

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

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
***Cryptosporidium* spp. EM CANÁRIOS (*Serinus Canaria*)**
MANTIDOS EM CATIVEIRO POR MEIO DE DIFERENTES
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Vinícius da Silva Camargo
Biólogo

ARAÇATUBA – SP
2017

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

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
***Cryptosporidium* spp. EM CANÁRIOS (*Serinus Canaria*)**
MANTIDOS EM CATIVEIRO POR MEIO DE DIFERENTES
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Vinícius da Silva Camargo

Orientador: Prof.º. Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles

Coorientador : Prof. Dr.º. Alex Akira Nakamura

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

ARAÇATUBA – SP
2017

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

Camargo, Vinícius da Silva

C172d

Detecção e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em canários (*Serinus canaria*) mantidos em cativeiro por meio de diferentes métodos de diagnóstico / Vinícius da Silva Camargo. Araçatuba: [s.n], 2018. 41f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2018

Orientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles
Coorientador: Prof. Dr. Alex Akira Nakamura

1. Aves. 2. Criptosporidiose. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Epidemiologia I. T.

CDD 636.6



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Detecção e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em canários (*Serinus canaria*) mantidos em cativeiros por meio de diferentes métodos de diagnóstico

AUTOR: VINICIUS DA SILVA CAMARGO
ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES
COORIENTADOR: ALEX AKIRA NAKAMURA

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

Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. SERGIO DINIZ GARCIA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Dr. WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA
Doutor em Medicina Veterinária Preventiva pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal / Unesp

Araçatuba, 15 de dezembro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR51.

Vinícius da Silva Camargo– Araçatuba - SP, 09 de junho de 1988. Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Paulista – UNIP, no ano de 2011. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA/ Unesp, Campus de Araçatuba – SP, em março de 2016, sob orientação do Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles. Bolsista CAPES de abril de 2016 a março de 2017.

EPIGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”
Martin Luther King

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Elenice e Arnaldo
que sempre me incentivaram e não
mediram esforços para que meu
sonho fosse realizado**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que sou e que venho me tornando.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, orientador deste trabalho, pelos seus conhecimentos a mim transmitidos, sua paciência e dedicação, sua atenção e boa vontade.

Ao Prof. Dr. Alex Akira Nakamura pela coorientação.

Aos meus pais, José Arnaldo e Elenice, por todo incentivo e apoio nessa etapa de minha vida.

A minha avó Wilma, que esteve sempre ao meu lado, não apenas durante o mestrado, mas a vida toda me auxiliando com muito carinho e amor.

A Maysa, que esteve sempre me apoiando nas etapas mais difíceis e, com amor e paciência, sempre me apoiou, incentivou e auxiliou, direta e indiretamente.

A todos aqueles a quem posso verdadeiramente chamar de amigos, dentro e fora do ambiente de trabalho, os quais estiveram comigo em todos os momentos dessa trajetória, fazendo o caminho mais leve.

Aos meus colegas de laboratório Bruna, Elis, Juliana e Isabela e colaboradores do laboratório que, mesmo em pequenos detalhes, fizeram grande diferença para o resultado final deste trabalho.

A Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA /UNESP, pela estrutura e suporte.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro ao projeto realizado (2015/26334-8) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
1 Introdução.....	12
2 Criptosporidiose em aves.....	13
3 Criptosporidiose no ser humano.....	14
4 Diagnóstico.....	17
5 Tratamento e Profilaxia.....	18
OBJETIVOS GERAIS.....	18
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2- ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
1 Introdução.....	27
2 Material e Métodos.....	28
3 Resultados e Discussão.....	32
4 Conclusão.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM CANÁRIOS (*Serinus canaria*) MANTIDOS EM CATIVEIRO POR MEIO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

RESUMO – Este trabalho teve como objetivos determinar a ocorrência e realizar a caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. e comparar três métodos de detecção deste protozoário em amostras fecais de canários (*Serinus canaria*) criados em cativeiro nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Um total de 498 amostras foi purificado por centrífugo-flutuação em solução de Sheather. A detecção de *Cryptosporidium* spp. foi realizada utilizando três métodos de diagnóstico: análise microscópica pela coloração negativa com verde malaquita, nested PCR (gene 18S rRNA), seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados, e PCR em duplex em tempo real (gene 18S rRNA) específica para detecção de *Cryptosporidium galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves. A positividade para *Cryptosporidium* spp. (total de amostras positivas em pelo menos um método de diagnóstico) obtida pela análise microscópica, nested PCR e PCR duplex em tempo real foi de 13,3% (66/498). As taxas de positividade para *Cryptosporidium* spp. foram 2,0% (10/498) e 4,6% (23/498) por microscopia e nested PCR, respectivamente. O sequenciamento de 20 amostras amplificadas pela nested PCR identificou *C. galli* (3,0%;15/498), *Cryptosporidium* genótipo I de aves (0,8%; 4/498) e *Cryptosporidium avium* (0,2%; 1/498). A PCR duplex em tempo real revelou positividade de 7,8% (39/498) para *C. galli* e 2,4% (12/498) para *Cryptosporidium* genótipo III de aves. A análise microscópica diferiu significativamente da nested PCR para detecção de *Cryptosporidium* spp. A PCR duplex em tempo real apresentou maior sensibilidade que a nested PCR/sequenciamento para detectar as espécies/genótipos gástricos de *Cryptosporidium*.

Palavras-chave: Criptosporidiose, aves, Reação em cadeia da Polimerase, epidemiologia.

