

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium*
spp. EM CALOPSITAS (*Nymphicus hollandicus*)**

Mariele Fernanda da Cruz Panegossi

Médica Veterinária

ARAÇATUBA - SP

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium*
spp. EM CALOPSITAS (*Nymphicus hollandicus*)**

**Mariele Fernanda da Cruz Panegossi
Orientadora: Prof^a. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani
Coorientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles**

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

ARAÇATUBA - SP

2017

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Panegossi, Mariele Fernanda da Cruz

P192c

Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) / Mariele Fernanda da Cruz Panegossi.

Araçatuba: [s.n], 2017.

39f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2017

Orientadora: Profa. Adjunto: Katia Denise Saraiva Bresciani

Co-orientadora: Prof. Adjunto: Marcelo Vasconcelos Meireles

1. Aves domesticas. 2. Criptosporidiose. 3. Microscopia. 4. Reação em Cadeia da Polimerase I. T.

CDD 636.51



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM CALOPSITAS

TÍTULO: (*Nymphicus hollandicus*)

AUTORA: MARIÉLE FERNANDA DA CRUZ PANEGOSSO
ORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
COORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Unesp


Dra. SANDRA VALÉRIA INÁCIO
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Unesp


Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES
Doutor em Biologia Animal pelo Instituto de Biologia - UNICAMP

Araçatuba, 17 de março de 2017.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Mariele Fernanda da Cruz Panegossi, nascida em Araçatuba, São Paulo em 18 de novembro de 1988. Médica Veterinária graduada pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Campus de Araçatuba, em 2014. Foi Diretora de Recursos Humanos do Grupo de Estudo em Redação Científica Professor Gilson Volpato. Foi Bolsista PIBIC/REITORIA/UNESP de Iniciação Científica, em 2012 e pela Pró-Reitoria De Extensão Universitária da Unesp (PROEX), em 2011. Foi bolsista de Mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

À minha Família, que é o meu bem mais precioso

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal desta instituição, pela possibilidade de realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À minha Orientadora Profa. Katia Denise Saraiva Bresciani por todos os anos de dedicação, ensinamentos, amizade e trabalhos compartilhados.

Ao meu Coorientador Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles pelos ensinamentos e por permitir utilizar o Laboratório de Ornitopatologia para execução desse projeto.

Aos colaboradores desta pesquisa: Bruno César Miranda Oliveira, Walter Bertequini Nagata, Elis Domingos Ferrari, Alex Akira Nakamura e Juliana Calçado Perossi.

Aos tutores e animais envolvidos no estudo, por contribuir com a Metodologia Científica da nossa pesquisa.

À minha família, por ser o maior exemplo de honestidade, compreensão e amor.

Ao meu namorado Lucas, por ser o meu porto seguro.

Em especial, à Deus, pelo dom da vida.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	10
Referências	14
CAPÍTULO 2 - INVESTIGAÇÃO PARASITOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM CALOPSITAS (<i>Nymphicus Hollandicus</i>) DOMICILIADAS.....	20
Introdução.....	21
Material e métodos	22
Resultados.....	25
Discussão	26
Conclusão.....	30
Agradecimentos.....	Erro! Indicador não definido.
Referências	30

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM CALOPSITAS (*Nymphicus hollandicus*)

RESUMO - *Cryptosporidium* spp. é um protozoário que completa seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais do trato gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. Foi incluído na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) por sua estreita relação à população com baixo poder aquisitivo e precárias condições de saneamento básico. Esse gênero de parasito causa doença clínica e subclínica em Psitaciformes, com detecção de *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium galli* e dos genótipos I, II, III, IV e V. A calopsita é um dos psitacídeos mais vendidos atualmente, sendo frequentemente encontrada em residências. O contato próximo com humanos é motivo de preocupação, uma vez que pode ser reservatório desse coccídio intestinal, sendo imprescindível atentar para medidas de prevenção, controle e diagnóstico dessa enfermidade parasitária. Os métodos baseados na microscopia são mais utilizados para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., por serem menos onerosos. No entanto, apenas a caracterização molecular é capaz de identificar a espécie de *Cryptosporidium* spp. Em relação ao tratamento dessa enfermidade em aves, é importante ressaltar que ainda não há quimioterapia efetiva disponível. Boas condições de higiene e saneamento básico são essenciais, a fim de prevenir e controlar surtos dessa enfermidade em humanos e animais.

Palavras-chave: Aves domésticas, Criptosporidiose, Microscopia, Reação em Cadeia da Polimerase

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cryptosporidium* spp. IN COCKATIELS (*Nymphicus hollandicus*)

SUMMARY - *Cryptosporidium* spp. is protozoa that complete their biological cycle on the surface of epithelial cells of the gastrointestinal, respiratory and urinary tract of mammals, birds, reptiles, amphibians and fish. This parasite was included in the World Health Organization's Neglected Diseases Initiative because of its close relationship to the population with low purchasing power and poor basic sanitation conditions. This infection causes clinical and subclinical disease in Psitaciformes with detection of *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium galli* and genotypes I, II, III, IV and V. The cockatiel is one of the best selling psittacines currently found in homes. Close contact with humans is cause for concern, since they may be reservoirs of this coccidia, being essential to watch for measures of prevention, control and diagnosis of this parasitic disease. The methods based on the microscopy are more used for the diagnosis of cryptosporidiosis, because they are less expensive. However, only molecular characterization is able to identify the species of *Cryptosporidium* spp. in relation to the treatment of this disease in poultry, it is important to emphasize that there is still no effective chemotherapy available. Good hygiene and basic sanitation conditions are essential, in order to prevent and control disease in animals and animals.

