

RESSALVA

Atendendo
solicitação da autora, o
texto completo desta
TESE será
disponibilizado
somente a partir
de **20/12/2018.**

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

INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium*
spp. EM ESPÉCIES DE QUIRÓPTEROS DA CIDADE DE
MARINGÁ, PARANÁ

Luciana Prando
Zootecnista

ARAÇATUBA - SP
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium*
spp. EM ESPÉCIES DE QUIRÓPTEROS DA CIDADE DE
MARINGÁ, PARANÁ**

Luciana Prando

Orientadora: Prof^a. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani

Co-orientador: Dr. Weslen Fabricio Pires Teixeira

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2018

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Prando, Luciana.

P899i Investigação da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em
espécies de quirópteros da cidade de Maringá, Paraná /
Luciana Prando. - Araçatuba, 2018

53 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba

Orientadora: Profa. Katia Denise Saraiva Bresciani

Coorientador: Prof. Weslen Fabricio Pires Teixeira

1. Criptosporidiose 2. Microscopia 3. Oocistos
4. Reação em cadeia da polimerase 5. Quirópteros I. T.

CDD 636.0896

“Mudanças, aflições, anseios, lutas, desilusões e conflitos sempre existiram no caminho da evolução. Por isso mesmo, o mais importante não é aquilo que aconteça e sim o seu modo de reagir”.

“O mais importante”
Chico Xavier (André Luiz)

Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei

Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs

Tocando Em Frente
Almir Sater

Dedico,

Aos meus pais Wilson e Maria por terem me apoiado todos esses anos longe de casa e por muitas vezes abrirem mão de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, por sempre terem me dado força nas horas de dificuldade e sem os quais não estaria onde estou hoje.

Muito obrigada!

Homenagem especial

À minha querida vó Terezinha Aparecida (*in memorian*) que não pode estar comigo para presenciar a finalização de mais este trabalho e de quem fiquei longe por muito tempo. Espero que entenda... Muito obrigada por tudo, pelos valiosos ensinamentos, conselhos, cuidados, carinhos, risadas, cafés gostosinhos... Te amo!!

Agradecimento especial

Ao meu noivo, amigo e companheiro Weber Fernando Padilha pela imensa paciência em me fazer ver mais longe, pelo cuidado comigo e compreensão pela distância em busca dos meus sonhos. Muito obrigada! Eu te amo!

Agradecimento especial

Às minhas amigas-irmãs FuXica (Ana Paula) e Black (Thays) sempre me aconselhando, dando broncas, pela imensa paciência e por me fazer ver mais longe... pela ajuda fundamental nos momentos de dificuldades, sempre presentes. E mais uma vez aos seres humanos modificados: Xavaska e Xapolim, pelo companheirismo, carinho e pelos momentos engraçados e por me ajudarem de todas as formas que um ser humano pode ser ajudado. Obrigada por sempre estarem comigo, mesmo que à distância!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por todas as conquistas e por ter me concedido saúde e muita força de vontade para não desistir jamais de meus objetivos.

A minha família por ter me apoiado em todos esses anos longe de casa e por sempre ter me dado força nas horas de dificuldade, principalmente aos meus pais, sem os quais não estaria onde estou hoje e os quais, muitas vezes, abriram mão de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

A minha avó que sempre foi muito importante em minha vida e não pode estar junto nesse momento.

Ao Bilbo e ao Pelé pelo carinho incondicional e por ser sempre tão compreensivos e amigos, mesmo não sendo humanos.

A Judith e ao Fred pelo carinho incondicional e companhia constante, mesmo não sendo humanos. OBRIGADA À TODOS, AMO VOCÊS!

A minha grande família de Jaboticabal: Fuxica, Black e Giovani, por terem me apoiado e por sempre terem me dado forças nas horas de dificuldade, conselhos, muito obrigada à todos, AMO VOCÊS!

À minha orientadora Katia Denise Saraiva Bresciani pela orientação, disposição, paciência, por me ajudar sempre que precisei, pelo crédito e pela oportunidade. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Weslen Fabricio Pires Teixeira pela orientação, disposição, paciência, por toda ajuda e pelos valiosos ensinamentos. Muito obrigada!

Ao professor Marcelo Meireles Vasconcelos por estar sempre disposto a ajudar, por ceder seu laboratório para o processamento de minhas amostras e pelas valiosas sugestões. Muito obrigada!