**DETECTION AND CHARACTERIZATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
IN CANARIES (*SERINUS CANARIA*) KEPT IN CAPTIVITY USING
DIFFERENT DIAGNOSIS METHODS**

SUMMARY- This study used several diagnostic methods to examine the occurrence of and molecularly characterize *Cryptosporidium* spp. in captive canaries (*Serinus canaria*) in southern and southeastern Brazil. A total of 498 samples were purified by centrifugal-flotation using Sheather's solution. *Cryptosporidium* spp. diagnosis was performed using three diagnostic methods: malachite green negative staining, nested PCR targeting the 18S rRNA gene, followed by sequencing the amplified fragments, and duplex real-time PCR targeting the 18S rRNA specific to detect *Cryptosporidium galli* and *Cryptosporidium* avian genotype III. The overall positivity for *Cryptosporidium* spp. (total samples positive in at least one protocol) from the microscopic analysis, nested PCR and duplex real-time PCR protocol results was 13.3% (66/498). The positivity rates were 2.0% (10/498) and 4.6% (23/498) for *Cryptosporidium* spp. by microscopy and nested PCR, respectively. Sequencing of 20 samples amplified by nested PCR identified *C. galli* (3.0%; 15/498), *Cryptosporidium* avian genotype I (0.8%; 4/498) and *Cryptosporidium avium* (0.2%; 1/498). Duplex real-time PCR revealed a positivity of 7.8% (39/498) for *C. galli* and 2.4% (12/498) for avian genotype III. Malachite green negative staining differed significantly from nested PCR in detecting *Cryptosporidium* spp.. Duplex real-time PCR was more sensitive than nested PCR/sequencing for detecting gastric *Cryptosporidium* in canaries.

Key-words: Birds, cryptosporidiosis, Polymerase chain reaction, epidemiology.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Cryptosporidium spp. são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Cryptosporidiidae (FAYER, 2008), que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (CURRENT et al., 1986; BARTA; THOMPSON, 2006; VALIGUROVÁ et al., 2008), causando doença clínica e subclínica (SANTIN, 2013). Atualmente, há descrição de 31 espécies do parasito (RYAN; HIJJAWI, 2015), porém, ainda não há um consenso sobre quais são válidas (ŠLAPETA et al., 2013).

Há quatro espécies de *Cryptosporidium* que causam enfermidades em aves. A primeira descoberta foi realizada por Slavin (1955), foi denominada *Cryptosporidium meleagridis*. Current et al. (1986) descreveu a segunda, *Cryptosporidium baileyi*; Pavlásek (1999) a terceira, *Cryptosporidium galli*, e Holubová et al. (2016) a quarta, *Cryptosporidium avium*. Foram descritos ainda os genótipos I, II, III, IV e VI (CHELLADURAI et al., 2016; NAKAMURA; MEIRELES, 2015) que, apesar de morfologicamente semelhantes a algumas espécies já classificadas, devido à ausência de dados relacionados às suas características biológicas, ainda não foram classificados como espécies (FAYER, 2010; XIAO et al., 2002) e os dados sobre sua especificidade por hospedeiros ainda são bastante escassos.

Em aves, a criptosporidiose constitui-se em uma das principais infecções por protozoários, se manifestando como doença de curso agudo do trato respiratório ou digestivo de várias espécies de aves das ordens Accipitriformes, Anseriformes, Bucerotiformes, Caprimulgiformes, Cathartiformes, Charadriiformes, Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Passeriformes Phoenicopteriformes, Piciformes, Psittaciformes, Strigiformes e Struthioniformes (NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

Passeriformes são parasitados com mais frequência por *C. galli* e genótipo III de aves (NAKAMURA; MEIRELES, 2015), podendo apresentar a enfermidade clínica ou subclínica; os sintomas podem variar desde diarreia, anorexia, emagrecimento e vômito crônico (MAKINO et al., 2010; OLSON et al., 2004; RAVICH et al., 2014). Em infecções por *C. galli*, ocorre liberação de oocistos de forma intermitente (MEIRELES, 2010).

Estudos realizados em diversos países, com diversas espécies de aves, relatam prevalência de infecção por *Cryptosporidium* spp. variando de 0,8% a 44,4%, além de descreverem as espécies *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. galli*, *C. muris*, *C. meleagridis* e *C. parvum* e os genótipos I, II, III e V (NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

2 CRIPTOSPORIDIOSE EM AVES

Diversas espécies de aves pertencentes a várias ordens de aves são infectadas por *Cryptosporidium* spp. Em passeriformes, há relatos da presença das seguintes espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais: *C. avium*, *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis*, *C. parvum* e dos genótipos I e III de aves (Tabela 1).

C. baileyi é a espécie mais frequentemente diagnosticada em aves, com relatos de enfermidade clínica ou subclínica em 11 ordens de aves, e é a espécie mais frequente em Galliformes. *C. galli* foi encontrada em diversas espécies de cinco ordens de aves, com mais frequência em Passeriformes e Psitaciformes, enquanto *C. meleagridis* foi detectada em quatro ordens de aves, mas infecta preferencialmente perus e galinhas. *C. meleagridis* é a única espécie aviária que infecta mamíferos, em infecções naturais ou experimentais (AKIYOSHI et al., 2003; DARABUS, 1997; DARABUS; OLARIU, 2003; SRÉTER et al., 2000).

Ainda há pouca informação sobre a especificidade por hospedeiros dos

genótipos aviários de *Cryptosporidium* (Tabela 1). O genótipo II de aves foi descrito em avestruzes e em diversas espécies de psitacídeos (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006, NG et al., 2006; SEVÁ et al., 2011). Após infecção experimental em galinhas com o genótipo II de aves, não observaram infecção nas inoculadas, examinadas por meio de citologia, histologia e pesquisa de oocistos em fezes.

Há várias descrições de infecção por *Cryptosporidium* em aves, particularmente nas décadas de 70 a 90, em que o diagnóstico foi feito somente com observação por citologia ou histopatologia, em várias espécies de aves, sem caracterização molecular da espécie ou genótipo (GOODWIN, 1989; SRÉTER; VARGA, 2000). Os sinais clínicos relatados, em sua maioria, estão relacionados ao trato respiratório e ao trato gastrintestinal, eventualmente com presença de mortalidade. No entanto, outros tecidos são colonizados por *Cryptosporidium* spp., em infecções clínicas ou subclínicas, incluindo a bursa de Fabricius, conjuntiva ocular, orelha média, pâncreas e rins (DHILON et al., 1981; GOODWIN, 1988; GOODWIN, 1989; HOERR et al., 1986; JARDINE; VERWOERD, 1997; MASON, 1986; MURAKAMI et al., 2002; O'DONOGHUE et al., 1987; RITTER et al., 1986; SRÉTER; RYAN et al., 2010; THAM et al., 1982; VARGA, 2000).