Keywords: Birds, Cryptosporidiosis, Microscopy, Polymerase Chain Reaction

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Cryptosporidium spp. são parasitos intracelulares obrigatórios pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Cryptosporidiidae (FAYER, 2008). Esse protozoário completa o ciclo biológico em diferentes tipos de células epiteliais, como as do trato gastrointestinal, respiratório e urinário de diversas espécies de animais vertebrados (CHALMERS; KATZER, 2013; KVÁČ et al., 2016), causando doença clínica e subclínica (SANTIN, 2013), podendo ocasionar mortalidade (CHECKLEY et al., 2015).

Inicialmente, o coccídio foi encontrado na mucosa gástrica de um camundongo e denominado *Cryptosporidium muris* (do latim, *Crypto*: ausente, oculto; *Sporidium*: esporo) por não apresentar esporocistos, apenas esporozoítos no interior de oocistos (TYZZER, 1907). Atualmente, há descrições de 30 espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, que acometem aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo o homem (HOLUBOVÁ et al., 2016; LI et al., 2015).

Este protozoário foi incluído na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) por sua estreita relação à população com baixo poder aquisitivo e precárias condições de saneamento básico (SAVIOLI et al., 2006). A quantidade de pessoas infectadas ainda é subestimada, pois não existem dados da prevalência anual da enfermidade no mundo. Portanto, sabe-se que os gêneros de *Cryptosporidium* spp. estão efetivamente presentes em seis continentes e noventa países (YODER et al., 2012).

Em aves, a criptosporidiose geralmente apresenta curso agudo. Esta protozoose acomete diversos Psitaciformes (SRÉTER; VARGA, 2000), com detecção de *Cryptosporidium meleagridis* (SLAVIN, 1955), *Cryptosporidium baileyi* (CURRENT et al., 1986), e *Cryptosporidium galli* (PAVLÁSEK et al., 1999) e dos genótipos I, II, III, IV, V (ABE; MAKINO, 2010; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; SANTOS et al., 2005). Estes últimos, devido à ausência de dados relacionados às suas características biológicas ainda não foram classificados

como espécie, sendo necessário o estabelecimento de parâmetros genéticos e bioquímicos (RYAN et al., 2014).

C. baileyi parasita o epitélio do trato respiratório, sendo considerado como agente primário ou secundário (BLAGBURN et al., 1987) e provavelmente relaciona-se geneticamente com os genótipos I e II (XIAO et al., 2002). As manifestações clínicas são variadas podendo ocasionar desde acúmulo de muco na traqueia, nos pulmões e nos sacos aéreos até dispneia, coriza e eventual mortalidade (RYAN et al., 2003a). Diversas aves já foram afetadas incluindo perus, patos, gansos, calopsitas, codorna marrom, avestruzes, periquitos e falcões e, possivelmente, é a espécie mais comum deste parasito (SRÉTER; VARGA, 2000).

C. galli parece estar associado com doença clínica e alta mortalidade (PAVLA'SEK, 1999; RYAN et al., 2003b), provocando alterações no proventrículo uma vez que o parasito se desenvolve nas células epiteliais deste órgão e não acomete os intestinos e nem o trato respiratório (PAVLAS'EK, 1999). Lesões por este agente foram descritas em passarinhos, galinhas, papagaios, flamingos, pássaros exóticos e selvagens e essa espécie pode relacionar-se com o genótipo aviário IV (RYAN, 2010).

C. meleagridis é responsável por enterite e mortalidade, sendo encontrado no epitélio intestinal e bolsa cloacal (SLAVIN, 1955). Relatos de infecção em perus, papagaios, galinhas e calopsitas foram descritos (MORGAN et al., 2000; SRÉTER; VARGA, 2000), sendo essa espécie parasitária também detectada em humanos (XIAO; FAYER, 2008).

A ocorrência da infecção por *C. meleagridis* no ser humano é semelhante a *C. parvum* (CHALMERS; GILES, 2010; INSULANDER et al., 2013). Estudos que utilizaram a análise filogenética constataram a relação entre os isolados do homem e de aves, demonstrando que *C. meleagridis* possui importância em Saúde Pública (STENSVOLD et al., 2014; WANG et al. 2014).

As calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) pertencem a Ordem dos Psitaciformes e Família Cacatuidae, sendo considerada como animal de estimação e representante da fauna doméstica, e pode ser encontrada em

criatórios e estabelecimentos comerciais (IBAMA, 1998). Com origem na Austrália (DAVES, 1996), elas conquistaram popularidade devido à beleza e docilidade (HETHERINGTON, 2009).

Essa ave de estimação é cada vez mais frequentes em lares humanos. A intensa convivência com pessoas é motivo de preocupação, uma vez que elas podem ser reservatórios de agentes zoonóticos, o que é extremamente grave em termos de Saúde Pública. Assim, é importante a adoção de medidas preventivas, de controle e diagnóstico dessa parasitose.

Em calopsitas, foram detectados no Brasil, *C. galli*, (ANTUNES et al., 2008) e genótipo III de aves (GOMES et al., 2012; NAKAMURA et al., 2009). Os genótipos II e III (NG et al., 2006) e V e III (QI et al., 2011), foram identificados, respectivamente, na Austrália e China.

As formas de transmissão documentadas são de animais para o homem, de pessoa para pessoa, por meio de ingestão hídrica ou água destinada a lazer que são contaminados com resíduos fecais contendo oocistos infectantes (SMITH et al., 2006).

