryptosporidium meleagridis* é muito pouco encontrada em aves (NAKAMURA et al., 2009), porém a terceira espécie mais encontrada em humanos (RYAN et al., 2009) e *C. galli* mais relacionada a infecção em Passeriformes (RYAN et al., 2003; ANTUNES et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009).

A espécie *C. parvum*, já foi identificada em mais de 150 espécies de hospedeiros (XIAO et al., 2004a). Anteriormente era somente identificada parasitando mamíferos, incluindo o homem, mas recentes caracterizações moleculares tem demonstrado a adaptação em outros grupos de hospedeiros como répteis (XIAO et al., 2004c; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009), aves (LINDSAY et al., 1990; GRACZYK et al., 1996; ZYLAN et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009) e anfíbios (PLUTZER; KARANIS, 2009).

Nestes relatos alguns autores não puderam afirmar que a eliminação seria causada por infecção dos hospedeiros, sugerindo que os isolados de *C. parvum* estariam sendo eliminados mecanicamente, já que as aves dos estudos apresentavam baixas taxas de eliminação de oocistos (GRACZYK et al., 1998; NAKAMURA et al. 2009).

Em contrapartida, dois relatos confirmam a possibilidade de infecção por *C. parvum* em aves, um demonstrando a efetividade desta espécie em aves por infecção experimental (LINDSAY et al., 1990) e outro por infecção natural (ZYLAN et al., 2008). No presente estudo a eliminação foi acompanhada diariamente sugerindo que não era apenas a liberação mecânica de oocistos nas fezes, mas que estas aves estavam infectadas por *C. parvum*, apresentando início e fim de uma infecção.

A eliminação de oocistos de *C. parvum* de animais que estão intimamente relacionados a outros mamíferos, incluindo o homem, é um fator preocupante, já que estes animais podem servir como reservatórios de infecção para criptosporidiose, contaminando o ambiente e conseqüentemente aumentando a probabilidade da transmissão para outros animais, que podem passar a servir também como reservatórios da infecção para humanos.

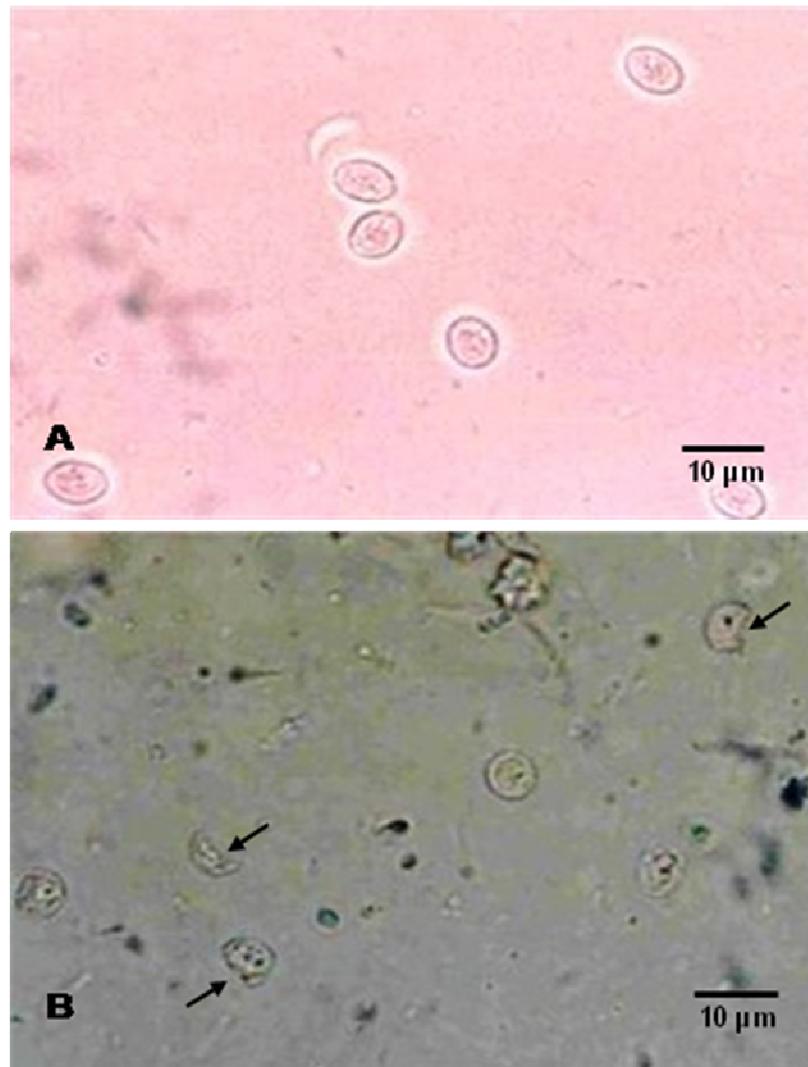
## **4.2 Aves exóticas**

### **4.2.1 Prevalência de *Cryptosporidium* em aves exóticas**

De 103 amostras fecais observadas 6,8% foram positivas. Três pertencentes à ordem Passeriformes, um manon (*Lonchura striata domestica*), um calafate (*Lonchura paddy oryzivora*) e dois canários (*Serinus canaria*) e da ordem Psittaciformes, três calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), eliminavam oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas fezes (Figura 18).

A infecção por *Cryptosporidium* nessas aves já foi anteriormente relatada. Lindsay et al. (1990) diagnosticaram o protozoário em aves passeriformes de zoológico e de estimação, causando infecção proventricular nestas aves. Latimer et al. (1992) diagnosticaram a infecção por *Cryptosporidium* que foi causando a morte de quatro calopsitas de um zoológico. Ng et al., (2006) e Antunes et al. (2008) detectaram *Cryptosporidium* em isolados de várias aves silvestres, entre elas calopsitas e canários. Porém, até o presente estudo nenhuma pesquisa havia identificado a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes de manon e calafate, sendo o primeiro relato. As taxas de ocorrência da infecção em aves silvestres foram similares aos encontrados por Ng et al. (2006), que obtiveram 6,3% em aves de cativeiro.

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 anseriformes silvestres (GRACZYK et al., 1996; GOMES et al., 2009), provavelmente pelo fato pelo fato das aves silvestres estudadas serem adultas. Nesses trabalhos também, foram encontradas poucas quantidades de oocistos por lâmina (< 30) limitando as análises morfométricas. Essas baixas taxas de infecção em aves silvestres, e a pequena quantidade de oocistos encontrados, são frequentemente relatadas na literatura.



**Figura 18** Oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de amostras fecais de aves exóticas de *pet shops* do Rio de Janeiro observados na microscopia após a utilização da técnica de centrifugo flutuação em solução saturada de açúcar. A) Oocistos deformados pela ação da solução saturada de açúcar (→).

Ng et al. (2006) estudaram aves de cativeiro e além da baixa prevalência, também não conseguiram números significantes (>50 oocistos/campo) para análise estatística (< 10 oocistos/campo).

A eliminação de oocistos em um número baixo nas aves estudadas poderia estar sendo influenciada por dois fatores: o primeiro relacionado a idade das aves, já que a maioria era adulta e imunologicamente superaria a infecção e provavelmente se caso viessem a adquirir o protozoário, o número de oocistos eliminados seria muito baixo (ANTUNES et al., 2008; GOMES et al., 2009); o segundo fator, seria que as aves não estariam infectados pelo protozoário, mas somente teriam o papel de carreadores mecânicos de várias espécies do gênero, incluindo aquelas zoonóticas (GRACZYK et al., 1996; 1998; SILVA et al., 2008).

#### 4.2.2 Morfometria dos oocistos de *Cryptosporidium* das aves exóticas

Os dados de biometria dos oocistos encontrados no presente trabalho para aves exóticas (Tabela 12) foram semelhantes aos limites descritos para as espécies do gênero (XIAO; FAYER, 2008). Apesar das análises morfométricas terem sido suficientes para identificar a presença do gênero, não foram capazes de identificar as espécies envolvidas, já que existem similaridade de morfometria intra-espécies e inter-espécies (genótipos) (EYGED et al., 2003; XIAO et al., 2004b).

**Tabela 12** Dados morfométricos (médias e desvio-padrão) dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de aves exóticas no Rio de Janeiro.

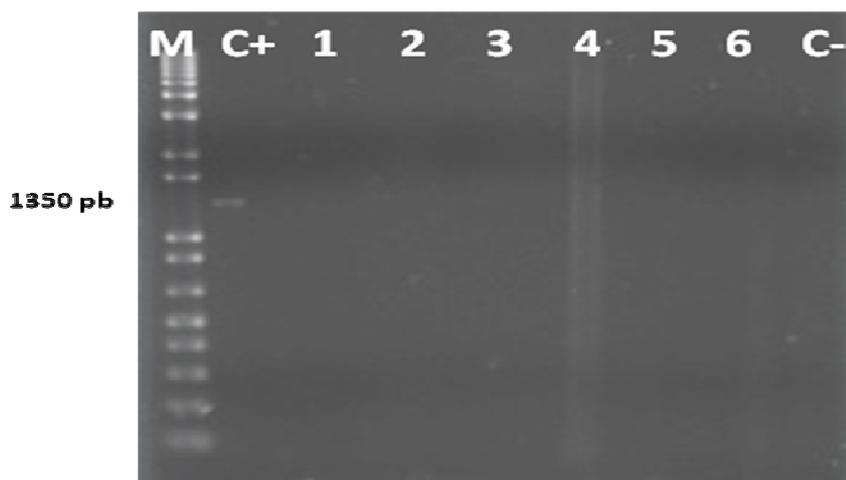
| HOSPEDEIRO  | OOCISTO (n)* | DIÂMETRO MAIOR (µm) | DIÂMETRO MENOR (µm) | ÍNDICE MORFOMÉTRICO |
|---|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>MANON</b><br>( <i>Lonchura striata domestica</i> ) | 7            | 7,2 ± 0,8           | 5,8 ± 0,7           | 1.2                 |
| <b>CALAFATE</b><br>( <i>Padda oryzivora</i> )         | 2            | 8,0                 | 4,8                 | 1.2                 |
| <b>CALOPSITA</b><br>( <i>Nymphicus hollandicus</i> )  | 29           | 7,1 ± 0,8           | 5,8 ± 0,7           | 1.6                 |
| <b>CANÁRIO</b><br>( <i>Serinus canarius</i> )         | 7            | 6,8 ± 0,3           | 5,2 ± 0,5           | 1.3                 |

\*n= número de oocistos medidos de cada espécie de ave exótica

\*µm= micrômetros

#### 4.2.3 PCR primária de amostras de aves exóticas

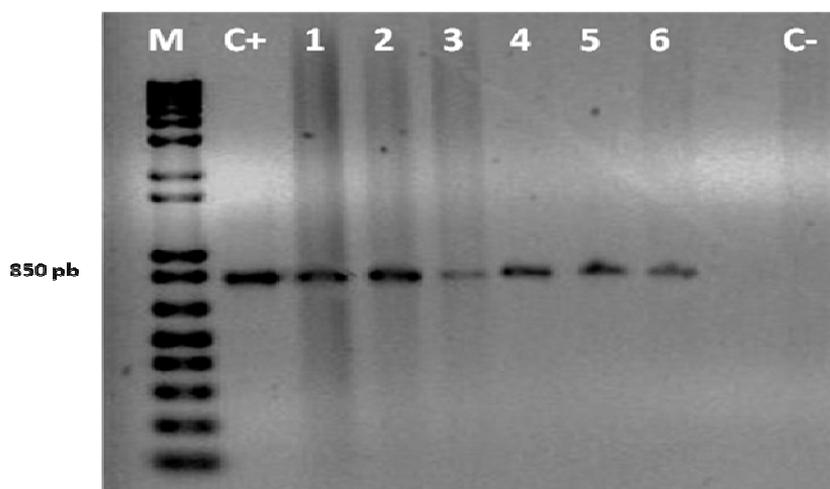
As reações de PCR primária de DNA obtido de amostras de aves exóticas não mostraram resultados visualizáveis em géis de agarose, assim como foi observado em aves domésticas. Porém para o controle positivo foram visualizados amplicons aproximados de 1350 pb, confirmando que houve amplificação primária (Figura 19), os resultados não observáveis, para amostras de aves, devem-se pelo mesmo fato considerado para aves domésticas, 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 (MORGAN; THOMPSON, 1998).