À professora Maria Margareth Theodoro Caminhas por ter me concedido a oportunidade do estágio docência em sua disciplina de Genética Animal, pelas conversas, conselhos, por ter aceitado gentilmente participar da minha banca de qualificação e, pelas valiosas sugestões, muito obrigada!

A professora Valéria Savoya por ter aceitado gentilmente participar da minha banca de qualificação e, pelas valiosas sugestões, pela ajuda, ensinamentos e também pelos conselhos profissionais. Muito obrigada!

Ao professor Luiz Eduardo Corrêa Fonseca por ter aceitado fazer parte da banca de defesa deste trabalho e pelas valiosas sugestões, muito obrigada!

Ao professor Luiz da Silveira Neto por ter aceitado fazer parte da banca de defesa deste trabalho mesmo que à distância, pela paciência e ajuda de sempre, pelas valiosas sugestões, muito obrigada!

Ao professor Jancarlo Ferreira Gomes por ter aceitado fazer parte da banca de defesa deste trabalho e pelas valiosas sugestões, muito obrigada!

Ao professor Alex Akira Nakamura por ter aceitado fazer parte da banca de defesa deste trabalho, pela amizade e pelas valiosas sugestões, e ensinamentos muito obrigada!

À Jussara e ao Bernardo pelos momentos alegres e divertidos, pela hospedagem em Araçatuba, e pelas comidas deliciosas. Muito obrigada!

Ao Madox pela amizade e tolerância mesmo não sendo humano. Muito obrigada amiguinho!

À Cássia (cantina) pelos cafés, salgados e doces maravilhosos e pelas conversas nos momentos de solidão, muito obrigada!

Aos funcionários do laboratório de parasitologia da FMVA: Gilmara e Gustavo com quem aprendi muitas coisas. Muito obrigada!

À professora Tereza Cristina por ceder seu laboratório para o processamento de minhas amostras, muito obrigada!

À professora Janaina Gazarini pelas valiosas informações e ensinamentos sobre esses fascinantes animais, muito obrigada!

Ao Alexandre Polizel pela valiosa ajuda com a coleta das amostras, fotos de arquivo pessoal, informações e ensinamentos. Com certeza você fez a diferença! Muito obrigada!

Ao professor Daniel Cardia pelas valiosas informações e esclarecimentos sobre as amostras, muito obrigada!

Ao professor Estevam Guilherme Lux Hoppe pelas valiosas informações e esclarecimentos, muito obrigada!

Às minhas vizinhas de moradia (“as minas das kits”) Fernanda, Ana Carolina e Lilian pelas conversas e pela convivência nesses anos longe de casa, muito obrigada!

Agradeço aos funcionários da pós-graduação da FMVA pela colaboração sempre Isabella, Joelmir, Daniela e Élder.

Agradeço ao Alexandre Naba da Estaepe pela colaboração, ajuda e atenção de sempre. Muito obrigada!

Agradeço aos funcionários da biblioteca da FMVA pela colaboração e ajuda sempre Isabel (sempre me salvando), Fernando e Fátima.

Aos professores da FMVA, responsáveis pela base teórica e pela experiência de vida que nos transmitiram durante os anos do doutorado.

A Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, por me acolher nesses três anos. Muito obrigada!

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

Aos não menos importantes, os morcegos, esses animais fascinantes que possibilitaram a efetivação deste trabalho e todo o conhecimento adquirido estudando seus hábitos e espécies. Muito obrigada! Sem eles não seria possível!

E a todos os que de alguma forma colaboraram para a realização deste. Muito obrigada e imensa gratidão.

INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM ESPÉCIES DE QUIRÓPTEROS DA CIDADE DE MARINGÁ, PARANÁ

RESUMO – Este estudo foi elaborado com o objetivo de investigar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em quirópteros da região sul do Brasil. Cento e quarenta e sete amostras fecais de morcegos foram colhidas na cidade de Maringá (PR) e submetidas aos processos de purificação para a microscopia e extração de DNA genômico. A microscopia óptica de luz convencional foi utilizada com o uso da coloração negativa de verde malaquita para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e a PCR foi utilizada para a amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do rRNA na detecção de *Cryptosporidium* spp. A presença de *Cryptosporidium* spp. não foi constatada nas amostras fecais dos morcegos. Esse resultado pode ser considerado bom no aspecto que os morcegos são possíveis reservatórios e conseqüentemente, dispersores deste patógeno, sendo estes parques visitados diariamente por um grande número de pessoas. Esta é a primeira investigação do referido protozoário em morcegos nesta região.

