

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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


AUTORA: LUCIANA PRANDO

ORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

COORIENTADOR: WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA

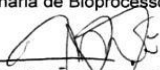
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


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


Prof. Dr. LUIZ EDUARDO CORRÊA FONSECA
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. LUIZ DA SILVEIRA NETO
Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Universidade Federal do Tocantins - Câmpus de Gurupi


Prof. Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente / Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Araçatuba, 20 de junho de 2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: LUCIANA PRANDO

ORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

COORIENTADOR: WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora 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 - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. LUIZ EDUARDO CORRÊA FONSECA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Luiz da Silveira Neto

Prof. Dr. LUIZ DA SILVEIRA NETO

Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Universidade Federal do Tocantins - Câmpus de Gurupi

Prof. Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente / Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Araçatuba, 20 de junho de 2018.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LUCIANA PRANDO - nasceu em 11 de agosto de 1978, na cidade de São Paulo – SP, filha de Maria Angelina Prando e Wilson Roberto Prando. Em dezembro de 2008, obteve o grau de Zootecnista pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus Jaboticabal – SP. Em agosto de 2009, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus Jaboticabal – SP, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Sandra Aidar de Queiroz, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e obteve o título de Mestre aos 20 de outubro de 2011. Em agosto de 2015, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, Campus Araçatuba – SP, sob a orientação da Prof^a. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani, sendo bolsista de Doutorado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“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.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1 O gênero <i>Cryptosporidium</i> spp.	17
1.1 Classificação das Espécies do Gênero <i>Cryptosporidium</i> spp.	18
1.2 Ciclo Biológico	20
1.3 Importância em Saúde Pública.....	22
1.4 A Ocorrência em Morcegos	23
1.4.1 A Ordem Quiróptera	23
1.4.2 Detecção em Quirópteros	24
1.5 Diagnóstico.....	27
1.5.1 Detecção de oocistos	27
1.5.2 Método Molecular.....	27
2 Objetivo.....	28
3 Referências.....	28
CAPÍTULO 2 – INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE <i>Cryptosporidium</i> SPP. EM ESPÉCIES DE QUIRÓPTEROS DA CIDADE DE MARINGÁ, PARANÁ	41
1 Introdução.....	43
2 Material e Métodos	44
A colheita das amostras	44
Processamento e microscopia das amostras	48
Processamento e análise molecular.....	49
3 Resultados e Discussão	50
4 Conclusão.....	51
5 Referências.....	51

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

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 O gênero *Cryptosporidium* spp.

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. pertencem ao filo Apicomplexa, classe Gregarinomorpha, subclasse Cryptogregarina e família Cryptosporidiidae (RYAN, 2016). Anteriormente considerados parasitos de localização intracelular (BARTA; THOMPSON, 2006), atualmente considera-se que sua localização é epicelular (RYAN, 2016).

O ciclo biológico desse protozoário se completa em diferentes tipos de células epiteliais, como as do trato gastrointestinal, respiratório e urinário de diversas espécies de animais vertebrados (KVÁČ et al., 2016), causando doença clínica e subclínica (SANTIN, 2013), podendo ocasionar mortalidade (CHECKLEY et al., 2015).

Este protozoário foi observado pela primeira vez na mucosa gástrica de um camundongo, sendo nomeado *Cryptosporidium muris* (TYZZER, 1907). Atualmente, há descrições de espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, que acometem aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo o homem (HOLUBOVÁ et al., 2016).

A infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* spp. em animais era considerada rara e, em seres humanos foi descrita como uma infecção oportunista em indivíduos imunologicamente comprometidos na década de 80. Desde então, este coccídeo vem sendo considerado um importante agente etiológico causador de diarreia em seres humanos imunossuprimidos e também em alguns animais domésticos e selvagens (XIAO et al., 2004).

A criptosporidiose foi reconhecida como uma grave enfermidade disseminada por veiculação hídrica e alimentar que tem como agravantes a dificuldade de prevenção da contaminação ambiental e ausência de terapias eficazes (DILLINGHAMA et al., 2002). Devido à sua estreita relação com condições precárias de saneamento básico e à população com baixo poder aquisitivo, este protozoário foi incluído na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) (SAVIOLI et al.,

2006). Por não existirem dados da prevalência anual da enfermidade no mundo, a quantidade de pessoas infectadas é subestimada (YODER et al., 2012).

1.1 Classificação das Espécies do Gênero *Cryptosporidium* spp.

A classificação dos parasitos desse gênero vem sendo padronizada por meio do uso de métodos moleculares que, conjuntamente com estudos morfológicos, biológicos ou de especificidade por hospedeiros auxiliam na validação das espécies descritas (XIAO; CAMA, 2006).

Diversos autores identificaram várias espécies de *Cryptosporidium* em diferentes hospedeiros, sendo hoje descritos 29 espécies acometendo diferentes hospedeiros (Quadro 1).

Alguns genótipos podem apresentar características morfológicas muito semelhantes às de espécies já descritas, porém, diferem em sua composição genética (XIAO et al., 2002) e, por não haver informações sobre suas características biológicas, ainda não foram classificados como espécies.