**Figura 19** Amplificação pela PCR primária do gene 18S rDNA. Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. Marcador de tamanho (pares de bases); amostra positiva para *Cryptosporidium* sp. provenientes de bezerros, C<sup>+</sup>: controle positivo, C<sup>-</sup>: controle negativo.

#### 4.2.4 Nested-PCR de aves exóticas

Nas reações de Nested-PCR foram visualizados amplicons variando de tamanho de 845-879 pb (Figura 20), indicando que o uso da PCR secundária, aumentou a especificidade e sensibilidade do teste de PCR (MORGAN; THOMPSON, 1998), sendo uma técnica mais eficiente na amplificação das amostras de aves, assim como observado nas amostras de aves domésticas.



**Figura 20** Eletroforese em gel de agarose 1,25 %. 1-14: *Cryptosporidium* sp. provenientes de Produtos da Nested-PCR de amostras fecais de aves exóticas. Colunas 1, 3 e 4: Calopsita, 2: Manon, 5: Calafate e 6: Canário.. M: marcador de tamanho (pares de bases), C<sup>+</sup>: controle positivo bovino e C<sup>-</sup>: controle negativo.

#### 4.2.5 RFLP-PCR das amostras de aves exóticas

As amostras provenientes de calopsita apresentaram três padrões de corte diferentes (Figura 21). Para a enzima *SspI* a calopsita 1 apresentou duas bandas (468 pb e 410 pb); a

calopsita 2 duas bandas (474 pb e 421 pb) e calopsita 3 quatro bandas (480 pb, 427 pb, 250 pb e 111 pb). Usando a enzima *VspI* a calopsita 1 apresentou duas bandas (752 pb e 108 pb); calopsita 2 duas bandas (780 pb e 111 pb) e calopsita 3 três bandas (780 pb, 682 pb e 113 pb). Para a amostra de manon foram encontradas três bandas usando a enzima *SspI* (478 pb, 250 pb e 111 pb) e duas bandas usando a enzima *VspI* (657 pb e 108 pb). No calafate os padrões de corte utilizando a enzima *SspI* apresentaram três bandas (487 pb, 420 pb) e para a *VspI* duas bandas (799 pb e 72 pb). Para o canário foram observados três bandas utilizando a enzima *SspI* (487 pb, 250 pb e 111 pb) e para *VspI* duas (716 pb e 117 pb).

Somente os padrões de corte apresentados na RFLP não foram capazes de determinar com certeza as espécies dos produtos, devidos as similaridades entre os padrões de corte das espécies do gênero, não favorecendo a identificação da espécie quando utilizada esta técnica.

Porém, podemos observar que produtos resultantes da RFLP de manon e canário, apresentaram padrões de corte semelhantes às espécies intestinais, e os produtos de duas calopsitas e do calafate foram semelhantes com os já estabelecidos para espécies gástricas.

Uma particularidade no presente trabalho foi a identificação em uma única amostra (Calopsita 3), de dois padrões de corte sugerindo que esta poderia não ter sido deslocada pela espécie dita majoritária (mais de 75% na amostra) como afirmam alguns autores (WIDMER et al., 2002). Estes são os primeiros relatos de padrão de corte para estas espécies de *Cryptosporidium* em aves exóticas na literatura.

#### 4.2.6 Sequenciamento das aves exóticas

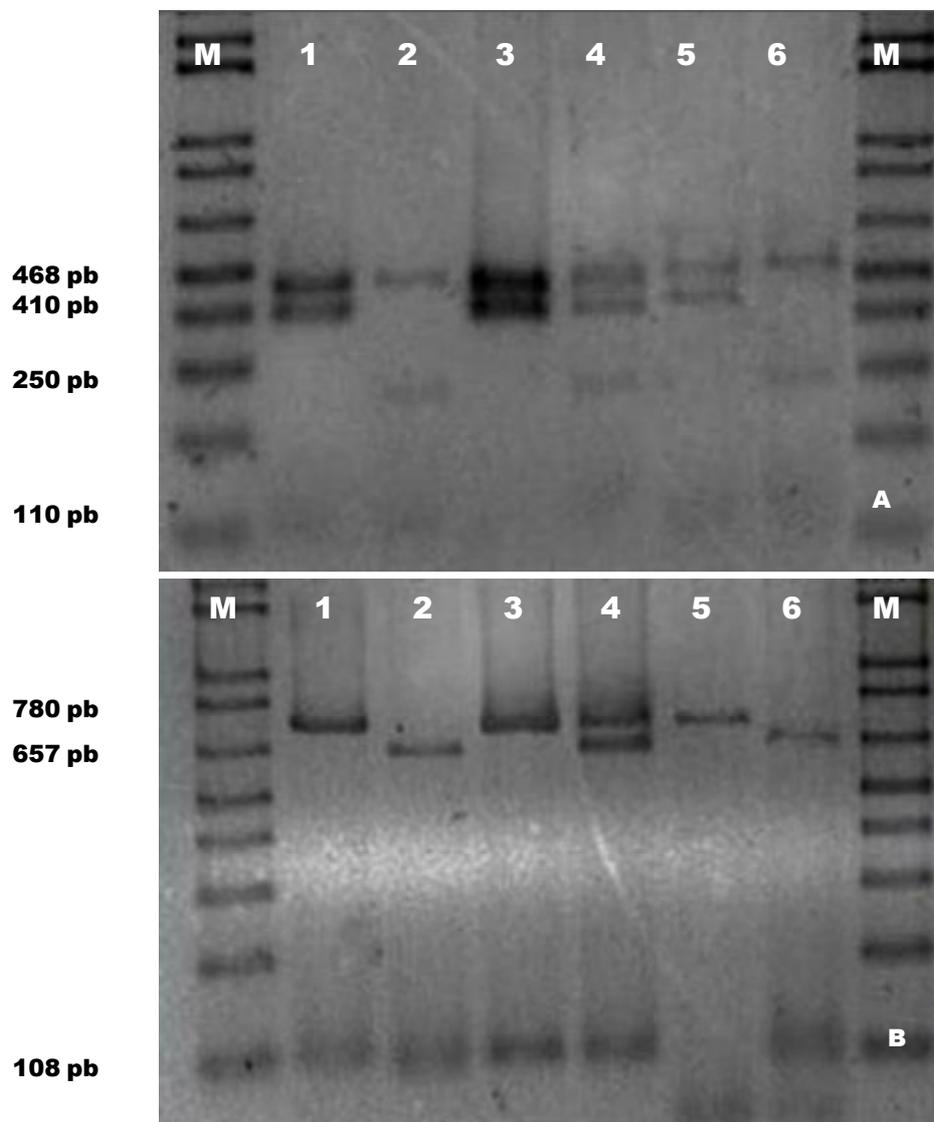
As seqüências resultantes foram alinhadas (Quadro 2) e depositadas no GenBank, recebendo os números: GU074384- GU074390, e as espécies e genótipos identificados foram: *C. parvum*, genótipo de ave III, *Cryptosporidium* sp. (espécie ou genótipo ainda não classificado) (Tabela 12 e 13). As seqüências dos isolados de *Cryptosporidium* das amostras de Calopsita 1, com 678 pb, Calopsita 2 com 679 pb, Calopsita 3 com 735 pb e Calafate com 632 pb, apresentaram 100% - 99% de similaridade com a seqüência do genótipo aviário III encontrada em isolados de calopsitas no Brasil (NAKAMURA et al., 2009). O seqüenciamento do isolado de *Cryptosporidium* de manon gerou uma seqüência com 638 pb com 99% de similaridade com *C. parvum* (ATHARI et al., 2009) encontrada em bovinos e de humanos (MEAMAR et al., 2006). Os isolados de canário apresentaram similaridade de 90% com uma seqüência obtida em um réptil (lagarto) de estimação (PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009).

#### 4.2.7 Filogenia das aves exóticas

A análise das distâncias genéticas das seqüências e da posição taxonômica na árvore filogenética confirmou a presença da espécie de *C. parvum* em manon, genótipo aviário III nas calopsitas e no calafate, e uma espécie e/ou um genótipo proveniente de dois canários, não compatível com nenhum dos depósitos verificados no Genbank.

As distâncias genéticas calculadas (Tabela 13) entre as seqüências do presente estudo quando comparadas as já depositadas no GenBank e a Figura 22 a topologia da árvore filogenética obtida pelo Neighbor Joining foi confirmada pela Maximum Parsimony.

Na análise das distâncias das seqüências de genótipo aviário III e as seqüências do isolados obtidos de calafate e calopsita, não foi observada variação grande entre estas. Porém, em relação ao isolado obtido de manon, apesar da seqüência de *Cryptosporidium* apresentar 99% de similaridade com algumas seqüências de *C. parvum* depositadas no GenBank, as distâncias genéticas entre estas seqüências (*C. parvum* do GenBank) e a de manon variaram de



**Figura 21** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. provenientes de aves exóticas. Colunas 1, 3 e 4: Calopsita; coluna 2: Manon; coluna 5: Calafate e na 6: Canário. A) Produto da digestão *SspI*, B) Produto da digestão *VspI*. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso Molecular.