Palavras-chave: Criptosporidiose, microscopia, oocisto, quirópteros, reação em cadeia da polimerase

INVESTIGATION OF THE OCCURRENCE OF *Cryptosporidium* spp. IN SPECIES OF CHIROPTERY OF THE CITY OF MARINGÁ, PARANÁ

ABSTRACT – This study was elaborated with the objective to investigate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in chiroptera of southern Brazil. One hundred and forty-seven fecal samples of bats were collected in the city of Maringá (PR) and submitted to purification processes for microscopy and extraction of genomic DNA. Optical microscopy of conventional light with negative malachite green staining was performed to investigate oocysts of *Cryptosporidium* spp. and PCR for the amplification of fragments of the 18S rRNA subunit gene in the detection of *Cryptosporidium* spp. This coccidium was not found in faecal samples of bats. This result can be considered good in the aspect that bats are possible reservoirs and consequently dispersers of this pathogen, being these parks visited daily by a large number of people. It is the first investigation of this protozoan into bats in this region.

Keywords: Chiroptera, cryptosporidiosis, microscopy, oocyst, polymerase chain reaction

2 Objetivo

Investigar por técnicas parasitológica e molecular a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em fezes de morcegos capturados em fragmentos florestais de perímetro urbano no município de Maringá, Estado do Paraná.

3 Referências

ABRAHAMSEN, M. S. et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v. 304, p.441- 445, 2004.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1007-1021, 2002.

ALVAREZ-PELLITERO, P. et al. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 62, p. 133-145, 2004.

ANDERSON, B.C. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. **American Journal of Public Health**, v. 75, p.133-1434, 1985.

ASHBOLT, N.J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, 229-238, 2004.

BAJER, A.; CACCIÒ, S.; BEDNARSKA, M.; BEHNKE, J.M.; PIENIAZEK, N.J.; SINSKI, E. Preliminary Molecular Characterization of *Cryptosporidium parvum* Isolates of Wildlife Rodents From Poland. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 1053-1055, 2003.

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.

BRANTLEY, R.K. et al. AIDS-Associated diarrhea and wasting in Northeast Brazil is associated with subtherapeutic plasma levels of antiretroviral medications and with both bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p.16- 22, 2003.

BROWNSTEIN, D. G. et al. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 606-617, 1977.

CHECKLEY, W. et al. 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. **Journal of Protozoology**, v. 33, p. 289-296, 1986.

CURRENT, W.L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Eds). **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRS, 1990. p. 31-49.

DILLINGHAMA, R.A.; LIMAB, A.A.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1059-1066, 2002.

DUBEY, J. P.; HAMIR, A.N.; SONN, R.J.; TOPPER, M.J. Cryptosporidiosis in a bat (*Eptesicus fuscus*). **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 622-623, 1998.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

EGYED, Z. et al. Polyphasic typing of *Cryptosporidium baileyi*: a suggested model for characterization of cryptosporidia. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 237-243, 2002.

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.

FALL, A.; THOMPSON, R.C.A.; HOBBS, R.P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**, v. 59, p. 399-402, 2003.

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

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

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

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 191-198, 2008.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. In animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 23-32, 2010.

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

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. et al. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1415–1422, 2001.

FENTON, M.B. **Bats**. New York: Facts On File, 1992. 207 p.

FUJINO, T. et al. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 199-200, 2002.

GELLETLIE, R. et al. Cryptosporidiosis associated with school milk. **Lancet**, v. 350, p. 1005-1006, 1997.

HOLUBOVÁ, N. et al. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. **Parasitology Research**, v. 115, p. 2243-2251, 2016.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 28, p. 13-35, 1979.

JEX, A.R. et al. *Cryptosporidium*: biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 304-317, 2008.

JIRKŮ, M. et al. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitologica**, v. 55, p. 81-94, 2008.

KVÁČ, M. et al. Novel *Cryptosporidium* bat genotypes III and IV in bats from the USA and Czech Republic. **Parasitology Research**, v. 114, p. 3917–3921, 2015.