Quadro 1- Espécies de *Cryptosporidium* descritas, seus principais hospedeiros e sítios de infecção

Autores	Local	Principais Hospedeiros*	Espécies de <i>Cryptosporidium</i>
TYZZER, 1907	EUA	Camundongo (E)	<i>C. muris</i>
TYZZER, 1910	EUA	Roedores, homem (E)	<i>C. muris</i>
TYZZER, 1912	EUA	Ruminantes, homem (ID)	<i>C. parvum</i>
SLAVIN, 1955	Escócia	Aves, homem (ID)	<i>C. meleagridis</i>
VETTERLING et al., 1971	EUA	Cobaio (ID)	<i>C. wrairi</i>
BROWNSTEIN et al., 1977	EUA	Lagartos, serpentes (E)	<i>C. serpentis</i>
ISEKI, 1979	Japão	Felinos, homem (ID)	<i>C. felis</i>
CURRENT et al., 1986	EUA	Aves (B, C, TR)	<i>C. baileyi</i>
PAVLASEK et al., 1995	República Checa	Lagartos (E)	<i>C. varanii</i>
PAVLASEK, 1999	República Checa	Aves (P)	<i>C. galli</i>
LINDSAY et al., 2000	EUA	Bovinos (A), homem (ID)	<i>C. andersoni</i>
FAYER et al., 2001	EUA	Caninos, homem (ID)	<i>C. canis</i>
ALVAREZ-PELLITERO, 2002	Espanha	Peixes (E)	<i>C. molnari</i>
MORGAN-RYAN et al., 2002	Austrália	Humanos (ID)	<i>C. hominis</i>
ALVAREZ-PELLITERO et al., 2004	Espanha	Peixes (ID)	<i>C. scophthalmi</i>
RYAN et al., 2004	Austrália	Suínos (ID, IG), homem (ID)	<i>C. suis</i>
FAYER et al., 2005	EUA	Bovinos (D)	<i>C. bovis</i>
FAYER et al., 2008	EUA	Bovinos (D)	<i>C. ryanae</i>
JIRKŮ et al., 2008	República Checa	Anfíbios (E)	<i>C. fragile</i>
POWER; RYAN, 2008	Austrália	Canguru gigante (D)	<i>C. macropodum</i>
RYAN et al., 2008	Austrália	Canguru vermelho (D)	<i>C. fayeri</i>
FAYER; SANTIN, 2009	EUA	Ovinos (D)	<i>C. xiaoi</i>
FAYER, 2010	EUA	Ruminantes, homem (ID)	<i>C. ubiquitum</i>
REN et al., 2012	China	Camundongo (ID)	<i>C. tyzzeri</i>
KVÁČ et al., 2013	República Checa	Suínos (D)	<i>C. scrofarum</i>
KVÁČ et al., 2014	República Checa	Ouriço (D)	<i>C. erinacei</i>
LI et al., 2015	EUA	Esquilos (D)	<i>C. rubeyi</i>
RYAN et al., 2015	Austrália	Lebiste (E)	<i>C. huwi</i>
HOLUBOVÁ et al., 2016	República Checa	Aves (C, I)	<i>C. avium</i>
KVÁČ et al., 2016	África	Roedor (E)	<i>C. proliferans</i>

*Principais sítios de infecção do parasito no hospedeiro: A-abomaso; B-bursa de Fabricius; C-cloaca; E-estômago; ID-intestino delgado; IG-intestino grosso; P-proventrículo; TR-trato respiratório; D-Desconhecido.

1.2 Ciclo Biológico

Os parasitos do gênero *Cryptosporidium* spp. possuem ciclo de vida monoxeno euroxeno, com seis estágios de desenvolvimento no hospedeiro, sendo muito semelhante ao de outros coccídios pertencentes à subordem Eimeriorina. A infecção é composta por: excitação dos oocistos, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede dos oocistos e esporogonia (XIAO; CAMA, 2006) (Figura 1).