**Quadro 2** Alinhamento das sequências de *C.parvum* e Genótipo Aviário III (isolados de domésticas) e *C.parvum* e Genótipo Aviário III do GenBank. Lacunas são marcadas por (-) e nucleotídeos idênticos por (.).

|                                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |       |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|
| #CALAFATE                      | GTG | GCT | ATG | ACG | GG- | TAA | CGG | GGA | ATT | AGG | GTT | CGA | TTC | CGG | AGA | GGG | AGC | CTG | AGA | AAC | GGC | TAC | CAC | ATC | TAA | GGA   | [ 78] |
| #MANON                         | ... | .A  | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [ 78] |
| #CALOPSITA_I                   | ... | ... | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [ 78] |
| #CALOPSITA_II                  | ... | ... | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [ 78] |
| #CALOPSTITA_III                | ... | ... | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [ 78] |
| #CANARIO_II                    | .C. | .A  | ... | ... | .G  | ... | -   | ... | .A. | ... | T.  | ... | T.  | ... | ... | ... | G.  | .G  | ... | ... | T.A | .T  | ... | ... | ... | [ 78] |       |
| #CANARIO_I                     | ... | .A  | ... | ... | C.- | ... | .C  | ... | GA. | .A  | ... | ... | T.  | ... | .A. | ... | ... | G.  | .G  | ... | ... | .A  | .T  | ... | ... | [ 78] |       |
| #C._parvum_EU553557            | ... | .A  | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [ 78] |
| #C._parvum_AB441687            | ... | .A  | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [ 78] |
| #C._parvum_AF093489            | ... | .A  | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [ 78] |
| #C._parvum_DQ656354            | ... | .A  | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [ 78] |
| #Genotipo_Aviario_III_GQ227481 | ... | ... | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [ 78] |
|                                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |       |
| #CALAFATE                      | AGG | CAG | CAG | GCG | CGC | AAA | TTA | CCC | AA- | TCC | TGA | CAC | AGG | GAG | GTA | GTG | ACA | AGA | AAT | AAC | AAT | ACA | GGG | CCT | AAC | G-G   | [156] |
| #MANON                         | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | -   | ... | .A. | T.  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .A  | .T. | TTT | -.    | [156] |
| #CALOPSITA_I                   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [156] |
| #CALOPSITA_II                  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [156] |
| #CALOPSTITA_III                | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [156] |
| #CANARIO_II                    | G.  | ... | .C  | ... | ... | ... | .AT | T.A | .CC | .T  | .A. | T.  | .C  | ... | -G  | .?  | ... | C.  | ... | ... | .C  | ... | C.A | GTC | TTA | -.    | [156] |
| #CANARIO_I                     | GA. | ... | .C  | ... | ... | ... | T.  | .C- | .T  | .A. | T.  | ... | ... | ... | .A. | ... | C.  | ... | .T  | .C  | ... | C.A | GTC | TTA | -.  | [156] |       |
| #C._parvum_EU553557            | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | -   | ... | .A. | T.  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .A  | .T. | TTT | -.    | [156] |
| #C._parvum_AB441687            | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | -   | ... | .A. | T.  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .A  | .T. | TTT | -.    | [156] |
| #C._parvum_AF093489            | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | -   | ... | .A. | T.  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .A  | .T. | TTT | -.    | [156] |
| #C._parvum_DQ656354            | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | -   | ... | .A. | T.  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .A  | .T. | TTT | -.    | [156] |
| #Genotipo_Aviario_III_GQ227481 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | -   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [156] |
|                                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |       |
| #CALAFATE                      | TCT | TGT | AAT | TGG | AAT | GAG | TGA | AGT | ATA | AAC | CCC | TTT | ACG | AGT | ATC | AAT | TGG | AGG | GCA | AGT | CTG | GTG | CCA | GCA | GCC | GCG   | [234] |
| #MANON                         | .T. | ... | ... | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | ... | ... | ... | .A  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [234] |
| #CALOPSITA_I                   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [234] |
| #CALOPSITA_II                  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [234] |
| #CALOPSTITA_III                | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [234] |
| #CANARIO_II                    | .T. | ... | ... | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | ... | CC. | C.A | ... | ... | .A  | ... | ... | ... | ... | ... | .G  | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #CANARIO_I                     | .T. | ... | .A  | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | ... | CC. | .A  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ?   | .G  | ... | ... | CA. | ... | [234] |       |
| #C._parvum_EU553557            | .T. | ... | ... | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | ... | ... | .A  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #C._parvum_AB441687            | .T. | ... | ... | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | ... | ... | .A  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #C._parvum_AF093489            | .T. | ... | ... | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | ... | ... | .A  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #C._parvum_DQ656354            | .T. | ... | ... | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | ... | ... | .A  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [234] |       |
| #Genotipo_Aviario_III_GQ227481 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [234] |
|                                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |       |
| #CALAFATE                      | GTA | ATT | CCA | GCT | CCA | ATA | GCG | TAT | ATT | AAA | GTT | GTT | GCA | GTT | AAA | AAG | CTC | GTA | GTT | GGA | TTT | CTG | TTG | TAT | TTT | TAT   | [312] |
| #MANON                         | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | A.A | ... | ... | ... | ... | ... | .A  | ATA | A.  | ...   | [312] |
| #CALOPSITA_I                   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...   | [312] |

```

#CALOPSITA_II ... [312]
#CALOPSTITA_III ... [312]
#CANARIO_II ... .A. .A. ... .G ... C.. ... .A A.. .A. ... .A ATA A.. ... [312]
#CANARIO_I ... .A. ... .A. ... ?A. ... C.. ... .A A.. ... .A. ... G.. ... .A ATA A.. ... [312]
#C._parvum_EU553557 ... [312]
#C._parvum_AB441687 ... [312]
#C._parvum_AF093489 ... [312]
#C._parvum_DQ656354 ... [312]
#Genotipo_Aviario_III_GQ227481 ... [312]

#CALAFATE A-A TAT TAC TA- --- AGG TAA --- --C ATT ATA ATA ACA ACA TCC TTC CCA ATA TAT T-- --- --- --- --- --- TTT [390]
#MANON .T. A.A ..T .TT GAT GAA ..T --- --T TA. ... .. TT. ... .AA ... AT. T.. CTA .AT A-- --- --- --- --- ... [390]
#CALOPSITA_I .T. ... .. --- ... [390]
#CALOPSITA_II .T. ... .. --- ... [390]
#CALOPSTITA_III .T. ... .. --- ... [390]
#CANARIO_II .T. A.A ..T .T- --A GAA ..T --- --. TA. ... .C. TT. ... .AA ... TT. T.. .TA .AT T-- --- --- --- --- ... [390]
#CANARIO_I .T. A.A ..T .T- --A GAA ..T --- --. TA. ... .C. TT. ... .AA ... AT. T.. .TA .AT T-- --- --- --- --- ... [390]
#C._parvum_EU553557 .T. A.A ..T .T- --T GAA ..T --- --T TA. ... .C. TT. ... .AA ... AT. T.. CTA .AT T-- --- --- --- --- ... [390]
#C._parvum_AB441687 .T. A.A ..T .TT GAT GAA ..T --- --T TA. ... .. TT. ... .AA ... AT. T.. CTA .AT A-- --- --- --- --- ... [390]
#C._parvum_AF093489 .T. A.A ..T .TT GAT GAA ..T --- --T TA. ... .. TT. ... .AA ... AT. T.. CTA .TT TT- --- --- --- -TT ... [390]
#C._parvum_DQ656354 .T. A.A ..T .T- --T GAA ..T --- --T TA. ... .C. TT. ... .AA ... AT. T.. CTA .AT T-- --- --- --- --- ... [390]
#Genotipo_Aviario_III_GQ227481 .T. ... .. --- ... [390]

#CALAFATE TAA TAT ATG GGA AAT TTT ACT TTG AGA AAA TTA GAG TGC TTA AAG CAG GCA ACT -GC CTT GAA TAC TCC AGC ATG GAA [468]
#MANON ..G ... .. AA. --. ... [468]
#CALOPSITA_I ... [468]
#CALOPSITA_II ... [468]
#CALOPSTITA_III ... [468]
#CANARIO_II ..G ... .G. AA. --. ... .T. ... .. .T ... .. TA. -C. ..G ... .T ... .C. .G. ... [468]
#CANARIO_I ..G ... .. AA. --. ... .T. ... .. .T ... .. TA. -C. ... .. .T ... .C. .G. ... [468]
#C._parvum_EU553557 ..G ... .. AA. --. ... [468]
#C._parvum_AB441687 ..G ... .. AA. --. ... [468]
#C._parvum_AF093489 ..G ... .. AA. --. ... [468]
#C._parvum_DQ656354 ..G ... .. AA. --. ... [468]
#Genotipo_Aviario_III_GQ227481 ... [468]

#CALAFATE TAA TAA GTA AGG ACT TTT GTC TT- TCT TGT TGG TT- CTA GGA TAA AAG TAA TGG TTA ATA GGG ACA GTT GGG GGC ATT [546]
#MANON ... .T -.. .A. .T. ... A.. ..- ... .A. ... ..- ... A.. ... G.A ... ..A ... [546]
#CALOPSITA_I ... [546]
#CALOPSITA_II ... [546]
#CALOPSTITA_III ... [546]
#CANARIO_II ... .T -.. .A. .T. ... A.. ..- ... .A. ... ..- ... A ... [546]
#CANARIO_I ... .T -.. .A. .T. ... A.. ..- ... .A. ... ..- ... A.. ... G.A ... [546]

```

```

#C._parvum_EU553557      ... ..T -.. .A. .T. ... A.. ..- ... .A. .... ..- ... A.. ... G.A ... ..A ..... [546]
#C._parvum_AB441687     ... ..T -.. .A. .T. ... A.. ..- ... .A. .... ..- ... A.. ... G.A ... ..A ..... [546]
#C._parvum_AF093489     ... ..T -.. .A. .T. ... A.. ..- .T. .A. .... ..- ... A.. ... G.A ... ..A ..... [546]
#C._parvum_DQ656354     ... ..T -.. .A. .T. ... A.. ..- ... .A. .... ..- ... A.. ... G.A ... ..A ..... [546]
#Genotipo_Aviario_III_GQ227481 ... ..T -.. .A. .T. ... A.. ..- ... .A. .... ..- ... A.. ... G.A ... ..A ..... [546]

#CALAFATE               CGT ATT TAA CAG CCA GAG GTG AAA TT [572]
#MANON                  T.. ... ..T.. ... .. [572]
#CALOPSITA_I            ... ..T.. ... .. [572]
#CALOPSITA_II           ... ..T.. ... .. [572]
#CALOPSTITA_III        ... ..T.. ... .. [572]
#CANARIO_II             T.. ... ..T.. ... .. [572]
#CANARIO_I              T.. ... ..T.. ... .. [572]
#C._parvum_EU553557     T.. ... ..T.. ... .. [572]
#C._parvum_AB441687     T.. ... ..T.. ... .. [572]
#C._parvum_AF093489     T.. ... ..T.. ... .. [572]
#C._parvum_DQ656354     T.. ... ..T.. ... .. [572]
#Genotipo_Aviario_III_GQ227481 ... ..T.. ... ..T.. ... .. [572]

```

**Tabela 13** Distância Genética usando Parâmetro Kimura-2, entre seqüências de *Cryptosporidium* em aves exóticas e as seqüências do GenBank.