KVÁČ, M. et al. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. **Veterinary Parasitology**, v. 201, p. 9-17, 2014.

KVÁČ, M. et al. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. **PLoS One**, v. 11, p. 1-24, 2016.

KVÁČ, M. et al. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). **Veterinary Parasitology**, v.191, p. 218-227, 2013.

LAKE, I.R. et al. Cryptosporidiosis decline after regulation, England and Wales, 1989-2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 623-625, 2007.

LEAV, B.A.; MACKAY, M.; WARD, H.D. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 906-913, 2003.

LI, X. et al. *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.

LINDSAY, D.S. et al. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Cattle, *Bos Taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 91-95, 2000.

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

MACKENZIE, W.R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 161-167, 1994.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 19, p. 197-204, 2010.

MIKICH, S. B. A dieta dos morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) de um pequeno remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 239-249, 2002.

MILLARD, P.S. et al. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v. 272, p.1592-1196, 1994.

MONGE, R.; CHINCHILLA, M. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 202-203, 1996.

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

MORGAN-RYAN, U. M. et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 433-440, 2002.

MORGAN, U. M. et al. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-neck parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 182-183, 2000a.

MORGAN, U. M. et al. The *Cryptosporidium* "Mouse" Genotype Is Conserved across Geographic Areas. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1302–1305, 1999.

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, p.1733-1751, 1999a.

MURAKOSHI; F. et al. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Eimeria* species in Philippine bats. **Parasitology Research**, v. 115, p. 1863-1869, 2016.

NOGUEIRA, M. R.; LIMA, I.P. de; MORATELLI, R.; TAVARES, V. de C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A.L. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, v. 10, p. 808-821, 2014.

OLIVEIRA, G. F. M. et al. Mussels (*Perna perna*) as bioindicator of environmental contamination by *Cryptosporidium* species with zoonotic potential. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, p. 28-33, 2016.

ORTEGA-MORA, L. M. et al. Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 3442-3445, 1992.

OSHIRO, E.T. et al. Prevalência de *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, p. 277-280, 2000.

PALOS LADEIRO, M.; AUBERT, D.; VILLENA, I.; A. GEFFARD, A.; BIGOT, A. Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): interest for water biomonitoring. **Water Research**, v. 48, p. 148-55, 2014.

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

PAVLÁSEK, I. et al. *Cryptosporidium varanii* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. **Gazella**, v. 22, p. 99-108, 1995.

PERACCHI, A. L. et al. Ordem Chiroptera. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nelio Hélio dos Reis, 2006. p.153- 230.

PEREIRA, M. D. et al. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 787-793, 2002.

PINHEIRO, M. da C. et al. Levantamento de enteroparasitos em morcegos através de técnica de centrífugo flutuação (Mammalia:Chiroptera) em área de Floresta Tropical. **Neotropical Helminthology**, v. 7, p. 143-147, 2013.

POWER, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium macropodum* n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern gray kangaroos (*Macropus giganteus*). **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1114-1117, 2008.

PUTIGNANI L.; MENICHELLA D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. **Interdisciplinary perspectives on infectious disease**. 2010. 39p. doi: 10.1155/2010/753512.

REID, A. et al. Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in marine fish. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 190-195, 2010.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil**. 1 ed, Londrina: Nelio Hélio dos Reis, 2007. 253 p.

REIS, N. R. dos; LIMA, I. P.; PERACCHI, A. L. Morcegos (Chiroptera) da área urbana de Londrina, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 739 - 746, 2006.

REIS, N. R. et al. Diversidade de morcegos (Chiroptera, Mammalia) em fragmentos florestais no estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, p. 697 – 704, 2000.

REIS, N. R. et al. Lista e chave de quirópteros do Parque Estadual Mata dos Godoy e arredores. Londrina-PR. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 4, p. 120-126, 1993.

REN, X. et al. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 274–281, 2012.

ROBINSON, G.; CHALMERS, R. M. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. e1-e13, 2010.

RYAN, U.M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 22–26, 2008.

RYAN, U. M. et al. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? **Water Research**, v. 105, p. 305-313, 2016.

RYAN, U. M. et al. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poeciliareticulata*). **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 31-35, 2015.

RYAN, U. M. et al. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v. 4, p. 769-773, 2004.

RYAN, U. M. et al. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 809-813, 2003.