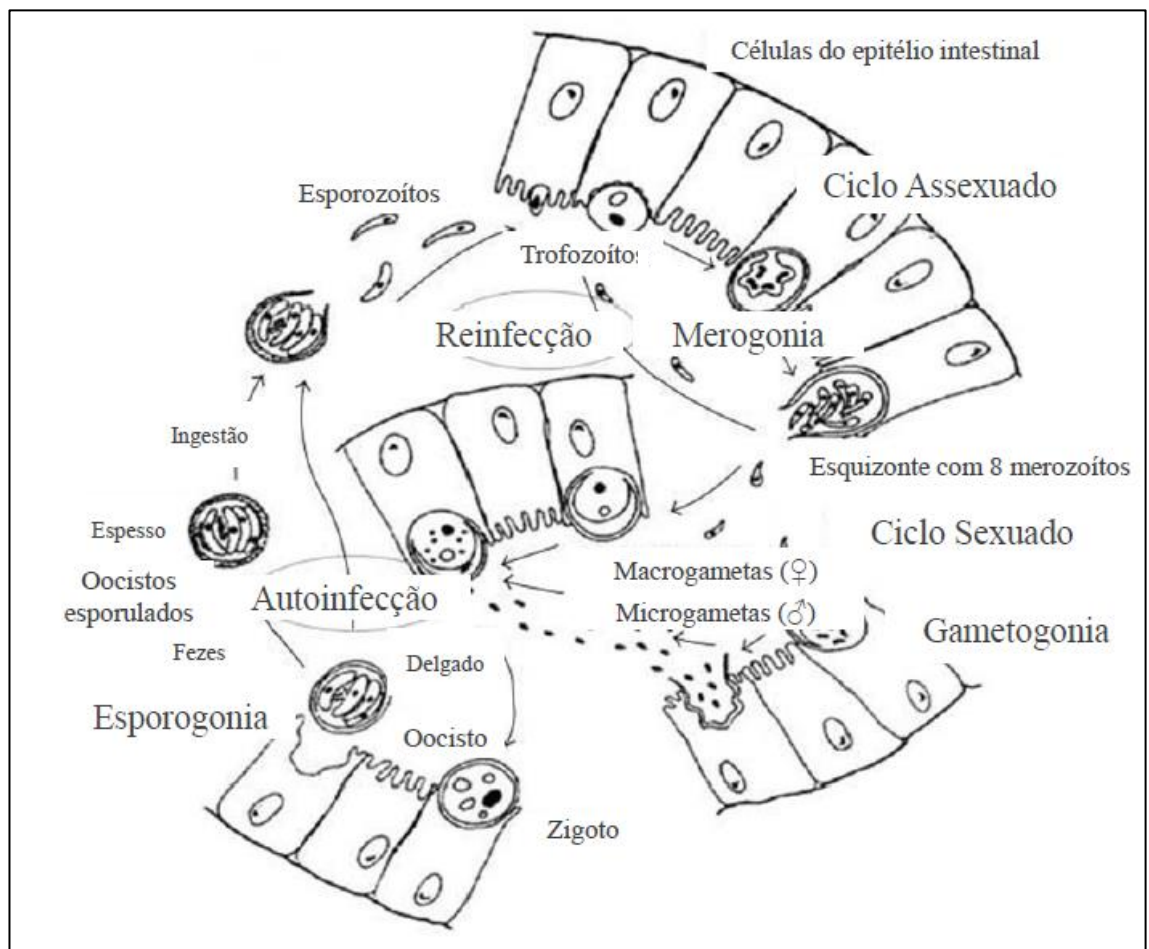


FIGURA 1- Ciclo biológico do gênero *Cryptosporidium* spp.
(Fonte: Adaptado de PUTIGNANI; MENCHELLA, 2010).

O ciclo tem início com a eliminação de oocistos esporulados nas fezes de animais infectados (DUBEY et al., 1990). Após ingestão dos oocistos ocorre a excitação, fase em que os quatro esporozoítos são liberados e se aderem à

superfície das células epiteliais do trato gastrintestinal (RYAN et al., 2016). Os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos, iniciando a reprodução assexuada ou merogonia (SMITH et al., 2007; XIAO et al., 2004).

Os trofozoítos podem dar origem aos merontes I e II. Os merozoítos do tipo I podem dar origem a novos merozoítos do tipo I ou do tipo II, enquanto que os do tipo II iniciam a fase sexual do ciclo ou gametogonia, quando ocorre a diferenciação em estágios masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas) (SMITH et al., 2007).

Após fertilização, o macrogameta desenvolve-se em zigoto, podendo formar oocistos de parede delgada, responsáveis por autoinfecção (capazes de iniciar um novo ciclo dentro do mesmo hospedeiro) ou então os oocistos de parede espessa, os quais são eliminados nas fezes e são resistentes às condições ambientais. A esporulação dos oocistos ocorre *in situ*, ou seja, logo após sua formação, sendo então eliminados em sua forma infectante, potencializando a possibilidade de infecção de novos hospedeiros (DUBEY et al., 1990).

A patogenia deste protozoário está relacionada com a elevada quantidade de oocistos excretada por seus hospedeiros de maneira intermitente, com sua baixa especificidade e diminuta dose infectante (a partir de 10 oocistos para *Cryptosporidium parvum*), além de seu tamanho reduzido, especificidade do hospedeiro e eliminação em sua forma esporulada (DILLINGHAMA et al., 2002; XIAO et al., 2004).

Os oocistos do gênero *Cryptosporidium* spp. eliminados no ambiente são sensíveis à dessecação e ao congelamento (FUJINO et al., 2002), mas são extremamente resistentes à ação do cloro utilizado no tratamento de água (XIAO et al., 2004), podendo permanecer viáveis no ambiente por meses (ANDERSON, 1985; FAYER et al., 1998).

1.3 Importância em Saúde Pública

Surtos de criptosporidiose em humanos já foram descritos em mais de 90 países, em seis continentes, principalmente pelo protozoário apresentar alta infectividade aliada à grande resistência em condições ambientais (XIAO et al., 2004).

A importância do parasito em Saúde Pública foi reconhecida a partir do surto de criptosporidiose ocorrido na cidade de Milwaukee (EUA), em 1993, um dos maiores da história, onde 403.000 pessoas apresentaram quadro de diarreia aguda atribuído à contaminação de água de consumo com oocistos (MACKENZIE et al., 1994).

A origem dos surtos de criptosporidiose em humanos pode ser tanto por veiculação hídrica quanto por ingestão de alimentos contaminados. Inúmeros estudos relataram a presença do parasito do gênero *Cryptosporidium* spp. contaminando a água de rios, lagos e mares e em organismos aquáticos (REID et al., 2010). Oocistos de *Cryptosporidium* foram identificados em leite (GELLETLIE et al., 1997), legumes e vegetais (MONGE; CHINCHILA, 1996; ORTEGA-MORA et al., 1992), alimentos industrializados, como bebidas (MILLARD et al., 1994) e em moluscos marinhos, como mexilhões (OLIVEIRA et al., 2016; PALOS LADEIRO et al., 2014).

As espécies que mais comumente infectam humanos são *C. parvum* e *C. hominis* (SMITH et al., 2006), com dois tipos de transmissão: a antroponótica e a zoonótica. A primeira envolve geralmente *C. hominis*, ocorrendo mais em áreas urbanas devido à grande densidade populacional, principalmente pelo contato fecal-oral (LAKE et al., 2007). Por sua vez a zoonótica, mais frequente com *C. parvum*, está associada principalmente aos ruminantes, e ocorre mais em áreas rurais (MORGAN et al., 1999a). No Brasil, algumas espécies com potencial zoonótico foram relatadas em humanos como *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* e *C. parvum* (MEIRELES, 2010).

Devido a maior susceptibilidade a infecções parasitárias, incluindo o *Cryptosporidium* spp., em humanos imunossuprimidos, a criptosporidiose é uma importante causa de letalidade e mortalidade, devido à facilidade de

transmissão e a inexistência de um tratamento efetivo (LEAV et al., 2003). Em crianças e pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida a infecção é mais importante, ocasionando altas taxas de mortalidade (BRANTLEY et al., 2003; OSHIRO et al., 2000; PEREIRA et al., 2002).