|                                     | <i>C. parvum</i><br>EU553557 | <i>C. parvum</i><br>AB441687 | <i>C. parvum</i><br>AF093489 | <i>C. parvum</i><br>DQ656354 | GENOTIPO<br>AVIARIO III<br>GQ227481 | CALAFATE | MANON | CALOPSITA<br>I | CALOPSITA<br>II | CALOPSITA<br>III | CANÁRIO<br>I | CANÁRIO<br>II |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|----------|-------|----------------|-----------------|------------------|--------------|---------------|
| <i>C. parvum</i><br>EU553557        |                              |                              |                              |                              |                                     |          |       |                |                 |                  |              |               |
| <i>C. parvum</i><br>AB441687        | 0,006                        |                              |                              |                              |                                     |          |       |                |                 |                  |              |               |
| <i>C. parvum</i><br>AF093489        | 0,004                        | 0,006                        |                              |                              |                                     |          |       |                |                 |                  |              |               |
| <i>C. parvum</i><br>DQ656354        | 0,004                        | 0,006                        | 0,000                        |                              |                                     |          |       |                |                 |                  |              |               |
| Genotipo<br>Aviario III<br>GQ227481 | 0,107                        | 0,109                        | 0,109                        | 0,109                        |                                     |          |       |                |                 |                  |              |               |
| Calafate                            | 0,107                        | 0,109                        | 0,109                        | 0,109                        | 0,000                               |          |       |                |                 |                  |              |               |
| MANON                               | 0,006                        | 0,011                        | 0,009                        | 0,009                        | 0,113                               | 0,113    |       |                |                 |                  |              |               |
| CALOPSITA<br>I                      | 0,107                        | 0,109                        | 0,109                        | 0,109                        | 0,000                               | 0,000    | 0,113 |                |                 |                  |              |               |
| CALOPSITA<br>II                     | 0,107                        | 0,109                        | 0,109                        | 0,109                        | 0,000                               | 0,000    | 0,113 | 0,000          |                 |                  |              |               |
| CALOPSITA<br>III                    | 0,107                        | 0,109                        | 0,109                        | 0,109                        | 0,000                               | 0,000    | 0,113 | 0,000          | 0,000           |                  |              |               |
| CANÁRIO<br>I                        | 0,102                        | 0,104                        | 0,098                        | 0,098                        | 0,207                               | 0,207    | 0,104 | 0,207          | 0,207           | 0,207            |              |               |
| CANÁRIO<br>II                       | 0,109                        | 0,111                        | 0,104                        | 0,104                        | 0,202                               | 0,202    | 0,111 | 0,202          | 0,202           | 0,202            | 0,055        |               |
| <i>E.tenella</i>                    | 0,251                        | 0,252                        | 0,245                        | 0,245                        | 0,225                               | 0,225    | 0,259 | 0,225          | 0,225           | 0,225            | 0,378        | 0,360         |

**Tabela 14** Similaridades genéticas com seqüências do Genbank e seqüências obtidas no estudo de aves exóticas no Brasil.:

| <b>CÓDIGO GENBANK</b>   | <b>ESPÉCIE ENCONTRADA</b>        | <b>SIMILARIDADE DOS ISOLADOS</b> | <b>TAMANHO DA SEQUENCIA (*pb)</b> | <b>CÓDIGO DE ACESSO</b> |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| <b>Genótipo</b>         | Calafate                         | 100% calafate                    | 632 pb                            | GU074384                |
| <b>Aviário III</b>      | ( <i>Padda oryzivora</i> )       | 100% calopsita 1                 | 678 pb                            | GU074385                |
| <b>GQ227481</b>         | Calopsita                        | 100% calopsita 2                 | 679 pb                            | GU074386                |
|                         | ( <i>Nymphicus hollandicus</i> ) | 99 % calopsita 3                 | 632 pb                            | GU074387                |
|                         | Bovino                           |                                  |                                   |                         |
| <b><i>C. parvum</i></b> | ( <i>Bos taurus</i> )            |                                  |                                   |                         |
| <b>AB441687</b>         | Humano                           | 99% Manon                        | 638 pb                            | GU074390                |
| <b>DQ656354</b>         | ( <i>Homo sapiens</i> )          |                                  |                                   |                         |
|                         | Lagarto                          |                                  |                                   |                         |
| <b><i>C. parvum</i></b> | ( <i>Eublepharis</i>             | 90 % canário I                   | 635 pb                            | GU074388                |
| <b>EU553557</b>         | <i>macularius</i> )              | 90 % canário II                  | 638 pb                            | GU074389                |

\*pb = pares de bases

0,006 a 0,011, enquanto que a variação entre as espécies do GenBank era de 0,000 a 0,006.

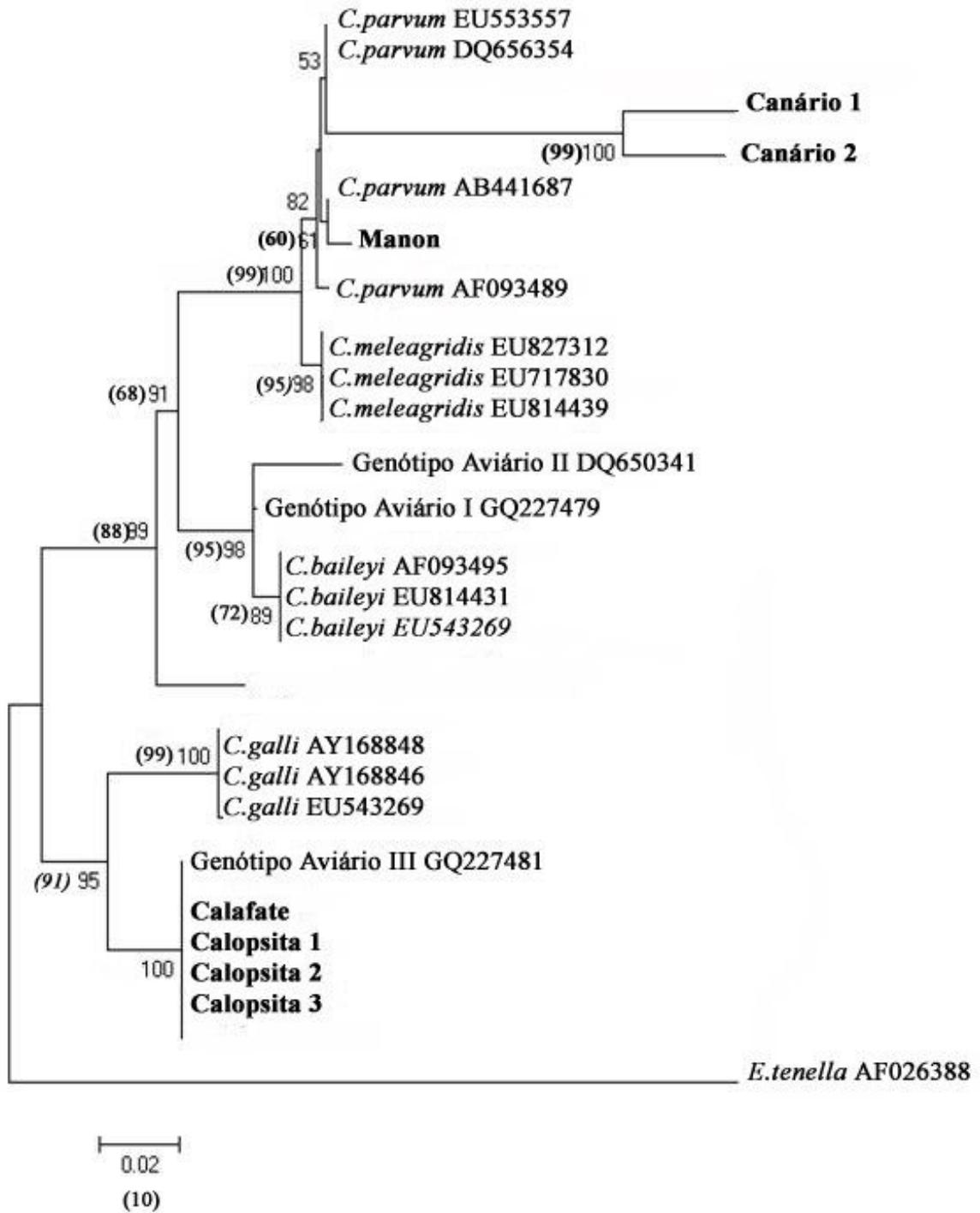
Considerando-se a união de dados morfométricos, perfil de restrição e comparações entre seqüências, concluímos tratar-se de *C. parvum*, embora apresente uma variação genética ligeiramente superior àquela observada entre as espécies de *C. parvum* utilizadas neste estudo.

Dois fatores descritos na literatura poderiam estar envolvidos com esse resultado. Um deles seria a adaptação gerada pela co-evolução de parasitos e seus hospedeiros (XIAO et al., 2002) e o outro que em populações da espécie *C. parvum* a recombinação genética favorece a emergência de novos genótipos. Esse mecanismo ocorre com a rápida reprodução do gênero e ampla habilidade para estabelecimento de população clonal, levando a emergência de populações genéticas distintas, dentro de um mesmo grupo (TANRIVERDI et al., 2006).

Na observação dos dados de canários, é interessante notar a grande distância genética de *Cryptosporidium* sp. de isolados de canário em relação as espécies de *C. parvum* já estabelecidas no GenBank. Estas mostraram que as seqüências de amostras de oocistos de *Cryptosporidium* sp. eliminados por canários representa uma espécie ou genótipo ainda não descrito que tem maior relação com o grupo intestinal das espécies de *Cryptosporidium*.

Porém, apesar de *C. parvum* ser a espécie mais similar, devido as distâncias filogenéticas encontradas nas análises, fica evidente que é uma espécie distinta ou genótipo ainda não descrito. E apesar de não ser possível identificar as duas seqüências obtidas das amostras de canário, podemos observar que agruparam-se com espécies intestinais, e mostraram-se geneticamente mais relacionadas com *C. parvum* provenientes de répteis (depositada no GenBank sob número de acesso EU553557).

A primeira identificação do genótipo aviário III foi em amostras provenientes de canários, calopsitas e aratingas (Ng et al., 2006) e o primeiro relato desse genótipo infectando aves silvestres no Brasil foi feito por Nakamura et al. (2009), com espécies de *Cryptosporidium* infectando calopsitas e agapornis. O presente estudo identificou pela primeira vez este genótipo em calafate.



**Figura 22** Árvore filogenética de seqüências do gene 18S rRNA de isolados de *Cryptosporidium* de aves exóticas do Brasil (em negrito) e outras espécies do GenBank. Os números mostram valores maiores que 50 % do bootstrap para neighbor joining e maximum parsimony (entre parênteses e em negrito).

*Cryptosporidium parvum*, uma espécie originalmente descrita em mamíferos, tem sido identificada em aves silvestres, que foram consideradas como disseminadoras de oocistos através das fezes (GRACZYK et al., 1998; ZHOU et al., 2004).

Além disso já foi comprovada a possibilidade da infecção experimental em aves por *C. parvum*, com a presença de sinais clínicos (LYNDSAY et al., 1990), a infecção natural em aves também já foi diagnosticada (ZYLAN et al., 2008). No presente estudo, não foi possível afirmar que as aves estavam eliminando oocistos devido a uma infecção, já que não foi feito o acompanhamento diário da eliminação de oocistos. Assim não podemos afirmar se estariam realmente infectadas ou somente eliminando oocistos, como transmissoras mecânicas devido ao contato com ambientes contaminados.