Em relação a sua biologia, são observadas características peculiares que o diferenciam de outros coccídios (TZIPORI; GRIFFTHS, 1998).

Os esporocistos infectantes de *Cryptosporidium* spp. são ingeridos pelo hospedeiro e após exposição ao suco gástrico e enzimas pancreáticas, a excitação ocorre no duodeno com a liberação de esporozoítos, que iniciam a reprodução assexuada (merogonia), com liberação de merozoítos. Esses dão origem aos estádios sexuais, os microgametas e macrogametas, que se unem dando origem ao zigoto, o qual após duas divisões assexuadas formam o oocisto (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008; TZIPORI; GRIFFTHS, 1998).

A esporulação ocorre no interior do hospedeiro com desenvolvimento de quatro esporozoítos. Assim, são formados oocistos de parede delgada (capazes de propiciar a autoinfecção) e de parede espessa (altamente resistentes em condições ambientais e eliminados nas fezes). A infecção geralmente permanece localizada no trato gastrintestinal (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008; TZIPORI; GRIFFTHS, 1998).

Em relação aos métodos parasitológicos, são utilizadas a coloração negativa com Verde Malaquita (ELLIOT et al., 1999), Kinyoun, Ziehl-Neelsen modificado e Centrifugo-flutuação em Solução de Sheather (CURRENT, 1990). Os métodos baseados em microscopia são os mais usados para o diagnóstico de criptosporidiose, por serem menos onerosos e de fácil execução. Embora, essas ferramentas diagnósticas possam fornecer dados sobre a ocorrência do parasito, somente a biologia molecular é capaz de determinar a positividade para o gênero *Cryptosporidium* com posterior sequenciamento para identificação da espécie (RYAN et al., 2014).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. é realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados. O gene mais utilizado para determinação da espécie ou genótipo é o 18S rRNA (RYAN et al., 2014). O gene da 60kDa *glycoprotein* (GP60) é utilizado para subtipagem de *C. meleagridis* em estudos de epidemiologia molecular (STENSVOLD et al., 2014; WANG et al., 2014). Também, pode ser realizada a PCR em tempo real, para diagnóstico específico de *C. galli* e genótipo III de aves (NAKAMURA et al., 2014).

Considerando a variedade de hospedeiros e ciclos de transmissão, juntamente à variação genética entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp., é de fundamental importância a caracterização molecular de isolados brasileiros (MEIRELES, 2010).

Boas condições de higiene e saneamento são ações básicas no controle da criptosporidiose, a fim de prevenir e controlar surtos dessa enfermidade em humanos e animais (RYAN et al., 2016).

OBJETIVOS

Essa pesquisa foi elaborada com o objetivo de realizar a investigação parasitológica e molecular de *Cryptosporidium* spp. em *Nyumphicus hollandicus* mantidas em residências.

REFERÊNCIAS

- ABE, N.; MAKINO, I. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. **Parasitology Research**, v. 106(6), p. 1491-1497, 2010.
- 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(4), p. 702-705, 2008.
- BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S.; GIAMBRONE, J.; SUNDERMANN, C.A.; HOERR, F.J. **Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens**. *Poult. Sci.*, v. 66, p. 442-449, 1987.
- CHALMERS, R.M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK - challenges for control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109(5), p. 1487-1497, 2010.
- CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 5, p.237-251, 2013.
- CHECKLEY, W.; WHITE, A.C. JR; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M.J.; CHALMERS, R.M.; CHEN, X.M.; FAYER, R.; GRIFFITHS, J.K.; GUERRANT, R.L; HEDSTROM, L; HUSTON, C.D.; KOTLOFF, K.L.; KANG, G.; MEAD, J.R.; MILLER, M.; PETRI, WA JR.; PRIEST, J.W.; ROOS, D.S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R.C.; WARD, H.D.; VAN, VOORHIS WA; XIAO L, ZHU G; HOUPPT E.R. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. **The Lancet Infectious Diseases**, v 15, p. 85–94, 2015.
- CURRENT, W.L.; UPTON, S.J.; HAYNES, T.B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s.(Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **The Journal of Protozoology**, v. 33(2), p. 289-296, 1986.

CURRENT, W. L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 59-82.

DAVES, C. Common Types of Caged Birds and Comments on Their Temperaments and Pet Quality. **Diseases of Cage and Aviary Birds**, p.14, 1996.

ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p. 139-142, 1999.

FAYER, R. General Biology. In: Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. Boca Raton: CRC; p. 1-42, 2008.

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

HETHERINGTON, M. **JOHN GOULD'S BIRDS OF AUSTRALIA**. Disponível em: <http://www.nla.gov.au/collect/treasures/apr_treasure.html>. Acesso em 12 de novembro de 2016.

IBAMA. Portaria IBAMA Nº 93, de 7 de julho de 1998. Dispõe sobre Fauna Doméstica: Todos aqueles animais que através de processos tradicionais e sistematizados de manejo e/ou melhoramento zootécnico tornaram-se domésticas, apresentando características biológicas e comportamentais em estreita dependência do homem, podendo apresentar fenótipo variável, diferente da espécie silvestre que os originou. Disponível em: <<http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/042200.htm>> Acesso em 12 de novembro de 2016

INSULANDER M, SILVERLÅS C, LEBBAD M, KARLSSON L, MATTSSON JG, SVENUNGSSON B. Molecular epidemiology and clinical manifestations of

human cryptosporidiosis in Sweden. **Epidemiology and Infection**, v.141, n. 5, p. 1009-1020, 2013.