O estado imune do hospedeiro influencia na evolução e na patogenia da criptosporidiose em humanos, variando de diarreia autolimitante, em indivíduos imunocompetentes, a diarreia crônica em pacientes imunocomprometidos, podendo resultar em óbito (ABRAHAMSEN et al., 2004).

1.4 A Ocorrência em Morcegos

1.4.1 A Ordem Quiróptera

Os quirópteros são o grupo de mamíferos mais diversificados do mundo (SIMMONS, 2005) e dividem-se em duas subordens: os Megaquiroptera, popularmente conhecidos como raposas voadoras devido a similaridade de suas faces com as das raposas e, os Microquiroptera, representados por mais de 930 espécies, distribuídas por todo o globo, exceto nas regiões polares (SIMMONS, 2005).

Megaquiropteras não ocorrem no Brasil e estão representados por apenas uma família Pteropodidae com 150 espécies distribuídas na região tropical da África, Índia, sudeste da Ásia e Austrália (FENTON, 1992).

Microquirópteras habitam todo o território nacional, ocorrendo na Amazônia, no Cerrado, na Mata Atlântica, Pantanal, Nordeste, Pampa Gaúcho e até em áreas urbanas (REIS et al., 2007). No Brasil, são conhecidas nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies (REIS et al., 2006) e desempenham um importante papel no controle biológico em algumas populações de insetos, polinização e dispersão de sementes (MIKICH, 2002).

Apesar da relação entre estes mamíferos voadores e a possível dispersão de patógenos, os malefícios que os mesmos trazem são menores que os benefícios (REIS et al., 2006).

A falta de abrigos naturais, decorrente do desmatamento, associada à segurança dos ambientes urbanos e à alimentação abundante são aspectos que proporcionaram adaptação e a proximidade ao meio urbano (REIS et al., 2006). Entretanto, a adaptação desses indivíduos ao meio urbano representa um problema de Saúde Pública devido à carência de conhecimento sobre a biota e as endoparasitoses dos microquirópteros (PINHEIRO et al., 2013).

1.4.2 Detecção em Quirópteros

A primeira ocorrência de parasitos do gênero *Cryptosporidium* spp. em quirópteros foi em Oregon, Estados Unidos da América, em um indivíduo macho da espécie *Eptesicus fuscus* identificado como *C. parvum* (DUBEY et al., 1998). No ano seguinte, na Austrália, foi relatada outra ocorrência em um morcego do gênero *Myotis* (MORGAN et al., 1999).

O *C. parvum* foi identificado também em: *Myotis lucifugos*, *Myotis* spp. e *Eptesicus fuscus*, em Nova York, sendo a primeira ocorrência descrita de *Cryptosporidium* em *Myotis lucifugos*, sugerindo a participação ativa de quirópteros do gênero *Myotis* como hospedeiros deste protozoário (ZIEGLER et al., 2007b). No Brasil, não ocorrem quirópteros das espécies *M. lucifugos* e *M. adversus*. Entretanto, nove espécies do gênero *Myotis* spp. ocorrem em território brasileiro (NOGUEIRA et al., 2014).

Amostras de *C. parvum* provenientes de fezes de *Eptesicus fuscus* foram amplificadas e identificadas com alta similaridade com as de isolados de águas pluviais, sugerindo a contaminação ambiental de efluentes por esses mamíferos voadores e participação ativa de quirópteros deste gênero como hospedeiros e possíveis dispersores deste protozoário (ZIEGLER et al., 2007a).

Os genótipos *Cryptosporidium* Bat I e Bat II foram identificados nas espécies *Rhinolophus sinicus*, *Rusettus leschenaultia*, *Aselliscus stoliczkanus* e *Hipposideros fulvus*, sendo o genótipo I com similaridade filogenética ao

Cryptosporidium canis e, o tipo II ao *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium muris* (WANG et al., 2013). Importante salientar que o *C. canis* e o *C. muris* já foram relatados infectando seres humanos (XIAO, 2010).

Alguns estudos identificaram espécies de *Cryptosporidium* spp. e genótipos Bat em megaquirópteros e microquirópteros em diversos locais (Quadro 2 e 3).

Quadro 2 - Espécies de *Cryptosporidium* descritas em microquirópteros em diversos países

Autores	Local	Hospedeiro (Gênero)	Parasito
DUBEY et al., 1998	EUA	<i>Eptesicus fuscus</i>	
MORGAN et al., 1999	Austrália	<i>Myotis</i> spp.	<i>Cryptosporidium parvum</i>
ZIEGLER et al., 2007b	Nova York	<i>Eptesicus fuscus</i> e <i>Myotis</i> spp.	

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. foi observada em microquirópteros como *Eptesicus fuscus* (DUBEY et al., 1998; ZIEGLER et al., 2007a), *Myotis adversus* (FAYER, 2004; MORGAN et al., 1999), *Myotis* spp. (KVÁČ et al., 2015) sendo infectados por *C. parvum*, importante espécie zoonótica.

Em megaquirópteros dos gêneros *Rhinolophus* spp., *Aselliscus* spp.; *Pipistrellus* spp.; *Pteropus* spp.; *Hipposideros* spp. foram identificadas 11 espécies diferentes de *Cryptosporidium* denominadas genótipos Bat I a XI apresentando similaridade filogenética com espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* spp. (SCHILLER et al., 2016).