Os resultados nos permitem relatar a importância do gênero devido à diversidade e baixa especificidade de espécies de *Cryptosporidium* em relação a hospedeiros aviários.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1 Aves domésticas

A criação de aves domésticas constitui em importante complemento da alimentação e também da formação de capital circulante de muitas famílias. Esta atividade, mesmo praticada de maneira informal, tem uma demanda garantida. A criação de aves como galinhas, patos e codornas, é geradora de fonte renda e de proteínas.

A galinha doméstica (Figura 23) tem uma enorme importância para o homem sendo o animal doméstico mais difundido e abundante do planeta, considerada como fonte de proteína de alta qualidade e de baixo custo. Essas aves apresentam grande rusticidade, precocidade sexual, fácil manuseio, crescimento rápido, além fornecerem carne e ovos.



**Figura 23** Pinto (*Gallus gallus domesticus*) de mercado local em gaiola no biotério.

A criação de pato (Figura 24) destina-se à produção de ovos e carne, tanto para auto-consumo quanto para venda. A penugem, as penas e a gordura do fígado para fazer patê, são outros produtos para os quais existe uma grande procura. No Brasil essas criações são destinadas basicamente para a produção de carne e ovos, apesar desses produtos, ainda não serem muito apreciados pela população. Apresentam as mesmas características que as galinhas, como a rusticidade, precocidade sexual, fácil manuseio, crescimento



**Figura 24** Pato (*Anas platyrhynchos domesticus*) de mercado local em gaiola no biotério.

A codorna japonesa ou doméstica (*Coturnix coturnix japonica*) (Figura 25) de maneira geral, apresenta grande produção de ovos, precocidade sexual, fácil manuseio e baixo consumo alimentar. A sua carne ainda é considerada exótica em várias partes do mundo. No Brasil os ovos são amplamente apreciados.



**Figura 25** Codorna (*Coturnix coturnix japonica*) de mercado local em gaiola no biotério.

A ocorrência de *Cryptosporidium* em aves domésticas no presente estudo representa um achado de grande relevância, devido ao fato de serem comercializadas e adquiridas jovens com a intenção de manter pequenas criações de subsistência no domicílio, com a produção de ovos e carne. Nas aves estudadas, foram diagnosticadas duas espécies: *C. baileyi* infectando pato e *C. parvum* infectando codornas, pintos, pato. Sendo que, *C. baileyi* é comumente diagnosticada em hospedeiros da classe das aves. Entretanto, *C. parvum*, por apresentar pouca especificidade por hospedeiro é a espécie diagnosticada em várias espécies de animais domésticos (de produção e companhia), principalmente aqueles pertencentes à classe dos mamíferos.

A introdução desses animais no domicílio eliminando a forma infectante de *Cryptosporidium*, que é facilmente dispersada no ambiente, é considerada uma condição de risco. Isso porque, além de infectar outros animais da mesma espécie ou espécies diferentes, estariam colocando em risco os moradores humanos do domicílio.

Outro aspecto a ser considerado é que no local de comercialização havia além de outras espécies de aves, pequenos mamíferos que eram alojados em gaiolas em sistema de prateleira, permitindo a infecção cruzada.

Nessas lojas de comercialização de animais vivos, também existiam outros produtos para venda como rações de varias marcas para diferentes espécies de animais, sendo que estas eram expostas ao público em sacos abertos, facilitando desta forma possíveis contaminações.

Nos locais de comercialização havia um transito muito grande de pessoas, todos em busca da aquisição de produtos de baixo custo financeiro, além da variabilidade dos mesmos. Dentre estes, produtos alimentícios que eram comercializados “*in natura*”, como frutas, verduras, grãos, etc. Tendo o mais agravante que todas as lojas de comercialização eram todas muito próximas, favorecendo possíveis disseminações de forma infectantes no entorno.

A comercialização dessas aves muito jovens era um atrativo para as crianças que comumente freqüentavam estes ambientes com os seus responsáveis. Era freqüente a observação de crianças acariciando patos, pintos e codornas com os dedos entre as telas das gaiolas. Muitas das vezes esses animais eram adquiridos para satisfazerem o pedido dessas crianças. Os patos, pintos e codornas muito jovens, eram adquiridos e colocados como animais de estimação dentro do domicílio, sendo um risco de infecção para moradores desse e outros faixas etários.

## 5.2 Aves exóticas

Em relação às aves exóticas, foram analisadas amostras fecais de várias espécies, pertencentes a várias ordens (Anexo A), sendo que o manon (*Lonchura striata domestica*), o calafate (*Lonchura paddy oryzivora*), o canário (*Serinus canaria*) e a calopsita (*Nymphicus hollandicus*), apresentaram-se parasitadas por *Cryptosporidium*.

O manon (Figura 26) é um pequeno pássaro doméstico popular da ordem Passeriforme. Fruto da intervenção humana na natureza, o manon tem sua origem no Japão. Nesse país, assim como também na China, Índia, Tailândia e Sumatra, eram comuns pássaros classificados cientificamente por *Lonchura striata*, raríssimos hoje em dia. Do cruzamento de várias espécies deste gênero, surgiu o *Lonchura striata domestica*, que é o Manon que conhecemos no Brasil.. São pássaros sociais e geralmente são mantidos em grupo ou pelo menos em dupla. São pacíficos, dóceis, espertos e fáceis de serem criados, se adaptam muito bem ao convívio com outras espécies de aves. O macho tem um canto baixo e a fêmea não canta, mesmo assim, algumas vezes fica difícil descobrir o sexo dessa ave.

O manon é o pássaro indicado para quem quer começar a criação de outros como “Finches” ou Diamantes, como o Diamante de Gould, o mandarim, o bavete e o Sparrow, entre outros. Devido a sua alta habilidade materna, cuidam muito bem dos filhotes, não rejeitam ovos nem filhotes quando há interferências externas. Essa característica os tornou muito importantes para a criação de outras espécies de aves que não se reproduzem com facilidade em cativeiro, sendo usados como “amas-secas” para chocar os ovos e cuidar dos filhotes. Sem eles, muitas espécies praticamente não existiriam em cativeiro e esses dotes valeram a consideração dos criadores não apenas no Brasil, como em todo do mundo. Eles cuidam e protegem muito bem dos seus próprios ovos e filhotes e também fazem isso com os ovos e filhotes de outros pássaros, sem restrição.

Neste trabalho, foram diagnosticados manons positivos para *C.parvum*. Esses ao serem introduzidos em outras criações de passeriformes, o que comumente ocorre, possivelmente irão infectar outras espécies de aves. Além disso, pequenos criadores introduzem esse pássaro no próprio domicílio. Neste aspecto, teria que ser considerada a probabilidade de infecção para o homem, já que a espécie parasitária diagnosticada é considerada de risco por apresentar potencial zoonótico.



**Figura 26** Manon (*Lonchura striata domestica*) exposto em gaiolas em um dos locais de comercialização.

O calafate (Figura 27) conhecido também por *jav rice finch* ou *rice sparrow*, pertence a ordem Passeriforme, originário de ilhas indonésias como Java, Sumatra e Bornéu, voa em bandos e torna-se uma praga nas plantações de arroz. Seu nome científico *Padda lonchura oryzivora* significa “comedor de arroz”. É chamado também de Pardal de Java ou Pada. O nome popular calafate vem dos *calfat*, como eram chamados os marinheiros encarregados de vedar as juntas das embarcações, na função de calafetar o navio, normalmente com estopa para impedir a passagem de ar ou água.

A beleza delicada e exótica do calafate ajudou a tornar-se um dos pássaros mais criados no mundo. São sociáveis e podem conviver com outras espécies. O avermelhado do bico, de peculiar formato cônico, aparece também nos anéis ao redor de cada olho. A cabeça preta com uma mancha branca destaca-se do corpo cinza, sua coloração original, que pode se apresentar em tons mais claros ou escuros. A sua coloração é uma característica que atraiu vários criadores, e geralmente são utilizados como pássaros ornamentais.

O genótipo de *Cryptosporidium*, genótipo aviário III, foi identificado em calafate, sendo comum em aves. Dessa forma, não podemos descartar a hipótese de que a introdução de um animal infectado em uma nova criação, da mesma espécie ou espécies diferentes de aves, poderia trazer riscos de infecção.



**Figura 27** Calafate (*Lonchura padda oryzivora*) expostos em gaiola de *Pet Shop* da baixada fluminense .

O canário (Figura 28) ou popularmente canarinho é um pequeno pássaro canoro, pertencente à ordem Passeriforme. Este pássaro é originário dos Açores, da ilha da Madeira e das ilhas Canárias. O seu nome vem destas últimas, sendo que o nome das ilhas vem da palavra em latim *canaria* que significa "dos cães", já que os romanos encontraram ali muitos cães selvagens. Existem várias espécies de canário no mundo inteiro com tamanho, cores e um jeito especial de “cantar”. O canário mais popular, originário das Ilhas Canárias, criado em cativeiro há mais de 500 anos, divide-se em: porte, canto e cor. A sua plumagem é geralmente amarelada com a parte inferior do ventre de cor clara.

Na América do Sul há um canário nativo, chamado canário-terra ou canário-da-terra-brasileiro (*Sicalis flaveola brasiliense*). Não é da mesma espécie do canário *Serinus canaria*, tendo obtido este nome por sua aparência e para fazer uma contraposição ao canário que vinha

de fora. Assim tem-se o canário-da-terra (*Sicalis flaveola brasiliense*) e o canário do Reino (*Serinus canaria*).



**Figura 28** Canário (*Serinus canaria*) exposto em gaiola de pet shop

No Brasil há vários criadores de canário do Reino, que devido ao canto se popularizou e se expandiu em vários estados, sendo muito comercializado.

As seqüências de parasitos de canários de isolados de *Cryptosporidium* obtidas neste trabalho, não foram identificadas como espécie ou genótipo conhecidos de *Cryptosporidium*, devido à grande distância genética observadas entre elas e aquelas já depositadas no GenBank, sugerindo um genótipo ou uma espécie nova. Isto significa que mesmo não conhecendo espécie e/ou genótipo, possivelmente poderia haver riscos de infecção para aves da mesma espécie ou não, com a introdução de um animal eliminando formas infectantes no mesmo ambiente de criação.

A calopsita ou caturra (Figura 29) é uma ave que pertence à ordem dos Psitaciformes, originária da Austrália. Com sua beleza exótica destacada pela crista ereta, ornamenta o ambiente onde se encontra. Torna-se ainda mais atraente por seu tamanho de cerca de 30 cm, apresentando variedade de cores.

Permite compor viveiros com diversidade de espécies de aves, uma característica restrita à grande minoria das aves, aceitando com o seu temperamento pacífico também o convívio com pássaros de menor porte. Vive em média 20 anos.