KVÁČ, M.; HAVRDOVÁ, N.; HLÁSKOVÁ, L.; DAŇKOVÁ, T.; KANDĚRA, J.; JEŽKOVÁ, J.; VÍTOVEC, J.; SAK, B.; ORTEGA, Y.; XIAO, L.; MODRÝ, D.; CHELLADURAI, J.R.J.J.; PRANTLOVÁ, V.; McEVOY, J. *Cryptosporidium* proliferans n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric **Cryptosporidium** of mammals. **PLoS One**, v.11, n.1, p.1-24, 2016.

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

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

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

MORGAN, U.M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A.A.; THOMPSON, R.C.A. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v. 29, 1733-1751, 2000.

NAKAMURA, A.A.; HOMEM, C.G.; DA SILVA, A.M.J.; MEIRELES, M.V. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. **Veterinary Parasitology**, v. 205(1-2), p. 7-13, 2014.

NAKAMURA, A.A.; SIMÕES, D.C.; ANTUNES, R.G.; DA SILVA, D.C.; MEIRELES, M.V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 47-51, 2009.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7548-7553, 2006.

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

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

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

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

RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A.A.; PAVLASEK, I. Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69 (7), p. 4302-4307, 2003b.

RYAN, A.; ZAHEDI, A.; PAPARINI, A. **Parasite Immunology**, v 38(9), p 523–586, 2016.

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

SANTIN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61(1), p. 1-10, 2013.

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

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “neglected diseases initiative”. **Trends in Parasitology**, v.22, p.203-208, 2006.

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

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v.22, p.161-167, 2006.

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

STENSVOLD, C.R.; BESER, J.; AXEN, C.; LEBBAD, M. High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52 (7), p. 2311-2319, 2014.

THOMPSON, R.C.A.; PALMER, C.S.; O’HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 18-25, 2008.

TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.

TZIPORI, S.; GRIFFITHS, J.K. Natural History and Biology of *Cryptosporidium parvum*. **Advances in Parasitology**, v. 40, p. 5-36, 1998.

WANG, Y.; YANG, W.; CAMA, V.; WANG, L.; CABRERA, L.; ORTEGA, Y.; BERN, C.; FENG, Y.; GILMAN, R.; XIAO, L. Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: evidence for cross-species transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 44 (8), p. 515-521, 2014.

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

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

YODER, J.S.; WALLACE, R.M.; COLLIER, S.A.; BEACH, M.J.; HLAVSA, M.C. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cryptosporidiosis surveillance – United States, 2009-2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries**, v.61, p.1-12, 2012.

CAPÍTULO 2 - INVESTIGAÇÃO PARASITOLÓGICA E MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM CALOPSITAS (*Nymphicus Hollandicus*) DOMICILIADAS

RESUMO - As calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) estão entre os psitacídeos mais vendidos atualmente como animal de companhia. Devido ao estreito contato com humanos, é imprescindível atentar para medidas de prevenção, controle e diagnóstico desse parasito potencialmente zoonótico. Em aves, a infecção por *Cryptosporidium* spp. pode ser assintomática ou apresentar manifestações clínicas como diarreia e mortalidade, sendo que as espécies detectadas são *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium galli* e os genótipos I, II, III, IV e V. O nosso objetivo foi realizar a investigação parasitológica e molecular de *Cryptosporidium* spp. em *Nymphicus hollandicus* mantidas em residências. Para isso, foram colhidas 100 amostras fecais de calopsitas de ambos os sexos, com idade a partir de dois meses, domiciliadas na zona urbana do Município de Araçatuba, São Paulo. Questionários em forma de entrevistas foram aplicados aos tutores, sendo os mesmos compostos por perguntas relacionadas ao manejo de seus respectivos animais. Por meio das duas técnicas utilizadas em nosso estudo, foi detectada a ocorrência de 11% para *Cryptosporidium* spp., sendo observada positividade apenas em calopsitas adultas. O coccídio foi positivo em 8%, por meio da detecção microscópica, e 9% na Reação em Cadeira da Polimerase (*Nested-PCR*). Em relação às variáveis estudadas não foram notadas associações significativas entre elas ($p > 0,05$). Após o sequenciamento dos fragmentos amplificados, foi identificado o *Cryptosporidium* genótipo III de aves em cinco animais. Assim, constatamos por meio das técnicas supramencionadas, a ocorrência desse agente em calopsitas exclusivamente domiciliadas.

Palavras-chave: Aves, Criptosporidiose, Microscopia, Reação em Cadeira da Polimerase, Verde Malaquita.

Introdução

Parasitas intracelulares obrigatórios do gênero *Cryptosporidium* spp. são protozoários com capacidade de se desenvolver nas microvilosidades das células do epitélio gastrintestinal, respiratório e urinário de hospedeiros vertebrados (CHALMERS; KATZER, 2013; XIAO et al., 2004). Atualmente, há descrições de 30 espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, que acometem aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo o homem (HOLUBOVÁ et al., 2016; LI et al., 2015).

Em aves, a infecção por *Cryptosporidium* spp. pode ser assintomática ou apresentar manifestações clínicas como diarreia e mortalidade (SANTIN, 2013), sendo que as espécies detectadas são *Cryptosporidium meleagridis* (SLAVIN, 1955), *Cryptosporidium baileyi* (CURRENT et al., 1986), e *Cryptosporidium galli* (PAVLÁSEK et al., 1999) e dos genótipos I, II, III, IV, V (ABE; MAKINO, 2010; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; SANTOS et al., 2005).

As calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) pertencem a Ordem dos Psitaciformes e Família Cacatuidae, sendo considerada como animal de estimação e representante da fauna doméstica, e pode ser encontrada em criatórios e estabelecimentos comerciais (IBAMA, 1998). Com origem na Austrália (DAVES, 1996), essas aves conquistaram popularidade devido à beleza e docilidade (HETHERINGTON, 2009).

As calopsitas são aves de companhia cada vez mais frequentes em lares humanos. Essa intensa convivência é motivo de preocupação, uma vez que elas podem ser reservatórios de agentes zoonóticos, o que é extremamente grave em termos de Saúde Pública. Assim, é importante a adoção de medidas preventivas, de controle e diagnóstico do parasito.

Considerando a importância dessas aves para seus tutores e também devido à escassez da literatura especificamente em relação a infecção por *Cryptosporidium* spp. em calopsitas domiciliadas, o nosso objetivo foi realizar a investigação parasitológica e molecular de *Cryptosporidium* spp. em *Nymphicus hollandicus* mantidas em residências.

Material e métodos

Aprovação do Comitê de Ética

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária UNESP, Campus de Araçatuba, em 15 de Abril de 2015, Processo FOA nº 2015-00358

Cálculo amostral

A amostragem mínima necessária para a execução deste projeto, no nível de confiança de 95% e com precisão absoluta de 10%, foi calculada em 96 amostras, usando uma proporção populacional de 50%, uma vez que não existem conhecimentos prévios sobre a mesma (LWANGA; LEMESHOW, 1991).

População de estudo

Neste estudo foram utilizadas 100 calopsitas domiciliadas, sendo 30 machos, 27 fêmeas e 43 sem gênero definido. Em relação à faixa etária 11 eram jovens (< de 12 meses), 89 adultos (>12 meses). Considerando a procedência, havia 50 aves de criadores, 29 de *petshops* e 21 com origem desconhecida.

Questionário epidemiológico

Informações sobre cada ave foram obtidas por meio da aplicação de um questionário epidemiológico (anexo), em forma de entrevista aos tutores. Este era composto por perguntas como procedência, gênero, alterações gastrintestinais, água de bebida, frequência de higienização das gaiolas, uso de produtos de limpeza, presença de fômites, uso de EPI (Equipamento de Proteção Individual), descarte do material fecal e manejo nutricional adotado. Todos os entrevistados assinaram o termo de livre consentimento, autorizando o uso das suas aves para o estudo em questão, sendo que a colheita das fezes foi realizada por conveniência.

Colheita e processamento das amostras fecais

Amostras individuais foram obtidas de 57 calopsitas e 43 *pools* (duas a quatro aves), sendo este procedimento realizado em três dias alternados. Esse material foi colhido do fundo da gaiola, com auxílio de uma espátula de madeira descartável e, posteriormente, transferido para um microtubo de 2 mL, sem conservantes e armazenado a 4° C.

Inicialmente as amostras fecais foram homogeneizadas com solução de Sheather modificada, preparada com Tampão Fosfato Salino (PBS) e Tween 20 na concentração de 0,1%. O sobrenadante foi submetido a lavagens com solução de PBS com Tween 20 a 0,1% e 0,01%, respectivamente, resultando em *pellets* que foram adicionados de formol a 10% quando para uso na microscopia e, congelados a -20°C quando para extração de DNA (ácido desoxirribonucleico).

Neste estudo, foi realizada a investigação microscópica por meio da coloração negativa com Verde Malaquita (ELLIOT et al., 1999), para observação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Para a Reação em Cadeia da Polimerase (*Nested-PCR*) foi feito um *pool* dos três dias de colheita. Nesta reação, foi executada a amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do rRNA (ácido ribonucleico ribossômico), para detecção de *Cryptosporidium* spp., seguida da identificação da espécie por sequenciamento do fragmento amplificado.

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com utilização do QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. A técnica molecular foi iniciada após descongelamento do DNA no termomixer a 56°C, por 10 minutos.

Caracterização molecular

Para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do rRNA foi utilizada a técnica de nPCR, com os primers 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' e 5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3' para a reação primária, com 1325 pares de base (pb) e 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' e 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' para a reação secundária (826-840 pb). Para realização das seguintes condições de reação, foi preparada uma solução com volume final de 25µL contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10 x , 2,5 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nM de cada primer e 5 µL de DNA na reação primária e 2,5 µL na secundária. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação por 45 segundos a 94° C, 45 segundos de anelamento a 55°C e 60 segundos de extensão a 72° C, com extensão final a 72°C por 7 minutos (XIAO et al., 2000). O DNA genômico de *Cryptosporidium serpentis* e água ultrapura, foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed® (Biotium) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

Reação de sequenciamento

Os fragmentos amplificados (~830 bp), resultantes da reação secundária da nPCR foi purificado com o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) e submetidos ao sequenciamento com utilização do ABI Prism® Dye Terminator Cycling Sequence kit (Applied Biosystems®) em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram feitas nas duas direções, com os primers iniciadores da reação secundária. Para determinação da sequência consenso foi utilizado o software Codon code Aligner versão 4.0.1 (Codon Code Corporation Dedham®, MA, USA). O alinhamento das sequências consensos dos fragmentos amplificados pela nPCR foi feito com o

auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no GenBank.