Quadro 3 - *Cryptosporidium* genótipos Bat descritos em quirópteros em locais diversos

Autores	Local	Hospedeiros		<i>Cryptosporidium</i>
		Família	Gênero	
WANG et al., 2013	Província de Yunann	Rhinolophidae	<i>Rhinolophus</i>	Genótipo Bat I*
		Hipposideridae	<i>Ascelliscus</i>	Genótipo Bat I*
		Pteropodidae	<i>Rousettus</i>	Genótipo Bat II*
		Hipposideridae	<i>Hipposideros</i>	Genótipo Bat II*
		Pteropodidae	<i>Ptenochirus</i>	Genótipo Bat II*
KVÁČ et al., 2015	EUA e República Checa	Vespertilionidae	<i>Eptesicus</i>	Genótipo Bat III
		Vespertilionidae	<i>Pipistrellus</i>	Genótipo Bat IV
MURAKOSHI et al., 2016	Filipinas	Pteropodidae	<i>Eonycteris</i>	Genótipo Bat V
		Pteropodidae	<i>Cynopterus</i>	Genótipo Bat VI
		Rhinolophidae	<i>Rhinolophus</i>	Genótipo Bat VII
SCHILLER et al., 2016**	Austrália	Pteropodidae	<i>Pteropus</i>	Genótipo Bat VIII
		Pteropodidae	<i>Pteropus</i>	Genótipo Bat IX
		Pteropodidae	<i>Pteropus</i>	Genótipo Bat X
		Pteropodidae	<i>Pteropus</i>	Genótipo Bat XI

*genótipo I: similaridade filogenética ao *C. canis* e o genótipo II: *C. andersoni* e *C. muris*;
 **transmissão de *C. hominis* de humanos para morcegos em cativeiro.

Na Austrália foi relatada a transmissão de *C. hominis* de humanos para morcegos em cativeiro, indicando as raposas voadoras como potenciais reservatórios de patógenos zoonóticos importantes em saúde pública (SCHILLER et al., 2016).

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. foi observada em micro quirópteros como *Eptesicus fuscus* (DUBEY et al., 1998; ZIEGLER et al., 2007a), *Myotis adversus* (FAYER, 2004; MORGAN et al., 1999), *Myotis* spp. (KVÁČ et al., 2015) sendo infectados por *C. parvum*, importante espécie zoonótica.

Assim, os quirópteros de modo geral são possíveis reservatórios e, dessa forma, dispersores de *Cryptosporidium* spp., demonstrando a necessidade de compreender a relação parasito-hospedeiro-ambiente

1.5 Diagnóstico

1.5.1 Detecção de oocistos

Uma das técnicas mais utilizadas na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais é o método de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (CURRENT, 1990). Assim, os oocistos desse protozoário são visualizados como corpos brilhantes contendo grânulos negros, quando visualizados em contraste de fase (SRÉTER; VARGA, 2000).

Outras técnicas microscópicas utilizadas para diagnóstico são a coloração com verde malaquita (ELLIOT et al., 1999) e a coloração de Kinyoun (MA; SOAVE, 1983).

Os oocistos são muito pequenos (4-6 μm) e possuem pequena variação morfológica ou são mesmo idênticos entre as diferentes espécies, sendo de difícil visualização. Dessa forma, não é possível a definição da espécie somente pela análise morfológica (FALL et al., 2003; FAYER et al., 2000).

1.5.2 Método Molecular

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é o método mais confiável de diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium* spp. dentre as técnicas baseadas em biologia molecular, sendo caracterizada pela alta sensibilidade e especificidade, seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados, permitindo a diferenciação entre as diferentes espécies de *Cryptosporidium* (JEX et al., 2008).

O *locus* mais utilizado é a subunidade 18S do gene do RNA ribossômico (18S rRNA), por apresentar menor polimorfismo, evolução mais lenta e cinco cópias por genoma, sendo escolhido para o uso em amostras de animais que possam estar infectados por espécies ou genótipos ainda não classificados (MORGAN et al., 2000; XIAO et al., 1999a; 2000a).

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 centrífugo 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.

1 Introdução

O *Cryptosporidium* spp. é um protozoário que infecta seres humanos, bem como animais domésticos e selvagens, sendo incluído pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na “Iniciativa das Doenças Negligenciadas”, na qual estão incluídas enfermidades bacterianas, parasitárias e virais que acometem o homem (SAVIOLI et al., 2006). Os sinais clínicos da criptosporidiose em humanos variam de acordo com a imunidade do hospedeiro, espécie de *Cryptosporidium* spp. e dose infectante, sendo particularmente importante em pacientes imunocomprometidos, podendo resultar em óbito (ABRAHAMSEN et al., 2004). Em crianças, a infecção está associada a episódios de diarreia prolongada, levando à má absorção e diminuição do crescimento (CHECKLEY et al., 2015).

Várias espécies de *Cryptosporidium* também foram relatadas em aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo quirópteros e humanos (FAYER et al., 2010; ROBINSON et al., 2010; KVÁČ et al., 2013; 2014; 2016; LI et al., 2015; RYAN et al., 2015; HOLUBOVÁ et al., 2016). Os seres humanos são infectados, principalmente por *Cryptosporidium hominis* ou por *Cryptosporidium parvum*, sendo esse de maior potencial zoonótico (FAYER et al., 2000; MILLARD et al., 1994; PREISER et al., 2003; SULAIMAN et al., 1998).

A ocorrência de *Cryptosporidium* foi descrita em quirópteros, os quais são divididos em duas subordens: Megaquiróptera e Microquiróptera, representadas pelas raposas-voadoras (gênero *Pteropus*) e morcegos menores, respectivamente (FENTON, 1992; SIMMONS, 2005). Quase todas as famílias de Microquiróptera são encontradas no Brasil e apresentam uma dieta exclusivamente composta por diversos insetos, incluindo vetores de doenças aos seres humanos e animais (REIS et al., 2007).

C. parvum teve sua ocorrência documentada nas duas subordens de quirópteros: Megaquiróptera e Microquiróptera. O protozoário foi encontrado no megaquiróptero da espécie *Eptesicus fuscus* (DUBEY et al., 1998) e no microquiróptero da espécie *Myotis adversus* (MORGAN et al., 1999), nos EUA e na Austrália, respectivamente.