3 CRIPTOSPORIDIOSE NO SER HUMANO

A infecção em seres humanos é geralmente causada pelo *Cryptosporidium hominis* que é uma espécie exclusiva do homem, e pelo *Cryptosporidium parvum*, que é uma espécie com elevado potencial zoonótico, responsável por inúmeros casos descritos na literatura (FAYER et al., 2000; MILLARD et al., 1994; PREISER et al., 2003; SULAIMAN et al., 1998; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002;). Experimentos utilizando infecção experimental demonstraram que oocistos de *C. meleagridis* foram infectantes para camundongos, ratos, coelhos e bovinos (DARABUS, 1997; DARABUS;

OLARIU, 2003; SRÉTER; VARGA, 2000;), evidenciando que essa espécie, além de infectar as aves, também pode promover infecção em mamíferos.

A prevalência de infecção em aves por *C. meleagridis* ainda é pouco conhecida, talvez pela necessidade do uso de técnicas de biologia molecular para sua detecção. No entanto, há relatos de prevalência, na Argélia, de 28,9% (26/90) em frangos e 43,9% (25/57) em perus (BAROUDI et al., 2013) e, na China, de 8,6% (3/35) em galinha doméstica (QI et al., 2011). Em alguns países, a infecção em humanos por *C. meleagridis* pode apresentar frequência semelhante ou maior a infecção por *C. parvum* (CAMA et al., 2003; XIAO et al., 2001). Estudos utilizando análise filogenética sugerem que há relação entre os isolados do homem e de aves (WANG et al., 2014), demonstrando que *C. meleagridis* possui importância em saúde pública.

Tabela 1- Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* descritas em Passeriformes.

Espécies/ Genótipos	Espécies de aves	Origem Geográfica	Referências
<i>C. avium</i>	<i>Serinus canaria</i>	Brasil	Nardi., 2015
<i>C. baileyi</i>	<i>Pica hudsonia, Ploceus jacksoni, Acridotheres tristis, Galerida cristata, Pycnonotus spp, Sicalis flaveola, Sporophila frontalis, Carduelis carduelis, Paroaria dominicana, Chloebia gouldiae, Leiothrix lutea, Padda oryzivora, Taeniopygia guttata</i>	Austrália, Brasil, China	Ng et al., 2006; Nakamura et al., 2009; Sevá et al., 2011; Qi et al., 2011;
<i>C. galli</i>	<i>Taeniopygia guttata, Lonchura castaneothorax, Emblemata picta, Serinus canaria, Peophila cincta, Paroaria dominicana</i>	Austrália, Brasil	Ng et al., 2006; Antunes et al., 2008; Nakamura et al., 2014; Silva et al., 2010; Sevá et al., 2011; Qi et al., 2011; Nakamura et al., 2014
<i>C. meleagridis</i>	<i>Bombycilla garrulus</i>	China	Qi et al., 2011
<i>C. parvum</i>	<i>Lonchura striata domestica</i>	Brasil	Gomes et al., 2012
Genótipo I de aves	<i>Serinus canaria</i>	Brasil	Ng et al., 2006; Nakamura et al., 2009
Genótipo III de aves	<i>Urocissa erythrorhyncha, Padda oryzivora</i>	China	Qi et al., 2011; Gomes et al., 2012;

4 DIAGNÓSTICO

A experiência é um fator fundamental para diagnóstico de criptosporidiose, uma vez que os oocistos do gênero *Cryptosporidium* são pequenos, quando comparados a outros coccídios, não apresentam esporocistos, são difíceis de serem visualizados e são morfologicamente similares a esporos de fungos e leveduras (CASEMORE, 1991). Particularmente em amostras com poucos oocistos, é preciso cuidado para evitar resultados falso-positivos em amostras fecais examinadas pelos métodos de diagnóstico mais comuns, como a coloração de Kinyoun, coloração negativa com verde malaquita ou por visualização em microscopia óptica após concentração com soluções saturadas de açúcar, sulfato de zinco ou cloreto de sódio.

Apesar dos oocistos de algumas espécies apresentarem morfologia e morfometria distintas, a análise microscópica não define a espécie, pelo fato de apresentarem pequena variação morfológica e morfométrica e, em muitos casos, serem idênticos entre diferentes espécies ou genótipos (RYAN, 2010). As técnicas imunológicas como ELISA de captura e imunofluorescência indireta apresentam maior sensibilidade que as técnicas de coloração, no entanto, os antígenos apresentam reatividade cruzada entre diferentes espécies de *Cryptosporidium*, não sendo possível o diagnóstico espécie-específico (JEX et al., 2008).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* é realizada por meio da PCR seguida da RFLP ou 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 glicoproteína de 60kDa (GP60) é utilizado para subtipagem de *C. meleagridis* em estudos de epidemiologia molecular (WANG et al., 2014). Há também a possibilidade de diagnóstico espécie-específico utilizando técnicas de biologia molecular. Recentemente, Nakamura et al. (2014) desenvolveram uma reação em cadeia da polimerase em tempo real para diagnóstico específico de *C. galli* e genótipo III de aves.

5 TRATAMENTO E PROFILAXIA

O tratamento das infecções causadas pelas diversas espécies de *Cryptosporidium* possui resultados clínicos insatisfatórios em aves (RAVICH et al., 2014), ou seja, ainda não há um tratamento efetivo para a criptosporidiose em psitacídeos (NAKAMURA et al., 2014; RYAN, 2010), sendo assim, a profilaxia torna-se aliada à prevenção da doença.

A maior parte dos desinfetantes não são eficientes quando em contato com oocistos de *Cryptosporidium* e, quando sensíveis, necessitam períodos maiores que uma hora de contato para que 90% deles sejam inativados. O único desinfetante efetivo que pode ser usado em água potável é o ozônio (KORICH et al., 1990). A temperatura parece ser um fator importante para a viabilidade dos oocistos, sendo que quanto maior ela for, mais inativação haverá (JENKINS et al., 2002).

OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivos determinar a ocorrência e realizar a caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. e comparar três métodos de detecção deste protozoário em amostras fecais de canários (*Serinus canaria*) criados em cativeiro nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.

REFERÊNCIAS

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

ANTUNES, R. G.; SIMÕES, D. C.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V.

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.

BAROUDI, D.; KHELEF, D.; GOUCEM, R.; ADJOU, K.T.; ADAMU, H.; ZHANG, H.; XIAO, L. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 334-340, 2013.

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

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

CASEMORE, D. P. ACP Broadsheet 128: June 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 44, p. 445-451, 1991.

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

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, p. 289-296, 1986.

DARABUS, G. Experimental studies of inter and intraspecific transmission of *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis*. **Revista Romana de Medicina Veterinaria**, v. 7, p. 155-160, 1997.

- DARABUS, G.; OLARIU, R. The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 6, p. 225-228, 2003.
- DHILLON, A. S.; THACKER, H. L.; DIETZEL, A. V.; WINTERFIELD, R. W. Respiratory cryptosporidiosis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 256, 747-751, 1981.
- FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 90-97, 2010.
- FAYER, R.; MORGAN, U.M.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1305-1322, 2000.
- GOMES, R. S.; HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T. C. B. *Cryptosporidium* spp. parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries, and pet shops. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1363-1370, 2012.
- GOODWIN, M. A. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Avian Pathology**, v. 18, p. 365-384, 1989.
- GOODWIN, M. A.; KRABILL, U. A. Diarrhea associated with small-intestinal cryptosporidiosis in a budgerigar and in a cockatiel. **Avian Diseases**, v. 33, p. 829-833, 1989.
- GOODWIN, M. A.; LATIMER, K. S.; BROWN, J.; STEFFENS, W. L.; MARTIN, P. W.; RESSURRECION, R. S.; SMELTZER, M. A.; DICKSON, T. G. Respiratory cryptosporidiosis in chickens. **Poultry Science**, v. 67, p. 1684-1693, 1988.
- HOERR, F. J.; CURRENT, W. L.; HAYNES, T. B. Fatal cryptosporidiosis in a quail. **Avian Diseases**, v. 30, p.421-425, 1986.
- 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.

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

JENKINS, M. B.; BOWMAN, D. D.; FOGARTY, E. A.; GHIORSE, W. C. *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in three soil types at various temperatures and water potentials. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 1101-1109, 2002.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium* - Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 304-317, 2008.

KORICH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S.; SINCLAIR, N. A.; STERLING, C. R. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1423-1428, 1990.

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

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

MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia 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 (*Struthiocamelus*). **Jornal of Parasitology**, v. 92, p. 623-626, 2006.

MILLARD, P. S.; GENSHEIMER, K. F.; ADDISS, D. G.; SOSON, D. M.; BECKETT, G. A.; HOUCK-JANKOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of

cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v. 272, p. 1592-1196, 1994.

MURAKAMI, S.; MIYAMA, M.; OGAWA, A.; SHIMADA, J.; NAKANE, T. occurrence of conjunctivitis, sinusites and upper region tracheitis in japanese quail (*Coturnix coturnix*), possibly caused by mycoplasma gallisepticum accompanied by *Cryptosporidium* sp. infection. **Avian Pathology**, v. 31, p. 363-370, 2002.

NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 253-267, 2015.

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, 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, p. 47-51, 2009.

NARDI, A. R. M. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. e *Isospora* spp. em uma população de canários do reino (*Serinus canaria*) que participam de campeonatos de ornitologia no Brasil. 2015. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, 2015. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/317919/1/Nardi_AnaRitaMoraes_D.pdf>. Acesso em: 19 de jul. 2017.

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

O'DONOGHUE, P. J.; THAM, V. L.; SARAM, W. G.; PAULL, K. L.;

MCDERMOTT, S. *Cryptosporidium* infections in birds and mammals and attempted cross-transmission studies. **Veterinary Parasitology**, v. 26, p. 1-11, 1987.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 185-191, 2004.

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

PREISER, G.; PREISER, L.; MADEO, L. An outbreak of cryptosporidiosis among Veterinary Science students who work with calves. **Journal of the American College of Health**, v. 51, p. 213-215, 2003.

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

RAVICH, M.L.; REAVILL, D.R.; HESS, L.; CHILDRESS, A.L.; WELLEHAN JUNIOR, J.F.X. Gastrointestinal cryptosporidiosis in captive psittacine birds in the United States: a case review. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 28, p. 297-303, 2014.

RITTER, G. D.; LEY, D. H.; LEVY, M. G.; GUY, J. S.; BARNES, H. J. Intestinal cryptosporidiosis and reovirus isolation from Bobwhite quail (*Colinus virginianus*) with enteritis. **Avian Diseases**, v. 30, p. 603-608, 1986.

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

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

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

2014.

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

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

SEVÁ, A.P.; FUNADA, M.R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARÃES, M.B.; SOUZA, S.O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J.A.; DUARTE, V.V.; SOARES, R.M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 27-32, 2011.

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.

ŠLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology**. v. 43, p. 957-970, 2013.

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.

SULAIMAN, I. M.; XIAO, L.; YANG, C.; ESCALANTE, L.; MOORE, A.; BEARD, C. B.; ARROWOOD, M. J.; LAL, A. A. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 681-685, 1998.

THAM, V. L.; KNIESBERG, S.; DIXON, B. R. Cryptosporidiosis in quails. **Avian**

Pathology, v. 11, p. 619-626, 1982.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; WATT, P.; DOWD, S .E.; ENRIQUEZ, R.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 378-382, 2002.

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

WANG, L.; XUE, X.; LI, J.; ZHOU, Q.; YU, Y.; DU, A. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. **Parasite**, v. 21, p. 1-5, 2014.

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHEKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R. H.; LAL, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima. Peru. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 492-497, 2001.