Análise estatística

As amostras foram consideradas positivas para o *Cryptosporidium* spp. por meio da técnica de coloração negativa com Verde Malaquita e/ou pela nPCR.

A análise dos dados constituiu-se de estatística descritiva, análise inferencial (Teste exato de Fisher) para verificar associação entre a presença e ausência do referido patógeno com cada uma das variáveis estudadas presentes no questionário. O coeficiente de correlação Kappa foi calculado para analisar o índice de concordância entre os resultados obtidos nos métodos empregados, e o Teste de McNemar para comparar a proporção de resultados positivos das técnicas realizadas. O banco de dados foi criado com o Microsoft Office Excel 2010 e o Software utilizado foi o Bioestat 5.0, sendo as estatísticas consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Por meio das duas técnicas usadas em nosso estudo, foi observada a ocorrência de 11% para *Cryptosporidium* spp., sendo observada positividade apenas em calopsitas adultas. O coccídio foi positivo em 8%, por meio da detecção microscópica, e 9% na nPCR. Não houve associação significativa entre as duas técnicas diagnósticas e as variáveis envolvidas no estudo ($p > 0,05$).

As amostras fecais examinadas na microscopia foram positivas nos três dias de colheita alternados.

Considerando alterações gastrintestinais, sete aves apresentaram diarreia, e destas duas foram positivas para *Cryptosporidium* spp. Nenhuma das calopsitas tiveram manifestações respiratórias aparentes.

Em relação à higienização das gaiolas, 57 tutores efetuavam a limpeza das mesmas diariamente, e destes oito utilizavam detergentes, desinfetantes ou

sabões assim como esponjas. Entre os 43 proprietários que realizam este procedimento semanalmente, 10 usavam esses produtos supracitados para limpeza. Apenas um tutor afirmou colocar máscara e luva ao manusear as fezes dos animais, e todos descartavam esse material em lixo comum.

Em relação à alimentação, 52 calopsitas ingeriam verduras, frutas e legumes, 17 apenas ração peletizada, 14 consumiam sementes e ração peletizada e 17 todas as opções mencionadas. Um total de 84, 14 e duas aves tiveram como fonte de bebida, água de torneira, filtrada e mineral, respectivamente, sendo que todas as aves positivas para o parasito bebiam água de torneira.

O coeficiente de correlação Kappa demonstrou boa concordância (Kappa = 0,7286) entre as técnicas parasitológica e molecular (PEREIRA, 2001), sendo seis aves positivas para o protozoário em ambas. No teste de McNemar não houve diferença significativa entre a proporção de resultados positivos da microscopia e nPCR ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Os produtos dos primers iniciadores (P3 e P4) do gene 18S rRNA, sequenciados das cinco amostras positivas na nPCR para *Cryptosporidium* spp. revelaram *Cryptosporidium* genótipo III de aves com 100% de identidade entre si e altos graus de identidade com sequências previamente publicadas no GenBank. As amostras de *Cryptosporidium* genótipo III de aves encontradas apresentaram identidade de 100% com aquelas encontradas no Brasil (GU074385), na China (HM116385) e Japão (AB471641).

Discussão

A infecção por *Cryptosporidium* spp. foi detectada tanto por meio da técnica microscópica como pela molecular em *Nymphicus hollandicus* domiciliadas, com positividade diagnóstica para o *Cryptosporidium* genótipo III de aves nas calopsitas positivas.

Este é o primeiro estudo em que foi examinado um número significativo de calopsitas em convívio com serem humanos em residências, com base no

cálculo da amostragem mínima necessária (LWANGA; LEMESHOW, 1991). Devido a essas aves serem domiciliadas, a idade das mesmas era conhecida, assim como o gênero, na maioria dos casos, e isto possibilitou verificarmos a associação com essas variáveis.

Adicionalmente, pesquisamos se o protozoário estava sendo eliminado em dias alternados, com intuito de elucidar esse parâmetro diagnóstico. Nós observamos na microscopia que as amostras fecais das calopsitas foram positivas nos três dias alternados de colheita. Em suínos já foi verificado que a excreção parasitária fecal ocorreu em um determinado momento, ou seja, apenas na primeira ou segunda colheita (MATOS et al., 2016).

Nós observamos a ocorrência de 11% para este parasito, não sendo possível tecer comparações com estudos prévios, em que foram utilizados um número menor de calopsitas. A positividade para *Cryptosporidium* spp. evidenciada por ambos os métodos em nosso estudo é compatível com a esperada em psitacídeos de maneira geral, com uso da microscopia e técnica molecular (NAKAMURA et al., 2009).

Pesquisas com calopsitas efetuadas até o momento, utilizaram a nPCR para detecção do parasito supramencionado, em diferentes países como Austrália (NG et al., 2006), Japão (ABE & MOTOHIRO, 2004; ABE & MAKINO 2010), China (QI et al., 2011) e Brasil (GOMES et al., 2012; NAKAMURA et al., 2009). Porém, as aves nesses estudos não eram mantidas exclusivamente em residências e o número amostral das mesmas em todos os estudos, era inferior ao colhido no presente trabalho.

Em nossa pesquisa, verificamos que as calopsitas adultas apresentaram maior ocorrência da infecção criptosporídica tanto pela microscopia, como pela nPCR. Em aves, o genótipo III tem sido associado, principalmente, a infecções nesta faixa etária (SILVA et al., 2010), sendo citado como responsável por enfermidade gástrica crônica (MAKINO et al., 2010).