Em megaquirópteros foram descritas 11 espécies de *Cryptosporidium* genótipo Bat em dez gêneros distintos, sendo alguns destes com transmissão de *Cryptosporidium hominis* de humanos para morcegos australianos em cativeiro. Entretanto, novas pesquisas sobre os potenciais impactos e a ocorrência de transmissão de *Cryptosporidium* spp. são necessárias para compreender melhor as vias de transmissão e impactos na saúde para esses quirópteros (SCHILLER et al., 2016).

Os quirópteros são possíveis reservatórios e dessa forma, dispersores de *Cryptosporidium* spp. demonstrando a necessidade de pesquisas para compreensão da relação parasito-hospedeiro-ambiente.

Estudos sobre quirópteros realizados no Estado do Paraná demonstram a riqueza de espécies de microquirópteros nesta região (REIS et al., 2000; 2006; 2012; ZANON et al., 2007; GAZARINI et al., 2013).

Assim, em nosso trabalho investigamos a ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras fecais de microquirópteros capturados em fragmentos florestais de área urbana do município de Maringá, Estado do Paraná utilizando exame parasitológico de fezes, microscopia e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a detecção de *Cryptosporidium*.

2 Material e Métodos

A colheita das amostras

Um total de 147 amostras de fezes de morcegos de 15 espécies, sexos e hábitos alimentares foi colhido por amostragem por conveniência em quatro fragmentos florestais: **Horto Florestal Dr. Luiz Teixeira Mendes**, localizado entre as coordenadas geográficas de 23°26'5"S e 51°57'51"O, altitude de 589 metros e área de 368.300 m²; **Parque do Ingá**, Unidade de Conservação urbana, situada na região central do município de Maringá/PR, entre as coordenadas geográficas 23°25'28"S e 51°55'59" O, com altitude de 557 metros e área de 474.300 m²; **Parque Florestal dos Pioneiros (Bosque II)**, localizado na região central de Maringá, nas coordenadas geográficas de

23°25'47"S e 51° 56'30" O, com altitude de 524 metros e área de 594.400 m² e **Parque das Palmeiras**, localizado entre a Avenida São Judas Tadeu e a rua Flamboyant, nas coordenadas geográficas de 23°23'08"S e 51°56'21"O, com altitude de 499 metros e área de 61.434,48 m².

Os quatro fragmentos florestais estão localizados na área urbana do município de Maringá, Estado do Paraná, localizado na região sul do Brasil (Figura 1).

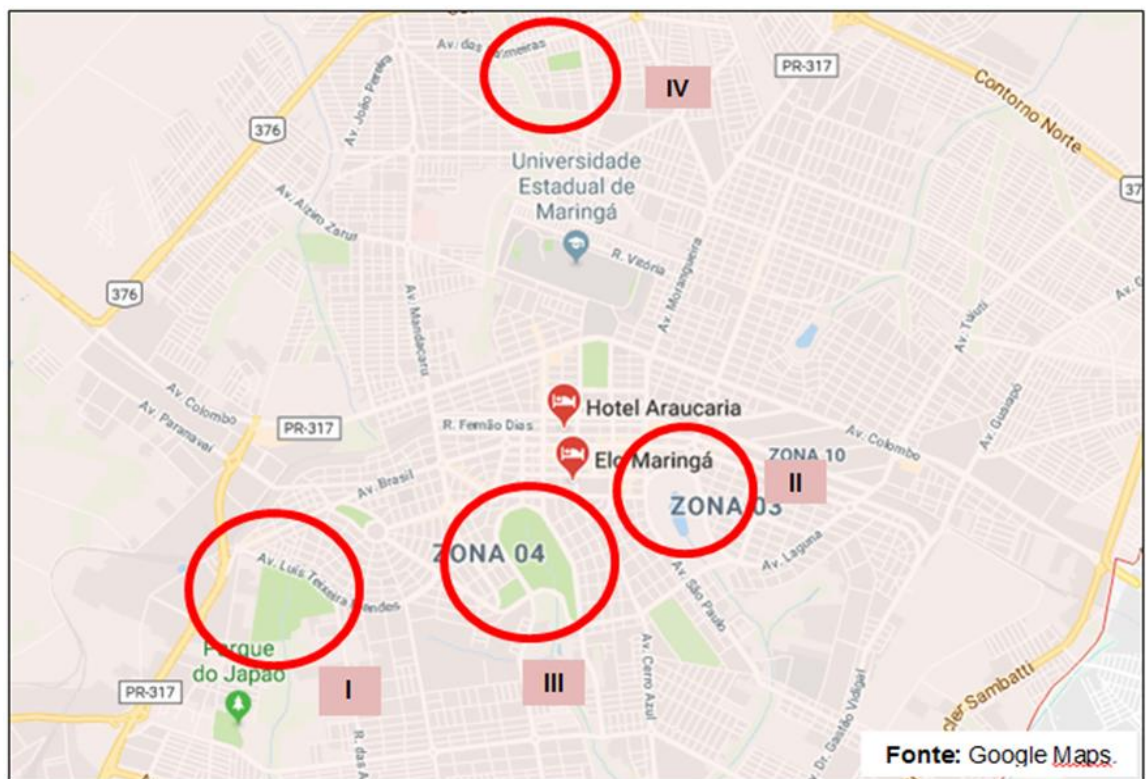


FIGURA 1- Mapa dos fragmentos florestais de perímetro urbano da colheita das amostras em Maringá, PR: (I) Horto Florestal (II) Parque do Ingá; (III) Parque Florestal dos Pioneiros (Bosque II) e (IV) Parque das Palmeiras

As colheitas foram realizadas em expedições aos finais de semana (do crepúsculo de sexta-feira ao amanhecer do sábado) (Quadro 1).