A calopsita é uma ave dócil que pode ser criada como animal de estimação e circular pelo interior do domicílio, uma prática comum para quem adquire essas aves. Além da docilidade, é muito barulhenta, fica horas emitindo gritos, mas podem assobiar e algumas chegam até a falar. Essa característica é peculiar aos machos e as fêmeas apenas assobiam. No entanto, se o dono tiver paciência para treiná-la, vai se surpreender com suas habilidades. É uma ave muito fácil de criar e por isso é recomendada para iniciantes e para quem quer ter pouco trabalho. São resistentes a doenças e suportam bem as variáveis climáticas desde que convenientemente abrigadas contra ventos e frio extremos. Outra característica dessa ave é a facilidade da procriação. Por ser criada há muito tempo em cativeiro, a Calopsita já está

predisposta a reproduzir-se fora do ambiente natural, sem grandes exigências, apresentando uma ótima habilidade materna. No Brasil, os primeiros exemplares importados desembarcaram a partir de 1970 e hoje já existem muitos criadores, o que as torna relativamente populares.

Nessas aves foi diagnosticado *Cryptosporidium*, genótipo aviário III, o mesmo identificado em calafate, sendo um genótipo comum para aves. Como a calopsita, permite compor viveiros com diversidade de espécies de aves, possivelmente a introdução de um animal eliminando a forma infectante do protozoário em uma criação, poderia infectar outras aves.

Além disso, é considerada uma ave de fácil criação e docilidade, sendo manuseada constantemente pelo homem. Nesta condição, a ave poderá se estressar possibilitando o desenvolvimento da doença clínica nesses animais.



**Figura 29** Calopsita (*Nymphicus hollandicus*) exposta a comercialização em *Pet Shop* da baixada fluminense.

## 6 CONCLUSÕES

1. A infecção natural por protozoários do gênero *Cryptosporidium* ocorre em aves domésticas e aves exóticas comercializadas no Estado do Rio de Janeiro.
2. A espécie *C. baileyi* foi identificada em amostras de patos, *C. parvum* em patos, pintos, codornas e manon e genótipo aviário III em calafate e calopsita, representando nesse último caso a primeira descrição nessas espécies.
3. A técnica PCR-RFLP isoladamente permitiu apenas a identificação de *C. baileyi* e, associada ao seqüenciamento, foi capaz de identificar *C. parvum* e de demonstrar um novo padrão de corte para a literatura, sendo o primeiro relato para o genótipo aviário III.
4. Um novo genótipo ou espécie de *Cryptosporidium*, apresentando maior identidade com espécies intestinais, foi diagnosticado em canários comercializados no Rio de Janeiro mais estudos serão necessários para uma melhor caracterização.
5. Seqüências de *C. parvum* podem apresentar grande diversidade genética quando comparadas com aquelas depositadas no GenBank.
6. Aves domésticas e exóticas comercializadas em *pet shops*, criadouros e mercados locais no Rio de Janeiro podem servir como fonte de contaminação ambiental através da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes, favorecendo a infecção de várias espécies de hospedeiros, inclusive humanos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASSI, H.; COUDERT, F.; CHÉREL, Y.; DAMBRINE, G.; BRUGÈRE-PICOUX, J.; NACIRI, M. Renal Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) in specific-pathogen-free chickens experimentally co infected with Marek's disease virus. *Avian Diseases*, v. 43, n.4, p.738-744, 1999.
- ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Comparative study of PCR-based *Cryptosporidium* discriminating techniques with a review of literature. *Kansenshogaku Zasshi*, v. 76, n. 10, p. 869-881. 2002.
- AKIYOSHI, D. E.; FENG, X.; BUCKHOLT, M. A.; WIDMER, G.; TZIPORI, S. Genetic Analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype I isolate passaged through different host species. *Infection and Immunity*, v.70, n. 10, p. 5670-5675, 2002.
- ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÁ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa:Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 8, p. 1007-1021, 2002.
- AMAR, C. F. L.; DEAR, P. H.; McLAUHLIN, J. Detection and identification Real-time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. *Letters in Applied Microbiology*, v.38, n.1, p. 217-222, 2004.
- 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, p.702-705, 2008.
- ARROWOOD, M. J. Diagnosis. IN: FAYER, R. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press: Washington, p. 43-60, 1997.
- BARTA, J.R.; THOMPSON, R.C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006.
- BAXBY, D., BLUNDELL, N., HART, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *Journal Hygiene*, v. 93, p. 317-323. 1984.
- BLEARS, M.J., POKORNY, N.J., CARRENO, R.A., CHEN, S., DE GRANDIS, S.A., LEE, H., TREVORS, J.T. DNA fingerprinting of *Cryptosporidium parvum* isolates using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Journal for Parasitologists*, v. 86, p. 838-41, 2000.
- CACCIÒ, S.; CAMILLI, R.; LA ROSA, G.; POZIO, E. Establishing the *Cryptosporidium parvum* karyotype by NotI and SfiI restriction analysis and Southern hybridization. *Gene*, v. 28, n. 1, p. 73-79, 1998.
- CACCIÒ, S.M. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*, v. 47, p. 185-92, 2005.

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

CAMA, V.A.; ROSS, J.M.; CRAWFORD, S.; KAWAI, V.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; VARGAS, D.; VIVAR, A.; TICONA, E.; NAVINCOPA, M.; WILLIAMSON, J.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R.H.; BERN, C.; XIAO, L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *Journal Infection Diseases*, v.196, n. 5, p. 684-691, 2007.

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

CARRAWAY, M.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Identification of genetic heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* ribosomal repeat. *Applied Enviromental Microbiology*., v. 62, n. 2, p. 712-716, 1996.

CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, v. 85, n. 11, p. 899-904, 1999.

CEVALLOS, A. M.; ZHANG, X.; WALDOR, M. K.; JAISON, S.; ZHOU, X.; TZIPORI, S.; NEUTRA, M. R.; WARD, H. D. Molecular cloning and expression gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp 40 and gp 15. *Infection and immunity*, v. 68, n. 1, p.4108-4116, 2000.

CHALMERS, R.M.; FERGUSON, C.; CACCIO, S.; GASSER, R. B.; ABS EL-OSTA, Y. G.; HEIJNEN, L.; XIAO, L.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; SINCLAIR, M.; STEVENS, M. Direct comparison of selected methods for genetic categorization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 1, p. 397-410, 2005.

COHEN, S.; DALLE, F.; GALLAY, A.; DI PALMA, M.; BONNIN, A.; WARD, H. D. Identification of Cpgp 40/15 type Ib as the predominant Allele in isolates of *Cryptosporidium* spp. From a waterborne outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 589-591, 2006.

COUPE, S.; SARFATI, C.; HAMANE, S.; DEROIN, F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction Fragment Length Polimorfism. *Journal of Clinical Microbiology*, v .43, n.3, p.1017-1023, 2005.

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

CURRENT, W.L.;GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Review*, v.4, n. 3, p. 325-58, 1991.

EYGED, Z.; SRÉTER, T.; SZÉLL, Z.; VARGA, I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. – recent developments and future needs. *Veterinary Parasitology*, v. 111, p.103-114, 2003.

FALL, A.; THOMPSON, R.C.; HOBBS, R.P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *Journal Parasitology*, v. 89, n.2, p.399-402, 2003.

FAYER, R. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal Parasitology*, v.91, p.624-629, 2005.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12, p 1305-1322, 2000.

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, v. 164, n. 14, p.192-200, 2009.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, v. 1, n. 3, p. 191-198, 2008.

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

FAYER; XIAO. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. ( 2° ed), Florida : CRC Press, 576 p, 2008.

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

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *Journal Clinical Microbiology*, v.38, p. 1267–1268, 2000.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal Clinical Microbiology*, v. 35, p. 1526–1529, 1997.

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

GASSER, R. B.; ABS EL-OSTA, Y. G. ; CHALMERS, R. M. Eletrophoretic Analysis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n. 5, p. 2719-2730, 2003.

GASSER, R.B.; O'DONOGHUE, P. Isolation, propagation and characterization of *Cryptosporidium*. *International Journal Parasitology*, v. 29, p.1379-413, 1999.

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, p.2128-2134, 2009.

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

GRACZYK, T.K.; FAYER, R.; TROUT, J.M.; LEWIS, E.J.; FARLEY, C.A.; SULAIMAN, I.; LAL, ALTAF, A.A. *Giardia* so. Cysts and infections *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada Geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p.2736-2738, 1998.

GUY, J.S.; LEVY, M.G.; LEY, D.H.; BARNES, H.J.; GERIG, T.M. Experimental reproduction of enteritis in bobwhite quail (*Colinus virginianus*) with *Cryptosporidium* and reovirus. *Avian Diseases*, v. 31, n. 4, p. 713-722, 1987.

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

HALLIER-SOULIER, S.; GUILLOT, E. An immunomagnetic separation–reverse transcription polymerase chain reaction (IMS-RT-PCR) test for sensitive and rapid detection of viable waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 1, p. 592–598, 2003.

HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavia*, v. 22, n. 3, p. 594-596, 1981.

HIGGINS, J. A.; JENKINS, M. C.; SHELTON, D. R.; FAYER, R.; KARNS, J. S. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. *Applied and environmental Microbiology*, v. 67, n. 11, p.5321-5324, 2001.

HOER, F.J.; CURRENT, W.L.; HAYNES, T.B. Fatal cryptosporidiosis in quail. *Avian Diseases*, v. 30, p.421-423, 1986.

HUBER, F., BOMFIM, T.C.B., GOMES, R.S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the city of Rio de Janeiro. *Veterinary Parasitology*, v.130, p. 69-72, 2005.

HUBER, F.; SILVA da, 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, p.65-74, 2007.

HUNTER, P.R.; HADFIELD, S.J.; WILKINSON, D.; LAKE, I.R.; HARRISON, F.C.; CHALMERS, R.M. Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerging Infection Diseases*, v. 13, n.1, p. 82-88, 2007.