Em relação à procedência das calopsitas positivas, oito vieram de criatório, duas de *petshop* e uma a origem era desconhecida. Esses estabelecimentos comerciais que foram responsáveis pela venda dos mesmos

deveriam realizar exames parasitológicos das fezes nas aves antes da compra pelos tutores, visto que as calopsitas infectadas podem transmitir o protozoário para aves saudáveis.

Duas das sete calopsitas com diarreia foram positivas para o parasito. Essa alteração gastrointestinal é frequente, além de emagrecimento, anorexia e vômito crônico (MAKINO et al., 2010; RAVICH et al., 2014). No entanto, essa infecção pode ser assintomática (SILVA et al., 2010) o que justifica a positividade sem esse sinal clínico em nossa pesquisa. Também, não se pode afirmar que o *Cryptosporidium* spp. é o responsável por essa infecção entérica, sendo possível nesses casos a presença concomitante de outros agentes.

Apenas um tutor relatou usar EPI para limpar as gaiolas e 43 deles disseram realizar essa prática semanalmente. O recolhimento do material fecal deve ser feito com frequência, preferencialmente, com proteção ou posterior higienização das mãos, sabendo que os oocistos são resistentes em condições ambientais (BARTA; THOMPSON, 2006; KING et al., 2008) e as formas de transmissão documentadas são de animais parasitados para o homem, por meio da ingestão acidental de resíduos fecais com a presença de oocistos infectantes (RYAN et al., 2014).

A utilização de fômites, como buchas, para remoção de resíduos das gaiolas pode propiciar a transmissão mecânica de oocistos deste parasito. Por sua vez, a higienização com produtos de limpeza não é efetiva, visto que o protozoário é extremamente resistente à ação do cloro (XIAO et al., 2004).

No ambiente, os oocistos são sensíveis à dessecação, ao congelamento e às temperaturas de 55°C/30 segundos ou 70°C/5 segundos (FUJINO et al., 2002), podendo assim permanecer viáveis no ambiente por um período de três meses, em temperaturas variando de 25-30°C, seis meses em temperatura de 20°C, ou por sete meses a 15°C (FAYER et al., 1998).

A ausência de higienização adequada dos utensílios utilizados pela ave infectada colabora para que a mesma continue ingerindo oocistos fecais presentes em comedouro e bebedouro, visto que a mesma pode defecar nesses locais, favorecendo a reinfecção.

As buchas utilizadas na limpeza das bandejas eram usadas também para a higienização de bebedouros e comedouros, o que pode representar um risco para a transmissão mecânica de *Cryptosporidium* spp.

Todas as aves positivas bebiam água da torneira. Em nosso estudo, 84 tutores mencionaram que a fonte de água de bebida das calopsitas era esta, sendo que a veiculação hídrica representa um importante papel como via de transmissão para diversos agentes biológicos, em especial, o *Cryptosporidium* spp. (KING et al 2015). Oocistos deste protozoário foram detectados por métodos moleculares e imunológicos em água de torneira que abastecia residências na Região Centro-Oeste do Brasil (SANTOS et al., 2016).

Além dos cuidados com a qualidade da água, é preciso atentar-se para o compartilhamento de bebedouros com outras aves infectadas, visto que este fato favorecerá a contaminação hídrica.

Hortaliças, eventualmente, podem ser irrigadas com água contaminada com fezes contendo oocistos do parasito, ou originada de locais com precárias condições de saneamento básico (MCEVOY et al., 2003). Entre as calopsitas positivas, a maioria ingeria com frequência alface, tomate e cenoura, sendo que já foi detectado *Cryptosporidium parvum* nesses alimentos (RAHMAN et al., 2014). Com isso, vegetais a serem oferecidos às aves, devem ser devidamente higienizados e de procedência idônea.

Duas amostras foram positivas apenas na análise parasitológica, sendo verificada baixa quantidade de oocistos (de dois a cinco por lâmina), sendo que isso foi observado nos três dias de colheita. O resultado negativo da nPCR pode ser justificado, em parte, devido à baixa quantidade de DNA presente nessas amostras, com isso, houve pouca amplificação dos fragmentos. Outra possibilidade a ser considerada é a existência de inibidores da PCR em DNA extraído de fezes (SCHRADER et al., 2012).

A quantidade de 10 µL utilizada na confecção da lâmina pode ter sido insuficiente para capturar os poucos oocistos presentes no material purificado, e esta pode ser a explicação para a observação de amostras negativas na microscopia.

Estudos epidemiológicos e moleculares em aves de estimação são necessários para esclarecer a variedade genética das espécies de *Cryptosporidium* spp., sendo preciso ainda elucidar o potencial zoonótico dos genótipos desse protozoário que infectam psitacídeos. Também, contribuem para a implantação de programas de controle da enfermidade em calopsitas.

Conclusão

Nós constatamos a infecção por *Cryptosporidium* genótipo III de aves em calopsitas em convívio com seres humanos, tanto por meio da investigação microscópica como pela molecular.

Referências

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

ABE, N.; MOTOHIRO, I. Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. **Parasitology Research**, v. 92, p. 523-526, 2004.

BARTA, J. R.; THOMPSON, R. C. A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 29, p.237-251, 2013.

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

DAVES, C. Common Types of Caged Birds and Comments on Their Temperaments and Pet Quality. **Diseases of Cage and Aviary Birds**, p.14, 1996.

ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p. 139-142, 1999.

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

FAYER, R. General Biology. In: Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Boca Raton: CRC*; p. 1-42, 2008.