Quadro 1- Colheitas das amostras de acordo com os locais das expedições realizadas em finais de semanas alternados

Sítio de Colheita	Finais de Semana											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Horto Florestal	X				X				X			
Bosque II		X				X				X		
Parque do Ingá			X				X				X	
Parque das Palmeiras				X				X				X

A amostragem dos morcegos foi realizada em doze noites, utilizando-se oito redes de nylon com 9,0 x 3,0 m, dispostas 30 metros de distância uma das outras (GREENHALL; PARADISO, 1968) e a 0,5 m acima do solo, respeitando os corredores de voo. As redes foram instaladas no crepúsculo e recolhidas ao amanhecer nas quatro áreas de colheita, permanecendo armadas por períodos de 12 horas por noite (ESBÉRARD; BERGALLO, 2005) e, vistoriadas a cada meia hora. Por abranger tanto espécies com picos de atividade em torno do pôr-do-sol, bem como espécies que apresentam padrão de atividade diária bimodal, próximo do pôr-do-sol e do amanhecer, a colheita com esforço de 12 horas é mais indicada para tais estudos (ESBÉRARD; BERGALLO, 2005).

Os morcegos capturados foram contidos manualmente e mantidos confortavelmente em sacos de algodão até momento da triagem. Estes permaneciam contidos no máximo 30 minutos para defecarem. Entretanto, se não houvesse a eliminação de fezes neste tempo, estes eram liberados (CONCEA, 2016).

Na triagem, foram realizadas a identificação da espécie (VIZOTTO; TADDEI, 1973; GREGORIN; TADDEI, 2002; MIRANDA et al., 2011) e o arranjo taxonômico (GARDNER, 2008), a idade categorizada para cada indivíduo (jovem e adulto) (ANTHONY, 1988), além de sexo e peso (Quadro 2).

Quadro 2- Distribuição do número de espécies de quirópteros analisados de acordo com a taxonomia, idade categorizada, sexo e guildas (frugívoro, onívoro, herbívoro, piscívoro e insetívoro) preferenciais

Taxonomia	Jovens		Adultos		Total	Guildas
	M	F	F Pre	Lac		
Subfamília Stenodermatinae						
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	11	24	02	07	44	frugívoro
<i>Artibeus fimbriatus</i> (Gray, 1838)	04	03	01	-	08	
<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	06	-	01	-	07	
<i>Artibeus planirostris</i> (Spix, 1823)	02	01	01	-	04	
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (E. Geoffroy, 1810)	-	01	-	-	01	
<i>Sturnira tildae</i> (de la Torre, 1959)	01	-	-	-	01	
<i>Sturnira lilium</i> (E. Geoffroy, 1810)	11	12	02	05	30	
Subfamília Phyllostominae						
<i>Phyllostomus hastatus</i> (Pallas, 1767)	03	01	01	01	06	onívoro
Subfamília Carolliinae						
<i>Carollia perspicillata</i> (Linnaeus, 1758)	-	02	-	-	02	herbívoro
Família Noctilionidae						
<i>Noctilio leporinus</i> (Linnaeus, 1758)	01	-	-	-	01	piscívoro
Família Myotinae						
<i>Myotis nigricans</i> (Schinz, 1821)	01	-	-	02	03	insetívoro
<i>Myotis ruber</i> (E. Geoffroy, 1806)	-	01	-	-	01	
Família Molossidae						
<i>Molossops neglectus</i> (Williams & Genoways, 1980)	01	-	-	-	01	insetívoro
<i>Molossus molossus</i> (Pallas, 1766)	05	-	-	04	09	
<i>Molossus rufus</i> (E. Geoffroy, 1805)	06	23	-	-	29	
15 Espécies	52	68	08	19	147	5

M= macho; F= fêmea; Pre= prenhe; Lac= lactante.

Os morcegos capturados foram identificados no dactilopatágio com pasta branca, utilizando-se uma tatuadora para coelhos. Este procedimento foi realizado após a colheita das fezes e foi necessário para evitar as recapturas (amostras repetidas) e estresse. As amostras fecais obtidas foram

armazenadas em microtubos de 2 mL e conservadas em dicromato de potássio 5%, a 4°C até o momento do processamento.

A nossa pesquisa foi conduzida somente após a aprovação pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (número: 59440-1) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), UNESP, Campus de Araçatuba (Processo FOA nº 00775-2017). Todos os procedimentos foram feitos por profissionais treinados que utilizaram equipamentos de proteção individual. Todos os procedimentos citados foram realizados no local de captura dos morcegos.

Processamento e microscopia das amostras

As amostras fecais foram diluídas em água Milli-Q[®], homogeneizadas e submetidas à centrifugação 3.000g/ 10 min para a retirada do dicromato de potássio 5% em lavagens sucessivas. Na sequência, após descartar o sobrenadante, uma alíquota foi armazenada em microtubos de 1,5 mL, a -20°C para extração de DNA (ácido desoxirribonucleico) e em outra alíquota, armazenada em microtubos de 2 mL, acrescentou-se solução supersaturada de açúcar, na proporção de uma parte de sedimento para três partes de solução saturada de sacarose, homogeneizando-se e centrifugando-se em seguida a 1.200g/ 3 min (CURRENT, 1990).

Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante resultante da etapa anterior foi armazenada em um microtubo de 2 mL, onde adicionou-se 1,5mL de água Milli-Q[®], homogeneizando-se e centrifugando-se em seguida a 1.200g/ 3 min, até retirar toda a solução de açúcar.

Aos sedimentos resultantes foi adicionado dicromato de potássio a 5%, na proporção de três partes para uma parte de sedimento e armazenado para uso na microscopia ótica. Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi realizada a microscopia ótica por meio da coloração com Verde Malaquita (ELLIOT et al., 1999).

Processamento e análise molecular

A extração de DNA foi realizada com utilização do QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemanha) seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. A técnica molecular foi iniciada após descongelamento do DNA, acrescentando-se o reagente e colocando as amostras no termomixer digital a 99°C, por 1 hora.