- ISEKI, M.; MAEKAWA, T.; MORIYA, K.; UNI, S.; TAKADA, S. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitology Research*, v.75, n. 3, p. 218-222, 1989.
- JELLISON, K.L.; DISTEL, D.L.; HEMOND, H.F.; SCHAUER, D.B. Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S r RNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada Geese (*Branta canadensis*): Evidence for five novel genotypes. *Applied Environmental Microbiology*, v. 70, p.452-458, 2004.
- JEX, A.R.; GASSER, R.B. Analysis of the genetic diversity within *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis by mutation scanning. *Electrophoresis*, v. 29, n. 20, p 4119-4129, 2008.
- JIRKŮ, M.; VALIGUROVÁ, A.; KOUDELA, B.; KRÍZEK, J.; MODRÝ, D.; SLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitology*, v. 55, n. 2, p. 81-94, 2008.
- JOHNSTON, S.P.; BALLARD, M.M.; BEACH, M.J.; CAUSER, L.; WILKINS, P.P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal Clinical Microbiology*, v. 41, p .623–6, 2003.
- KATO, S.; LINDERGARD, G.; MOHAMMED, H.O. Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.111, n.3, p.153-159, 2003.
- KESHAVARZ, A.; HAGHIGHI, A.; ATHARI, A.; KAZEMI, B.; ABADI, A.; MOJARAD, E.N. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. *Veterinary Parasitology*, v. 160, n. 23, p.316-318, 2009.
- KIM, Y.; HOWERT, E.W.; SHIN, N.S.; KNON, S.W.; TERRELL, S.P.; KIM, D.Y. Disseminated visceral coccidiosis and cloacal cryptosporidiosis in a Japanese white-naped crane (*Grus vipio*). *Journal for Parasitology*, v.91, p.199-201, 2005.
- KOUDELA, B.; MODRÝ, D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizards. *Folia Parasitologica*, v. 45, p. 93-100, 1998.
- KUCZYNSKA, E.; SHELTON, D.R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Applied Environmental Microbiology*, v. 65, n. 7, p. 2820-2826, 1999.
- KUHN, R.C.; ROCK, C.M.; OSHIMA, K.H. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande River Valley in Southern New Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p.161-165, 2002.
- KWON YK, WEE SH, KOOK JH, LEE CG. Outbreak of enteric cryptosporidiosis in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *Veterinary Research*, v. 12, n .7, p. 210-211, 2005.
- LATIMER, K.S.; STEFFENS, W.L.; RAKICH, P.M.; RITCHIE, B.W.; NIAGRO, F.D.; KIRCHER, I.M.; LUKERT, P.D. Cryptosporidiosis in four cockatoos with psittacine beak and

- feather disease. *Journal of American Veterinarian Medical Association*, v. 200, n.5, p.707-710, 1992.
- LAXER, M. A.; TIMBLIN, B. K.; PATEL, R. J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.46, n. 6, p. 688-694, 1991.
- LE BLANCQ, S.M.; KHRAMTSOV, N.V.; ZAMANI, F.; UPTON, S.J.; WU, T.W. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Molecular Biochemistry Parasitology*, v. 15, n.2, p. 463-478, 1997.
- LÉGER. *Caryospora simplex*, Coccidie monosporeé et la classification des coccidies. *Archiv fur Protistenkunde*, n.22, p.71-88, 1912.
- LEONI, F.; MALLON, M.; SMITH, H.V.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J. Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from sporadic and outbreak-related human cases and *C. parvum* from sporadic cases in livestock in the UK. *Journal Clinical Microbiology*, v.45, p. 3286–3294, 2007.
- LEVINE, N. D. The Protozoan Phylum Apicomplexa. CRC Press, Boca Raton: Florida. 2 v., 1985.
- LEVINE, N.D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology*, v.66, n.5, p. 830-834, 1980.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. Cryptosporidiosis in zoo and pet birds. *Journal Protozoology*, v.38, p.180 S-1S, 1990.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; HOER, F.J. Small intestinal cryptosporidiosis in cockatiels associated with *Cryptosporidium baileyi*-like oocysts. *Avian Diseases*, v. 34, n.3, p.791-793, 1990.
- LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, U.M. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal Eukaryotic Microbiology*, v.47, p.91-95, 2000.
- MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *Journal Infections Diseases*, v.147, p.:824–8. 1983.
- MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, v. 331, p. 161–7, 1994.
- MALLON, M.; MACLEOD, A.; WASTLIN, J.; SMITH, H.; REILLY, B.; TAIT, A. Population structure and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Molecular Evolution*, v.56, n.1, p.407-417, 2003a.
- MALLON, M.; MACLEOD, A.; WASTLIN, J.; SMITH, H.; TAIT, A. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. *Infections Genetic Evolution*, v.3, n. 3, p. 207-218, 2003b.

- MCLAUCHLIN, J.; PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR-HOETZENEDER, C.; NICHOLS, G. L. Genetic Characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.10, 1999.
- MEAD, J.R.; ARROWOOD, M.J.; CURRENT, W.L.; STERLING, C.R. Field inversion gel electrophoretic separation of *Cryptosporidium* spp. chromosome-sized DNA. *Journal of Parasitology*, v. 74, n. 3, p. 366-369, 1988.
- MEAMAR, A.R.; REZAIAN, M.; REZAIE, S.; MOHRAZ, M.; KIA, E.B.; HOUP, E.R.; SOLAYMANI-MOHAMMADI, S. *Cryptosporidium parvum* bovine genotype oocysts in the respiratory samples of an AIDS patient: efficacy of treatment with a combination of azithromycin and paromomycin. *Parasitology Research*, v. 98, n. 6, p. 593-595, 2006.
- MEIRELES, M.V.; PAULILO, A.C.; SILVA, G.S.; COSTA, A.J.; JÚNIOR, L.D.; MACHADO, R.Z. Infecção Experimental por *Cryptosporidium baileyi* em aves de corte: I- aspectos clínicos, parasitológicos e zootécnicos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.7, p.11-14, 1998.
- 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 for Parasitology*, v. 92, n. 3, p.623-626, 2006.
- MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C.E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, v.70, p.1156-1160, 1976.
- MORGAN, U. M.; XIAO, L.; FAYER, R.; GRACZYK, T. K.; LAL, A. A.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. A. Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive reptiles using 18S rDNA sequence data and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal for Parasitology*, v.85, n.3, p. 525-530, 1999.
- 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-RYAN, U.M.; MONIS, P.; POSSENTI, A.; CRISANTI, A.; SPANO, F. Cloning and phylogenetic analysis of the ribosomal internal transcribed spacer-1 (ITS1) of *Cryptosporidium wairi* and its relationship to *C. parvum* genotypes. *Parassitologia*, v. 43, p. 159-63, 2001.
- NAKAMURA, A.A.; SIMÕES, D.C.; ANTUNES, R.G.; SILVA DA, D.C.; MEIRELES, M.V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. From fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Veterinary Parasitology*, in press, 2009.
- NANNINI, E.C. OKHUYSEN, P.C. HIV-1 in the era of highly active antireoviral therapy. *Current Gastroenterology*, v.4, p.392-398, 2002.

- NEWMAN, R.D.; JAEGER, K.L.; WUHI, T.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. *Journal Clinical Microbiology*, v. 31, p. 2080–2084, 1993.
- NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied Environmental Microbiology*, v.72, n.12, p. 548-553, 2006.
- NICHOLS, R. A. B.; MOORE, J. E.; SMITH, H. V. A rapid method for extracting oocyst DNA from *Cryptosporidium*-positive human faeces for outbreak investigations. *Journal of Microbiological Methods*, v. 65, n. 3, p. 512-524, 2006.
- NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.L.; HOLSCHER, M.A.; YARDLEY, J.H. Acute enterocolitis in a human being with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, v.70, p.592-598, 1976.
- O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.
- OTTO, T.D.; VASCONCELLOS, E.A.; GOMES, L.H.; MOREIRA, A.S.; DEGRAVE, W.M.; MENDONÇA-LIMA, L.; ALVES-FERREIRA, M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genetics and Molecular Research*, v.23, p. 861-871, 2008.
- PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, v.8, p.479-484, 1971.
- PAVLÁSEK, I.; LÁVICKA, M. The first finding of a spontaneous gastric cryptosporidiosis infection in hamsters (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903). *Veterinary Medical*, v. 40, n.8, p. 261-263, 1995.
- PEDRAZA-DÍAZ, S.; ORTEGA-MORA, L.M.; CARRIÓN, B.; NAVARRO, V.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. *Veterinary Parasitology*, v.160, p.204-210, 2009.
- PEDRAZA-DÍAZ, S.; AMAR, C.; McLAUHLIN, J. The identification and characterization of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 189, n. 1, p. 189-194, 2000.
- PENG, M. M.; XIAO, L.; FREEMAN, A. R.; ARROWOOD, M. J.; ESCALANTE, A. A.; WELTMAN, A. C.; ONG, C. S. L.; MACKENZIE, W. R.; LAL, A. A.; BEARD, C. B. Genetic Polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: Evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*, v. 3, n. 4, p. 567-573, 1997.
- PIENIAZEK, N. J.; BORNAY-LLINARES, F. J.; SLEMENDA, S. B.; SILVA, A. J.; MOURA, I. N. S.; ARROWOOD, M. J.; DITRICH, O.; ADDISS, D. G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerging Infectious Diseases*, v. 5, n. 3, p. 444-449, 1999.
- PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology*, v. 165, n. 12p. 187-199, 2009.

- POHJOLA, S.; JOKIPII, A.M. Dimethylsulphoxide–Ziehl–Neelsen staining technique for detection of cryptosporidial oocysts. *The Veterinary Record*, v. 16, n. 116, p. 442-443, 1985.
- POWER, M.L.; RYAN, U.M. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *The Journal of Parasitology*, v. 94, n. 5, p.1114-1117, 2008.
- QUINTERO-BETANCOURT, W.; GENNACCARO, A.L.; SCOTT, T.M.; ROSE, J.B. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. *Applied Environmental Microbiology*, v. 69, p. 5380–5388, 2003.
- RAMIREZ, N. E.; SREEVATSAN, S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Veterinary Parasitology*, v. 136, n. 1, p. 201–213, 2006.
- RHEE, J. K.; KIM, H. C.; LEE, S. B.; YOON, S. Y. Immunosuppressive effect of *Cryptosporidium baileyi* infection on vaccination against New Castle Disease in chicks. *Korean Journal of Parasitology*, v. 36, p.121-125, 1998.
- RHEE, J.K.; KIM, H.C.; PARK, B.K. Effects of *Cryptosporidium baileyi* infection on the bursa of Fabricius in chickens. *Korean Journal of Parasitology*, v.35, p.181-187, 1997.
- RICHTER, D.; WIEGAND-TRIPP, G.; BURKHARDT, E.; KALETA, E.F. Natural infections by *Cryptosporidium* sp. in farm-raised ducks and geese. *Avian Pathology*, v. 23, n. 2, p. 277-286, 1994.
- RYAN U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology*, v. 124, n.1, p.113-120, 2010.
- RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I. M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli*, Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, v. 9, n. 1, p. 809-813, 2003.
- RYAN, U.M.; FALL, A.; WALL, L.A.; HIJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R.C.; OLSON, M.; LAL.A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal Eucaryotic Microbiology*, v.49, v.433-440, 2002.
- RYAN, U.M.; O'HARA, A.; XIU, O. Molecular and biological characterization of a *Cryptosporidium molnari*-like isolate from a guppy (*Poecilia reticulata*). *Applied Environmental Microbiology*, v. 70, p. 3761–5, 2004.
- RYAN, U.M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal Eukaryotic Microbiology*, v.55, n. 1, p. 22-26, 2008.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