XIAO, L.; 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.

CAPÍTULO 2 – DETECTION AND CHARACTERIZATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. IN CANARIES (*SERINUS CANARIA*) KEPT IN CAPTIVITY USING DIFFERENT DIAGNOSIS METHODS

CAMARGO, V. S.¹; SANTANA, B. N.¹; FERRARI, E. D.¹; NAKAMURA, A. A.²;
NARDI, A. R. M.³; NAGATA, W.B. ¹, MEIRELES, M. V.^{1*}.

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, Brazil

²Faculdades Adamantinenses Integradas (FAI), Adamantina, Brazil

³Fundação Municipal de Ensino Superior, Bragança Paulista, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 1836361425; E-mail address: marcelo@fmva.unesp.br (M.V. Meireles).

ABSTRACT

This study used several diagnostic methods to examine the occurrence of and molecularly characterize *Cryptosporidium* spp. in captive canaries (*Serinus canaria*) in southern and southeastern Brazil. A total of 498 samples were purified by centrifugal-flotation using Sheather's solution. *Cryptosporidium* spp. diagnosis was performed using three diagnostic methods: malachite green negative staining, nested PCR targeting the 18S rRNA gene, followed by sequencing the amplified fragments, and duplex real-time PCR targeting the 18S rRNA specific to detect *Cryptosporidium galli* and *Cryptosporidium* avian genotype III. The overall positivity for *Cryptosporidium* spp. (total samples positive in at least one protocol) from the microscopic analysis, nested PCR and duplex real-time PCR protocol results was 13.3% (66/498). The positivity rates were 2.0% (10/498) and 4.6% (23/498) for *Cryptosporidium* spp. by microscopy and nested PCR, respectively. Sequencing of 20 samples amplified by nested PCR identified *C. galli* (3.0%; 15/498), *Cryptosporidium* avian genotype I (0.8%; 4/498) and *Cryptosporidium* avium (0.2%; 1/498). Duplex real-time PCR revealed a positivity of 7.8% (39/498) for *C. galli* and 2.4% (12/498) for avian genotype III. Malachite green negative staining differed significantly from nested PCR in detecting *Cryptosporidium* spp. Duplex real-time PCR was more sensitive than nested PCR/sequencing for detecting gastric *Cryptosporidium* in canaries.

Keywords: Birds, cryptosporidiosis, diagnosis, epidemiology.

1 INTRODUCTION

Cryptosporidiosis is a major protozoan infection in birds, causing respiratory and gastrointestinal diseases in domestic and wild species (NAKAMURA & MEIRELES, 2015).

Four *Cryptosporidium* species infect birds: *Cryptosporidium meleagridis* (SLAVIN, 1955), *Cryptosporidium baileyi* (CURRENT et al., 1986), *Cryptosporidium galli* (PAVLÁSEK, 1999) and *Cryptosporidium avium* (formerly avian genotype V) (HOLUBOVÁ et al., 2016). In addition to the avian *Cryptosporidium* species, many *Cryptosporidium* genotypes infect birds, mainly the avian genotypes I (NG et al., 2006), II (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006), III (NG et al., 2006).

Studies conducted in several countries, with several species of domestic and wild birds, reported that *Cryptosporidium* spp. prevalence ranged from 0.8% to 44.4%, and *Cryptosporidium andersoni*, *C. avium*, *C. baileyi*, *C. galli*, *Cryptosporidium muris*, *C. meleagridis*, *Cryptosporidium parvum* and several avian genotypes, including the avian genotypes I, II, III and VI were identified (NAKAMURA & MEIRELES, 2015, CHELLADURAI et al., 2016).

In Brazil, *C. avium*, *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. parvum*, the avian genotypes I, II and III and the duck genotype are reported to occur in fecal samples of domestic and wild birds (MEIRELES et al., 1992; SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006; HUBER et al., 2007; NAKAMURA et al., 2009, 2014; SEVÁ et al., 2011; NARDI, 2015; CUNHA et al., 2017).

C. galli is the most frequent species in Passeriformes (NAKAMURA & MEIRELES, 2015); however, there is controversy regarding its pathogenicity in birds. *C. galli* or *Cryptosporidium* avian genotype III infections can result in diarrhea, anorexia, weight loss, and chronic vomiting (ANTUNES et al., 2008; MAKINO et al., 2010, SILVA et al., 2010; RAVICH et al., 2014).

In canaries (*Serinus canaria*), *C. galli*, *C. avium* and *Cryptosporidium* avian genotypes I and III infections have been described (NG et al., 2006; ANTUNES

et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009, 2014; NARDI, al., 2015). Most epidemiological studies on avian cryptosporidiosis were performed using convenience sampling with fecal samples from several bird species (NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009, SEVÁ et al., 2011; BAMAIYI et al., 2013; REBOREDO-FERNÁNDEZ et al., 2015).

Parasite-host adaptation and co-evolution among *Cryptosporidium* spp. and their avian hosts are thought to occur (XIAO et al., 2002), since some *Cryptosporidium* species/genotypes are found almost exclusively in certain avian orders (NAKAMURA & MEIRELES, 2015). Therefore, epidemiological studies using samples representing avian orders or species would aid in investigating *Cryptosporidium* species evolution.

The common techniques used to diagnose *Cryptosporidium* infection are microscopic analysis and nested PCR. Microscopy is an inexpensive and fast technique; however, it does not identify the *Cryptosporidium* species and is less sensitive and specific. Nested PCR is more expensive than microscopy, despite being highly sensitive and specific and identifying the species after amplicon sequencing (JEX et al., 2008). Another option for specific species/genotype specific diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds is through duplex real-time PCR (NAKAMURA et al., 2014).

The aim of this study was to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp., to perform its molecular characterization and to compare different diagnostic techniques for detecting *Cryptosporidium* spp. or the gastric *Cryptosporidium* species/genotypes in fecal samples from captive canaries from southern and southeastern Brazil.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Study population and fecal sample collection

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine, Araçatuba, process FOA 01022-2015.