FUJINO, T.; MATSUI, T.; KOBAYASHI, F.; HARUKI, K.; YOSHINO, Y. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **Journal of Veterinary Medical Science**, v 64, p. 199-200, 2002.

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

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

HETHERINGTON, M. **JOHN GOULD'S BIRDS OF AUSTRALIA**. Disponível em: <http://www.nla.gov.au/collect/treasures/apr_treasure.html>. Acesso em 12 de novembro de 2016.

HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; HORČIČKOVÁ, M.; HLÁSKOVÁ, L.; KVĚTOŇOVÁ, D.; MENCHACA, S.; McEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. **Parasitology Research**, v.115, p. 2243-2251, 2016.

IBAMA. Portaria IBAMA Nº 93, de 7 de Julho de 1998. Dispõe sobre Fauna Doméstica: Todos aqueles animais que através de processos tradicionais e sistematizados de manejo e/ou melhoramento zootécnico tornaram-se domésticas, apresentando características biológicas e comportamentais em estreita dependência do homem, podendo apresentar fenótipo variável, diferente da espécie silvestre que os originou. Disponível em: <<http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/042200.htm>> Acesso em 12 de novembro de 2016

KING, B.; FANOK, S.; PHILLIPS, R.; SWAFFER, B.; MONIS, P.; Integrated *Cryptosporidium* assay to determine oocyst density, infectivity, and genotype for risk assessment of source and reuse water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 3471–3481, 2015

KING, B. J.; HOEFEL, D.; DAMINATO, D. P.; FANOK, S.; MONIS, P. T. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 1311-1323, 2008.

LI, X.; PEREIRA, M.G.C.; LARSEN, R.; XIAO, C.; PHILLIPS, R.; STRIBY, K.; McCOWAN, B.; ATWILL, E.R. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus ground squirrel* species. **Internacional Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.4, p.343-350, 2015.

LWANGA, S.K; LEMESHOW, S. Sample size determination in health studies: a practical manual. Geneva: World Health Organization, 1991. 80p.

MATOS, D. J.; MEIRELES, M. V.; COELHO, W.M.D.; BRESCIANI, K. D. S. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in pigs at weaning. **Semina: Ciências Agrárias Londrina**, v. 37, n. 6, p. 4157-4160, 2016.

MAKINO, I.; ABE, N.; REAVILL, D.R. *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). **Avian Diseases**, v. 54, n.3, p. 1102-1107, 2010.

McEVOY, J.M.; MORIATY, E.M.; DUFFY, G.; SHERIDAN, J.J.T. Contamination of Fresh Vegetables with *Cryptosporidium* oocysts in markets within Zaria metropolis, Kaduna State, Nigeria. **Food Control**, v 31, p. 45-48, 2003.

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

NAKAMURA, A.A.; SIMÕES, D.C.; ANTUNES, R.G.; DA SILVA, D.C.; MEIRELES, M.V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 47-51, 2009.

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

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7548-7553, 2006.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.596p.

QI, M.; WANG, R.; NING, C.; LI, X.; ZHANG, L.; JIAN, F.; SUN, Y.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds. **Genetic Diversity and Potential Public Health Significance**, v. 128, p. 336-340, 2011.

RAHMAN, J.; TALUKDER, A. I.; HOSSAIN, F.; MAHOMUD, S.; ISLAM, A.; SHAMSUZZOH, A. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in commonly consumed fresh salad vegetables. **American Journal of Microbiological Research**, v. 2, n. 6, p.224-226, 2014.

RAVICH, M.L.; REAVILL, D.R.; HESS, L.; CHILDRESS, A.L.; WELLEHAN Jr, J.F.X. Gastrointestinal cryptosporidiosis in captive psittacine birds in the United

States: A case review. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 28, n. 4, p. 297-303, 2014.

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

SANTOS, S. F. O.; SILVA, H. D.; WOSNJUK, L. A. C.; ANUNCIAÇÃO, C. E.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; PERALTA, R. H. S.; CUNHA, F. S.; FERREIRA, T. D.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Occurrence and Evaluation of Methodologies to Detect *Cryptosporidium* spp. in Treated Water in the Central-West Region of Brazil. **Expo Health**, v.8, p.117-123, 2016.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p. 1014-1026, 2012.

SANTIN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, p. 1-10, 2013.

SILVA, D.C.; HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; TEIXEIRA, W.F.; PERRI, S.H.; MEIRELES, M.V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. **Parasitology Research**, v. 107, p. 271-277, 2010.

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

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

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

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

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

ANEXO

Nº

Data:

QUESTIONÁRIO

1) Procedência

() pet shop

() Criador

() Outro(a) :

2) Sexo: () Macho () Fêmea () Não sabe

3) Idade:

4) Quadros esporádicos de diarreia:

() Sim Qual a coloração?

() Não

5) Manifestação respiratória (tosse, espirros, secreções nasais)

() Sim

() Não

6) Utilização de jornal (fezes)

() Sim destino do jornal : Lixo comum () Outro:

() Não

7) Manuseia o jornal :

() Com luva e com máscara

() Luva

() Máscara

() Sem luva e sem máscara

8) Frequência com que limpa a gaiola: () Diariamente () Semanalmente

() Mensalmente

9) Usa produto para limpeza da gaiola : Não () Sim () Qual:

10) Fonte de Água

() Torneira

() Filtrada

Mineral

11) Alimentação

Sementes

Ração própria para calopsita

Frutas: Sim Não

Verduras: Sim Não

Legumes: Sim Não

Outro (a):

Eu,
para fins de estudos científicos.

autorizo a utilização das fezes deste animal