- SCHINDLER, A.R.; ABS EL-OSTA, Y.G.; STEVENS, M.; SINCLAIR, M.I.; GASSER, R.B. Capillary electrophoretic analysis of fragment length polymorphism in ribosomal markers of *Cryptosporidium* from humans. *Molecular Cell Probes*, v. 19, p 394–349, 2005.
- SCORZA, A. V.; BREWER, M. M.; LAPPIN, M. R. Polymerase Chain Reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. *Journal of Parasitology*, v. 89, n. 2, p.423-426, 2003.
- SILVA DA, A.S.; MONTEIRO, G.S.; SILVA DA, M.K.; SOARES, J.F.; OLIVEIRA, C.B.; LIMA, F.P.; ZANETTE, R.A.; SOUZA, C.P.; SALOMÃO, L.E. Parasitismo por *Cryptosporidium* spp. Em psitacídeos mantidos em cativeiro no município de cachoeira do sul-RS,Brasil. *Veterinária e Zootécnica*, v.15, n.2,p.234-238, 2008.
- SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of Comparative Pathology*, v.65, p. 262-266, 1955.
- SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R.C. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans, *Trends Parasitology*, v.22, p. 160–167, 2006.
- SMITH, H.V.; CAMPBELL, B.M.; GRIMASON, A.M. A microscopic system with a dual band filter for the simultaneous enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts and sporozoites. *Water Research*, v. 37, n. 10, p. 2525-2527, 2003.
- SRÉTER, T.; VARGA, I. *Cryptosporidiosis* in birds – A review. *Veterinary Parasitology*, v.87, p.261-279, 2000.
- STRONG, W.B.; NELSON, R.G. Gene discovery in *Cryptosporidium parvum*: expressed sequence tags and genome survey sequences. *Contribution Microbiology*, v. 6, p. 92-115, 2000.
- SULAIMAN, I.M.; HIRA, P.R.; ZHOU, L.; AL-ALI, F.M.; AL-SHELAHI, F.A.; SHWEIKI, H.M.; IQBAL, J.; KHALID, N.; XIAO, L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal Clinical Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 2805-2809, 2005.
- SULAIMAN, I.M.; LAL, A.A.; XIAO, L. A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, suppl., p.24S-25S, 2001.
- SULAIMAN, I.M.; LAL, A.A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actins locus. *Journal Parasitology*, v. 88, n.2, 388-394, 2002.
- SULAIMAN, I.M.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.; LAL, A.A.; XIAO, L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, n. 6, p. 2385-2391, 2000.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

- 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.
- TRAMPEL, D.W.; PEPPER, T.M.; BLAGBURN, B.L. Urinary tract cryptosporidiosis in commercial laying hens. *Avian Diseases*, v. 44, n. 2, p.479-484, 2000.
- TYZZER, E.E. A sporozoon found in the peptic glands of common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.5, p.12-13, 1907.
- TYZZER, E.E. Coccidiosis in gallinaceous birds. *American Journal of Hygiene*, v.10, p.269-383, 1929.
- TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp.nov.) a coccidium found in the samall intestine of common mouse. *Archiv fur Protistenkunde*, v.26. p.394-412, 1912.
- TZIPORI, S.; WIDMER, G. The biology of *Cryptosporidium*. *Contributions to Microbiology*, v. 6, p. 31-32, 2000.
- VETTERLING, J.M.; JERVIS, H.R.; MERRILL, T.G.; SPRINZ, H. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *Journal Protozoology*, v. 18, n. 2,p .243-247,1971.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.;PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 4407–14, 1995.
- WARD, L.A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. *Diagnostics Microbiology Infection Diseases*, v. 41, p .37–42, 2001.
- WIDMER, G.; LIN, L.; KAPUR, V.; FENG, X.; ABRAHAMSEN, M. S. Genomics and genetics of *Cryprosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. *Microbes and infection*, v. 4. p. 1081-1090. 2002.
- WINTER, G.; GOOLEY, A. A.; WILLIAMS, K. L.; SLADE, M. B. Characterization of a major sporozoite surface glycoprotein of *Cryptosporidium parvum*. *Functional Integrated Genomics*, v. 1, n.1, p. 207-217, 2000.
- XIAO, L., SULAIMAN, I. M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M. L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, L. L. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 1, p.1773–1785, 2002.
- XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appllied Enviromental Microbiology*, v.66, n.12, p.5492-5498, 2000.
- XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R.H.; LAL, A.A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal Infection Diseases*, v. 183, p. 492–7, 2001.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and Implications for public health. *Clinical Microbiological Reviews*, v.17, n.1, p.72-92. 2004 a.

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

XIAO, L.; LAL, A. A.; JINAG, J. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* oocysts in water by PCR-RFLP. *Methods in Molecular Biology*, v.268, p. 163-176. 2004b.

XIAO, L.; LIMOR, J.R.; LI, L.; MORGAN, U.; THOMPSON, R.C.; LAL, A.A. Presence of heterogeneous copies of the small subunit rRNA gene in *Cryptosporidium parvum* human and marsupial genotypes and *Cryptosporidium felis*. *Journal Eukaryotic Microbiology*, v. 46, n. 5:44S-45S., 1999.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* systematics and Implications for Public Health. *Parasitology Today*, v. 16, n. 7, p. 297-295, 2000.

XIAO, L.; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infection Diseases*, v. 17, p. 483–90, 2004.

XIAO, L.; RYAN, U.M.; GRACZYK, T.K.; LIMOR, J.; LI, L.; KOMBERT, M.; JUNGE, R.; SULAIMAN, I.M.; ZHOU, L.; ARROWOOD, M.J.; KOUDELA, B.; MODRÝ, D.; LAL, A.A. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Applied Environmental Microbiology*, n. 2, v.70, p. 891-899, 2004.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in *Veterinary Parasitology*. *Veterinary Parasitology*, v. 101, n. 1, p. 215-230, 2001.

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

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

## ANEXOS

A - Lista das aves exóticas utilizadas no trabalho: nome comum, nome científico, ordem e localidade da coleta das amostras fecais.

| NOME COMUM        | NOME CIENTÍFICO                      | ORDEM          | LOCAL COLETA  |
|-------------------|--------------------------------------|----------------|---|
| Agapornis         | <i>Agapornis sp.</i>                 | Psittaciformes | Zona Oeste<br>Zona Norte<br>Baixada Fluminense<br>Norte do estado |
| Azulão            | <i>Passerina brissonii</i>           | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Bicudo verdadeiro | <i>Oryzoborus maximiliani</i>        | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Bicudo Especial   | <i>Schistochlamys ruficapillus</i>   | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Calafate          | <i>Lonchura paddy oryzivora</i>      | Psittaciformes | Zona Oeste<br>Zona Norte<br>Baixada Fluminense<br>Norte do estado |
| Calopsita         | <i>Nymphicus hollandicus</i>         | Psittaciformes | Zona Oeste<br>Zona Norte<br>Baixada Fluminense<br>Norte do estado |
| Canário –do-reino | <i>Serinus canarius</i>              | Passeriformes  | Norte estado  |
| Canário belga     | <i>Serinus sp.</i>                   | Passeriformes  | Zona Oeste<br>Zona Norte<br>Baixada Fluminense<br>Norte do estado |
| Canário francês   | <i>Serinus sp.</i>                   | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Canário roller    | <i>Serinus sp.</i>                   | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Canária –da-terra | <i>Sicalis flaveola brasiliense</i>  | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Cardeal           | <i>Paroaria coronata</i>             | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Catatal           | <i>Pichochó sporophila frontalis</i> | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Cigarra           | <i>Sporophila falcirostris</i>       | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Codorna chinesa   | <i>Excalfactoria chinensis</i>       | Galliformes    | Norte do estado   |
| Coleira           | <i>Sporophila sp.</i>                | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Coleiro especial  | <i>Sporophila sp.</i>                | Passeriformes  | Norte do estado   |

|                         |  |                |  |
|-------------------------|--|----------------|--|
| Curio                   | <i>Oryzoborus angolensis</i>             | Passeriformes  | Norte do estado  |
| Degolado                | <i>Amadina fasciata</i>                  | Passeriformes  | Norte do estado  |
| Diamante Gold           | <i>Chloebia gouldiae</i>                 | Passeriformes  | Norte do estado  |
| Faisão Branco           | <i>Chrysolophus amherstiae</i>           | Galliformes    | Norte do estado  |
| Faisão canario          | <i>Chrysolophus<br/>rpictus</i>          | Galliformes    | Norte do estado  |
| Faisão coleira          | <i>Phasianus colchius<br/>torquatus</i>  | Galliformes    | Norte do estado  |
| Faisão de coleira anão  | <i>Phasianus colchicus<br/>torquatus</i> | Galliformes    | Norte do estado  |
| Faisão dourado          | <i>Chrysolophus pictus</i>               | Galliformes    | Norte do estado  |
| Faisão prateado         | <i>Lophura nythemera</i>                 | Galliformes    | Norte do estado  |
| Faisão venerado         | <i>Syrmaticus reevesi</i>                | Galliformes    | Norte do estado  |
| Faisão versicóloro      | <i>Phasianus versicolor</i>              | Galliformes    | Norte do estado  |
| Galinha Caipira         | <i>Gallus bankiva</i>                    | Galliformes    | Norte do estado  |
| Galinha sedosa do Japão | <i>Gallus gallus</i>                     | Galliformes    | Norte do estado  |
| Galinho da serra        | <i>Gallus gallus</i>                     | Galliformes    | Norte do estado  |
| Galo                    | <i>Gallus gallus</i>                     | Galliformes    | Norte do estado  |
| Ganso africano          | <i>Anser cygnoides</i>                   | Anseriformes   | Norte do estado  |
| Garibaldi               | <i>Chrysomus ruficapillus</i>            | Passeriformes  | Norte do estado  |
| Jandaia                 | <i>Aratinga solstitialis</i>             | Psittaciformes | Baixada Fluminense<br>Norte do estado                          |
| Mandarim                | <i>Taeniopigya guttata</i>               | Passeriformes  | Norte do estado  |
| Manon                   | <i>Lonchura striata domestica</i>        | Passeriformes  | Zona Oeste<br>Zona Norte<br>Baixada Fluminense<br>Norte estado |
| Jandaia                 | <i>Aratinga jandaia</i>                  | Passeriformes  | Baixada Fluminense<br>Norte do estado                          |
| Marreco carolina        | <i>Anas sponsa</i>                       | Anseriformes   | Norte do estado  |
| Marreco indiano         | <i>Anas poecilorhyncha</i>               | Anseriformes   | Norte do estado  |
| Marreco pequim          | <i>Ana boschas</i>                       | Anseriformes   | Norte do estado  |
| Melro                   | <i>Turdus merula</i>                     | Passeriformes  | Norte do estado  |

|                  |                                |                |   |
|------------------|--------------------------------|----------------|---|
| Periquito        | <i>Melopsittacus undulatus</i> | Psittaciformes | Zona Oeste<br>Zona Norte<br>Baixada Fluminense<br>Norte do estado |
| Papagaio         | <i>Psittacu sp.</i>            | Psittaciformes | Norte do estado   |
| Pato             | <i>Anas platyrhynchos</i>      | Anseriformes   | Zona Norte  |
| Pavão            | <i>Pavo cristatus</i>          | Galiformes     | Norte do estado   |
| Peru             | <i>Meleagris gallopavo</i>     | Galiformes     | Norte do estado   |
| Pombo            | <i>Columba lívia</i>           | Columbiformes  | Norte do estado   |
| Rolinha          | <i>Columbina sp.</i>           | Columbiformes  | Norte do estado   |
| Sabiá laranjeira | <i>Turdus rufiventris</i>      | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Sanhaço          | <i>Thraupis sp.</i>            | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Tico tico        | <i>Zonotrichia capensis</i>    | Passeriformes  | Norte do estado   |
| Tizil            | <i>Volantinia jacarina</i>     | Passeriforme   | Norte do estado   |
| Trinca ferro     | <i>Saltator similis</i>        | Passeriformes  | Norte do estado   |