2.2 Fecal samples

Fecal samples were obtained from asymptomatic captive canaries from southern and southeastern Brazil, exhibited at the 64th Ornithological Championship 2015 of the Ornithological Federation of Brazil (FOB), from 09/07/2015 to 19/07/2015, in the city of Itatiba, state of São Paulo, Brazil.

The total population of canaries exhibited in the championship was approximately 40,000 birds. To determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in these canaries, the sample number of 385 was calculated using Win Episcopo software (THRUSFIELD et al., 2001) considering a diagnostic test with 100% sensitivity and 100% specificity. As lower sensitivity and specificity rates are common when using the diagnostic protocols employed in this study (JEX et al., 2008), and because losses occur in sample storage and processing, 498 samples were collected.

Samples were collected at reception from the bottom of the cage before direct or indirect contact between the birds to avoid cross-contamination between samples. Each sample was collected using a disposable wooden spatula, transferred to a 2-ml microtube containing 0.9% sodium chloride solution in enough quantity to prevent dehydration, and stored at 4°C.

2.3 Purification of oocysts

Samples were fragmented and homogenized using a disposable wooden spatula in a 2 mL microtube containing Sheather's solution ($g = 2.05$) prepared with phosphate buffered saline and 0.1% Tween 20 (PBS-T). The contents of each microtube were homogenized, and half of the contents were transferred to another microtube so that each sample was purified in two tubes simultaneously. Each microtube was filled with 1.9 mL of Sheather's solution and vortexed and centrifuged at 800 g for 5 minutes. Four hundred μ L of supernatant was

transferred to a microtube containing 1,500 μ L of PBS-T, homogenized by inversion and centrifuged at 10,000 g for 3 minutes. After discarding the supernatant, the microtubes were filled with 1.9 mL of PBS with 0.01% Tween 20 and centrifuged at 10,000 g for 3 minutes. The supernatant was discarded, preserving approximately 100 μ L of solution and sediment. One hundred μ L of 10% buffered formalin was added to one microtube for *Cryptosporidium* oocyst microscopy screening using malachite green negative staining (ELLIOT et al., 1999), while the other microtube was frozen at -20°C for DNA extraction and amplification by nested PCR and duplex real-time PCR.

2.4 Genomic DNA extraction

Genomic DNA of *Cryptosporidium* spp. was extracted per the protocol adapted from McLauchlin et al. (2000) and Wang et al. (2011) using silica columns (Zymo-Spin® IIC (Zymo Research, Irvine, USA) to replace activated silica. The DNA was eluted in 100 μ L of elution buffer (10 mM Tris, 0.5 mM EDTA, pH 9) and stored at -20°C in two 50 μ L aliquots.

2.5 Nested PCR and sequencing

Nested PCR targeting the 18S rRNA gene was performed using the PCR primers, 5'-GACATATCATTCAAGTTTCTGACC-3' and 5'-CTGAAGGAGTAAGGAACAACC-3' (~761 bp), and the nested PCR primers, 5'-CCTATCAGCTTTAGACGGTAGG-3' and 5'-TCTAAGAATTTACCTCTGACTG-3' (~ 585 bp) (RYAN et al., 2003). Genomic DNA from *C. parvum* and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively.

The reactions contained a volume of 25 μ L, with 2.5 μ L of 10x PCR buffer, 2.0 mM MgCl_2 , 0.5 U of JumpStart® Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 200 μ M of each deoxyribonucleotide, 200 nM of each primer, 5 μ L of target DNA in the PCR and 2.5 μ L of DNA in the nested PCR. Samples were subjected to initial DNA denaturation at 94°C for 2 minutes, followed by 40 cycles, each consisting of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 58°C and

extension at 72°C for 60 seconds (PCR) or 45 seconds (nested PCR), with a final extension at 72°C for 7 minutes.

Amplified fragments were analyzed by GelRed® (Biotium, Fremont, USA) stained gel electrophoresis.

2.6 Duplex real-time PCR

Duplex real-time PCR was performed to simultaneously detect *C. galli* and *Cryptosporidium* avian genotype III, amplifying 134-bp and 138-bp amplicons, respectively (Table 1), under the following reaction conditions: 25 µL of solution containing 12.5 µL of JumpStart® TaqReady Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 4.5 mM MgCl₂, 250 nM of each probe, 600 nM of each primer, 0.6 µg/µL of non-acetylated bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and 5 µL of target DNA. PCR cycles consisted of 2 minutes of denaturation at 94°C followed by 50 cycles of 30 seconds at 94°C and 1 minute at 61°C in the CFX96® Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA).

2.7 DNA Sequencing

Identifying the *Cryptosporidium* species was performed by sequencing the nested PCR amplicons, after purification using the Illustra ExoProStar® 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, Champain, USA) or the QIAquick® Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany), using ABI Prism® Dye Terminator 3.1, in an ABI 3730XL automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA), at the Center for Sequencing and Functional Genomics of UNESP, Jaboticabal Campus, Brazil. Sequencing reactions were performed in both directions using nested PCR primers.

Consensus sequences were determined using the CodonCode Aligner v. 7.1.2 (CodonCode Corporation, Dedham, USA) and aligned with homologous sequences published in GenBank using Clustal X software (THOMPSON et al., 1997) and Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999).

2.8 Statistical analysis

The McNemar test was used to compare diagnostic techniques, and the Kappa correlation coefficient test was used to evaluate the concordance between them. Statistical analyses were performed using the BioEstat 5.0 software (Analyst Soft Inc., Walnut, USA) and the results were considered significant when $p < 0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The overall positivity for *Cryptosporidium* spp. (total samples positive in at least one protocol) from the microscopic analysis, nested PCR and duplex real-time PCR protocol results was 13.3% (66/498) (Table 2). By microscopy and nested PCR, the positivity rates for *Cryptosporidium* spp. were 2.0% (10/498) and 4.6% (23/498), respectively. There was a significant difference ($p=0.0123$) and a fair agreement (Kappa=0.28) between nested PCR and microscopic analysis for detecting *Cryptosporidium* spp.