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

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

SCHILLER, S. E.; NARELLEWEBSTER, K.; POWER, M. Detection of *Cryptosporidium hominis* and novel *Cryptosporidium* bat genotypes in wild and captive *Pteropus* hosts in Australia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, p. 254-260, 2016.

SILVA, M. M. S. et al. Bats from the metropolitan region of São Paulo, southeastern Brazil. **Chiroptera Neotropical**, v. 2, p. 39-41, 1996.

SIMMONS, N.B. Order Chiroptera. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3.ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press., 2005. v. 1, p.312-529.

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

SMITH, H. V. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 29-40, 2007.

SMITH, H. V. et al. 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.

TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archive fur Protistenkunde**, v. 26, p. 394- 412, 1912.

TYZZER, E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v. 23, p. 487-509, 1910.

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.

VETTERLING, J. M. et al. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the Guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. **Journal of Protozoology**, v. 18, p. 243-247, 1971.

WANG, W. et al. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* in Bats from Yunnan Province, Southwestern China. **Journal of Parasitology**, v. 99, p. 1148-1150, 2013.

XIAO L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, v.124, p.80–89, 2010.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: ORTEGA, Y. R. **Foodborne parasites**. New York: Springer verlag, 2006.

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

XIAO, L. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 72-97, 2004.

XIAO, L. et al. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3386-3391, 1999b.

XIAO, L. et al. Host adaptation and host-parasite coevolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1773-1785, 2002.

XIAO, L. et al. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5492-5498, 2000.

XIAO, L. et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1578-1583, 1999a.

YODER, J.S. et al. 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.

ZIEGLER, P. E. et al. *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York city watershed. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, p. 586-596, 2007a.

ZIEGLER, P. E. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 176-184, 2007b.

CAPÍTULO 2 – INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM ESPÉCIES DE QUIRÓPTEROS DA CIDADE DE MARINGÁ, PARANÁ

RESUMO: A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em Megaquiróptera (raposas voadoras) foi amplamente relatada. Entretanto, a presença desse parasito em Microquiróptera ainda não havia sido investigada no Brasil. Nosso objetivo foi investigar a presença de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de quirópteros capturados em fragmentos florestais de perímetro urbano do município de Maringá, Paraná. Um total de 147 amostras fecais de quinze espécies de quirópteros, com diferentes hábitos alimentares, sexos e categorias de idade foram obtidas por conveniência em fragmentos florestais de perímetro urbano. Para a identificação de *Cryptosporidium* spp. foi realizado exame parasitológico de fezes pela técnica de centrifugo flutuação em sacarose. Em seguida foram realizadas a microscopia ótica de luz convencional e a PCR, para amplificação do fragmento da subunidade do gene 18S rRNA em todas amostras. *Cryptosporidium* spp. não foi encontrado em nosso estudo. Entretanto, este achado é positivo sendo o primeiro estudo investigando a ocorrência deste parasito em área urbana na cidade de Maringá e, visto que os quirópteros são possíveis reservatórios e dessa forma, dispersores desse protozoário.

Palavras-chave: Coccídios, quirópteros, reação em cadeia da polimerase, saúde pública.

CHAPTER 2 - INVESTIGATION OF THE OCCURRENCE OF *Cryptosporidium* spp. IN SPECIES OF CHIROPTERY OF THE CITY OF MARINGÁ, PARANÁ

ABSTRACT: The occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Megachiroptera (flying foxes) has been widely reported. However, the presence of this parasite in Microchiroptera had not yet been investigated in Brazil. Our objective was to investigate the presence of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples of chiroptera caught in forest fragments in urban perimeter in the municipality of Maringá, Paraná. A total of 147 faecal samples from fifteen species of chiroptera, with different eating habits, gender and age categories were obtained for convenience in forest fragments of urban perimeter. For the identification of *Cryptosporidium* spp. parasitological examination of faeces by the centrifugal flotation technique in sucrose. Then, conventional light optical microscopy and PCR were performed for amplification of the 18S rRNA gene subunit fragment in all samples. *Cryptosporidium* spp. was not found in our study. However, is the first investigation of the occurrence of this parasite in an urban area in the city of Maringá and, since the bats are possible reservoirs and, thus, dispersers of this protozoan.

Keywords: Bats, coccidia, polymerase chain reaction, public health.