Na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi executada a amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do rRNA (ácido ribonucleico ribossômico) para a detecção de *Cryptosporidium* spp.

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 fragmentos de 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 µM 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).

Para o controle positivo e negativo foram utilizados o DNA genômico de *C. parvum* e água Milli-Q[®], respectivamente. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed[®] (Biotium) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

3 Resultados e Discussão

Tanto pela microscopia ótica de luz convencional com a coloração negativa de verde malaquita, quanto pela PCR, não constatamos a infecção por *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais dos morcegos. A negatividade para esse parasito representa um aspecto positivo considerando que os oocistos de *Cryptosporidium* spp. quando eliminados nas fezes dos hospedeiros, podem contaminar águas superficiais ou de reservatórios (MACHADO et al., 2006; SMITH et al., 2007), sendo importantes veiculadores do protozoário, pela possibilidade de atingir um grande contingente de hospedeiros (LABERGE et al., 1996).

No Brasil, essa foi a primeira vez em que se pesquisou a ocorrência do *Cryptosporidium* spp. em uma grande variedade de espécies de microquiróptera, com hábitos alimentares diversos na região de Maringá, PR. A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. já havia sido identificada em algumas espécies de megaquiróptera (WANG et al., 2013; KVÁČ et al., 2015; SCHILLER et al., 2016) e microquiróptera (NOGUEIRA et al., 2014) em outros países.

Dois exemplares de *Myotis* spp. foram capturados em nosso estudo. Morcegos deste gênero são classificados como insetívoros aéreos de florestas e clareiras (REIS et al., 2007). O *C. parvum*, importante espécie zoonótica, já foi identificado infectando microquiróptera do gênero *Myotis* spp. na Austrália (MORGAN et al., 1999). Assim, como este microquiróptera já foi identificado parasitado por *Cryptosporidium* spp. zoonótico em outro continente, torna-se importante a pesquisa desse protozoário em morcegos desse gênero, que possuem nove espécies no Brasil (NOGUEIRA et al., 2014).

Em suínos, como em outros mamíferos, foi observada que a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente não é contínua (MATOS et al., 2016). Os morcegos apesar de terem sido tatuados, não eram identificados individualmente. Dessa forma, não foi possível colher amostras dos mesmos animais em datas intercaladas. Esta conduta foi realizada levando-se em consideração o bem estar animal, evitando o estresse (CONCEA, 2016).

Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente por esses animais seja intermitente.

A negatividade em nossa pesquisa pode estar atrelada a diversos fatores a serem explorados em estudos futuros. A possibilidade de inibidores em fezes de morcegos seria um ponto a ser explorado devido a carência de estudos de parasitoses nesses animais. Outro fator importante seria o hábito alimentar dos quirópteros que podem reduzir significativamente a possibilidade de infecção por *Cryptosporidium* spp.

4 Conclusão

Cryptosporidium spp. não foi detectado em nosso estudo. Esse achado é favorável, uma vez que os quirópteros são possíveis reservatórios e dessa forma, dispersores desse protozoário.

5 Referências

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

ANTHONY, E.L.P. Age determination in bats. In: KUNZ, T.H. (Ed.). **Ecological and behavioral for study of bats**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1988. 533p.

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.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Normativas do CONCEA para Produção, Manutenção e Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica**. 3

ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). 2016. 386p.

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.

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

DUBEY, J. P. et al. Cryptosporidiosis in a bat (*Eptesicus fuscus*). **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 622-623, 1998.

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.

ESBÉRARD, C.E.L.; BERGALLO, E.G. Coletar morcegos por seis ou doze horas a cada noite? **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, p. 1095-1098, 2005.

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.

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

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

GARDNER, A.L. Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats. In: GARDNER, A. L. **Mammals of South America**. Chicago: The University of Chicago Press, 2008. V. 1, 669 p.

GAZARINI, J.; PEDRO, W. A. Bats (Mammalia: Chiroptera) in urban fragments of Maringá, Paraná, Brazil. **Check List**, v. 9, p. 524 - 527, 2013.

GREENHALL, A.M.; PARADISO, J. L. **Bats and bat banding**. Washington, Bureau of Sport Fisheries and Wild. 47, 1968.

GREGORIN, R.; TADDEI, V. A. Chave artificial para identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). **Mastozoologia Neotropical**, v. 1, p. 13-32, 2002.

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

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.

LABERGE, I.; GRIFFITHS, M.W.; GRIFFITHS, M.W. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 1-26, 1996.

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.

MACHADO, E. C. L. et al. Effectiveness of *Cryptosporidium* spp. oocysts detection and enumeration methods in water and milk samples. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 432-439, 2006.

MATOS, D. J. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in pigs at weaning. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, p. 4157-4160, 2016. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n6p4157.

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

MIRANDA, J.M.D.; BERNARDI, I.P.; PASSOS, F.C. **Chave ilustrada para determinação dos morcegos da Região Sul do Brasil**. Curitiba: João M.D. Miranda. 2011. 51p.

MORGAN, U. M. et al. Variation in *Cryptosporidium*: Towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1733-1751, 1999.

NOGUEIRA, M. R. et al. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, v. 10, p. 808-821, 2014.

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

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.; 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. **Morcegos do Brasil**. 1 ed. Londrina: Nelio Hélio dos Reis, 2007, 253 p.

REIS, N. R. et al. Sensitivity of populations of bats (Mammalia: Chiroptera) in relation to human development in northern Paraná, southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 511-518, 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. et al. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 31-35, 2015.

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.

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

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.

SULAIMAN, I. M. et al. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 681-685, 1998.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. **Boletim de Ciências**, v. 1, p. 1-72, 1973.

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

ZANON, C. M. V.; REIS, N. R. Bats (Mammalia, Chiroptera) in the Ponta Grossa region, Campos Gerais, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, p. 327 - 332, 2007.