Only one study has reported specifically on *Cryptosporidium* infection in canaries (NARDI et al., 2015), with the reported positivity for *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic canaries at 2% (8/394) in Ziehl-Neelsen stained fecal samples. This is consistent with the results of this study using malachite green negative staining (2%; 10/498).

Nested PCR/sequencing revealed the presence of *C. galli* (3%; 15/498), *Cryptosporidium* avian genotype I (0.8%; 4/498) and *C. avium* (0.2; 1/498) (Table 3). Sequences from *C. galli*, *Cryptosporidium* avian genotype I and *Cryptosporidium* avian genotype V are 100% similar to GenBank homologous sequences EU543269 (*S. canaria*), GQ227479 (*S. canaria*) and KJ487974 (*Amazona aestiva*), respectively. Unexpected nonspecific nested PCR amplification of *Isospora* spp. amplicons of the predicted sizes occurred in six samples. Because nested PCR primers target conserved regions of a pan-eukaryotic gene (18S rRNA), diagnosis of *Cryptosporidium* spp. based solely on 18S rRNA amplicon sizes should be confirmed with caution in Passeriformes,

since *Isospora* spp. is common in fecal samples from birds of this order (BERTO et al., 2011).

Duplex real-time PCR was positive for gastric *Cryptosporidium* in 10.24% (51/498) of the samples, 7.8% (39/498) for *C. galli* and 2.4% (12/498) for *Cryptosporidium* avian genotype III. For detecting the gastric species of *Cryptosporidium*, nested PCR/sequencing and duplex real-time PCR were significantly different ($p < 0.0001$), and the agreement between the two methods was fair (Kappa = 0.40).

C. galli is associated with chronic infection in the passerine proventriculus and is likely responsible for chronic gastric disease and predisposition to concomitant infections (ANTUNES et al., 2008; NAKAMURA & MEIRELES, 2015). The species most frequently detected by nested PCR/sequencing was *C. galli*, corresponding to 75% (15/20) of the sequenced samples. In addition, *Cryptosporidium* species identification by nested PCR/sequencing and duplex real-time PCR revealed results similar to those of other authors (NAKAMURA et al., 2014; NARDI, 2015), in which *C. galli* showed higher positivity than *Cryptosporidium* avian genotype III in Passeriformes, including canaries.

Cryptosporidium avian genotype VI, described by Chelladuray et al. (2016), is closely related to *C. galli* and *Cryptosporidium* avian genotype III and likely infects the gastric epithelia. Although we did not detect avian genotype VI in canary samples by nested PCR/sequencing, we cannot assure that duplex real-time PCR does not detect this genotype due to the high similarities in its primer and probe annealing regions.

Tissue tropism and the clinical importance of *Cryptosporidium* avian genotype I are undetermined (NAKAMURA & MEIRELES, 2015). In this study, *Cryptosporidium* avian genotype I occurred less in canaries than *C. galli*. In contrast, Nardi et al. (2015) found a 14.21% (29/204) positivity for *Cryptosporidium* avian genotype I in fecal samples and cloacal swabs from canaries. This higher positivity taxa may have resulted from cloacal swab sampling and by including samples from symptomatic and dead birds. Although the tissue tropism of avian genotype I is undetermined, the close genetic similarity

among this genotype, *C. avium*, *C. baileyi* and avian genotype II is evidence that avian genotype I exhibits tropism for the cloacal epithelia, the bursa of Fabricius or the respiratory tract (NAKAMURA & MEIRELES, 2015).

C. avium was identified in one sample and has been described in the trachea/lung and cloaca of a cockatiel (ABE et al., 2015), the kidney and cloaca (CURTISS et al., 2015) and in fecal samples of budgerigars, Amazon parrots, cockatiels and Major Mitchell's cockatoos (ABE & MAKINO; 2010; QI et al., 2011; NAKAMURA et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Nardi (2015) also found low positivity (1.0%; 2/204) for *C. avium* in canary fecal samples.

4 CONCLUSION

In conclusion, nested PCR was more sensitive than microscopic analysis using malachite green negative staining to detect *Cryptosporidium* spp. in fecal samples from canaries. Duplex real-time PCR was more sensitive than nested PCR/sequencing for diagnosing gastric cryptosporidiosis in canaries. The decision whether to opt for microscopic examination or molecular techniques for epidemiological studies depends on the study's aim and the cost–benefit relationship of the diagnostic method. There was a higher prevalence of *C. galli* in fecal samples from canaries, and *Cryptosporidium* avian genotype III, *Cryptosporidium* avian genotype I and *C. avium* were detected at lower positivity rates.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the São Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP) for the financial support (2015/26334-8) and to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) for a master's degree scholarship.

6 REFERENCES

Abe N, Makino I. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. *Parasitol Res* 2010; 106(6): 1491-1497.

Abe N, Matsuo K, Makino I. *Ascaridia nymphii* n. sp. (Nematoda: Ascaridida) from the alimentary tract of a severely emaciated dead cockatiel *Nymphicus hollandicus*. *Parasitol Res* 2015; 114:4281–4288.

Antunes RG, Simões DC, Nakamura AA, Meireles MV. Natural infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. *Avian Dis* 2008; 52(4): 702–705.

Bamaiyi PH, Umoh JU, Abdu PA, Lawal IA. The prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in Zaria, Nigeria. *Borneo J Resour Sci Tech* 2013; 2(2): 52–59.

Berto BP, Flausino W, McIntosh D, Teixeira-Filho WL, Lopes CWG. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Syst Parasitol* 2011; 80(3): 159–204.

Chelladurai JJ, Clark ME, Kváč M. *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Parasitol Res* 2016; 115(5): 1901–1906.

Cunha MJR; Cury MC; Santín M. Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds. *Parasitol Res* 2017; 116(2): 487–493.

Current WL, Upton SJ, Haynes TB. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J Protozool* 1986; 33(2): 289–296.

Curtiss JB, Leone AM, James F. Renal and cloacal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* avian genotype V) in a major mitchell's cockatoo (*Lophochroa leadbeateri*). *J Zoo Wildl Med* 2015; 46(4): 934–937.

Elliot A, Morgan UM, Thompson RCA. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *J Gen Appl Microbiol* 1999; 45(3): 139–142.

Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95–98.

Holubová N, Sak B, Horčíčková M. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol Res* 2016; 115(6): 2243–2251.

Huber F, da Silva S, Bomfim TCB, Teixeira KRS, Bello AR. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Vet Parasitol* 2007; 150(1-2): 65–74.

Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB. *Cryptosporidium* – biotechnological advances in the detection, diagnosis, and analysis of genetic variation. *Biotechnol Adv* 2008; 26(4): 304–317.

McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Diaz S, Nichols GL. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11): 3984–3990.

Makino I, Abe N, Reavill DR. *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). *Avian Dis* 2010; 54(3): 1102–1107.

Meireles MV, Figueiredo PC. Isolamento e identificação do *Cryptosporidium baileyi* Current et al. 1986 (Apicomplexa:Cryptosporidiidae) em frangos de corte. *Rev Bras Parasitol Vet* 1992; 1(2): 125–130.

Meireles MV, Soares RM, Santos MM, Gennari SM. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *J Parasitol* 2006; 92(3): 623–626.

Nakamura AA, Simões DC, Antunes RG, Silva DC, Meireles MV. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Vet Parasitol* 2009; 166(1-2): 47–51.

Nakamura AA, Homem CG, Silva AMJ, Meireles MV. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. *Vet Parasitol* 2014; 205(1–2): 7–13.

Nakamura AA, Meireles MV. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015; 24(3): 253–267.

Nardi ARM. *Ocorrência e caracterização molecular de **Cryptosporidium** spp. e **Isospora** spp. em uma população de canários do reino (**Serinus canaria**) que participam de campeonatos de ornitologia no Brasil* [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2015. **Available from:** http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/317919/1/Nardi_AnaRitaMoraes_D.pdf.

Ng J, Pavlásek I, Ryan U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(12): 7548–7553.

Pavlásek I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remed Klinicka Mikrobiol* 1999; 3: 290–301.

Qi M, Wang R, Ning C, Li X, Zhang L, Jian F, et al. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Exp Parasitol* 2011; 128(4): 336–340.

Ravich ML, Reavill DR, Hess L, Childress AL, Wellehan JFX Jr. Gastrointestinal cryptosporidiosis in captive psittacine birds in the United States: a case review. *J Avian Med Surg* 2014; 28(4): 297–303.

Reboredo-Fernández A, Ares-Mazás E, Cacciò SM, Gómez-Couso H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology* 2015, 142(7): 917–925.

Santos MMAB, Peiró JR, Meireles MV. *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: clinical, morphological and molecular studies. *Rev Bras Cienc Avic* 2005; 7(2): 113–117.

Sevá AP, Funada MR, Richtzenhain L, Guimarães MB, Souza SO, Allegretti L, Sinhorini JA, Duarte VV, Soares RM. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 175(1-2): 27–32.

Silva DC, Homem CG, Nakamura AA, Teixeira WF, Perri SH, Meireles MV. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. *Parasitol Res* 2010; 107(2): 271–277.

Slavin D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol* 1955; 65(3): 262–266.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(24):4876–4882.

Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec* 2001; 148(18): 567–573.

Wang TY, Wang L, Zhang JH, Dong WH. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet Mol Res* 2011; 10(1): 519–525.

Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, et al. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: Implications for taxonomy and public health. *Int J Parasitol* 2002; 32(14): 1773–1785.

Zhang XX, Zhang NZ, Zhao GH. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* infection in pet parrots in North China. *Biomed Res Int* 2015; article ID 549798.

Table 1. Primers and probes used to detect *C. galli* and *Cryptosporidium* avian genotype III by duplex real-time PCR (NAKAMURA et al., 2014).

Species/Genotype	Primers/ Probes	Sequence 5' – 3'	Amplicon (bp)
<i>C. galli</i>	Forward primer	CGTAGTTGGATTTCTGTTGCATCA	134
	Probe	FAM AATATAATATCAACATCCTCCC MGB	
	Rewind primer	GGCAGTTGCCTGCTTTAAGC	
<i>Cryptosporidium</i> avian genotype III	Forward primer	GCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTA TT	138
	Probe	VIC CATTATAATAACAACATCCTTCC MGB	
	Rewind primer	GGCAGTTGCCTGCTTTAAGC	

Table 2. Geographic origin of canary (*Serinus canaria*) fecal samples, and overall positivity for *Cryptosporidium* spp. (total samples positive in at least one protocol) from microscopic analysis, nested PCR and duplex real-time PCR protocol results.

States of Brazil	Nº sampled	% positive (nº positive)
São Paulo	267	10.9 (29)
Paraná	128	14 (18)
Rio Grande do Sul	43	9.3 (4)
Minas Gerais	35	17.1 (6)
Santa Catarina	13	53.8 (7)
Rio de Janeiro	12	16.7 (2)
Total	498	13.3 (66)

Table 3. Detection and identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in canary (*Serinus canaria*) fecal samples using microscopy and molecular methods targeting the 18S rRNA gene.

Diagnostic methods	<i>Cryptosporidium</i> detection/identification (n° positive / n° sampled)				
	Gastric <i>Cryptosporidium</i> species**				
	<i>Cryptosporidium</i> spp.*	<i>C. galli</i>	<i>Cryptosporidium</i> avian genotype III	<i>Cryptosporidium</i> avian genotype I	<i>C. avium</i>
Malachite green negative staining	2.0 (10/498)	-	-	-	-
Nested PCR	4.6 (23/498)	-	-	-	-
Nested PCR/sequencing	-	3.0 (15/498)	0.0 (0/498)	0.8 (4/498)	0.2 (1/498)
Duplex real-time PCR	-	7.8 (39/498)	2.4 (12/498)	-	-

* McNemar test ($p=0.01$); Kappa=0.2

** McNemar test ($p<0.0001$); Kappa=0.4