

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE**

***Cryptosporidium* spp. EM AVES SELVAGENS**

**BRASILEIRAS**

**Daniel Castendo Simões**  
**Médico Veterinário**

**ARAÇATUBA – SP**  
**2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE**

***Cryptosporidium* spp. EM AVES SELVAGENS**

**BRASILEIRAS**

**Daniel Castendo Simões**

**Orientador: Professor Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles**

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

ARAÇATUBA – SP  
2008

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**DANIEL CASTENDO SIMÕES** – nascido em 07 de outubro de 1975, em Santos, SP. É Administrador de Empresas formado pela Faculdade de Ciências Econômicas e Sociais da Universidade Católica de Santos em dezembro de 1998 e Médico Veterinário formado pela Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília em agosto de 2005. Trabalha na Fundação Educacional de Andradina desde 2007, onde atualmente ocupa o cargo de professor das disciplinas de Criação de Animais Silvestres e Microbiologia I e II.

## **Dedicatória**

Dedico.....

A Deus ,  
que é o responsável por qualquer vitória que  
eu alcance em minha vida.

A meus pais Augusto e Fátima, que me educaram  
nos moldes da humildade e honestidade.

A meus avós Raul Simões e Luz Ferreira Simões  
(In memoriam) que sempre me apoiaram em meus  
sonhos.

À minha esposa Adriana, que cuidou de mim  
durante este período de esforço e entrega,  
me ensinando a cada dia a ser uma pessoa  
melhor.

### **Agradecimentos**

À Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Campus de Araçatuba, por possibilitar a realização de um sonho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo 2005/53809-5) e pela bolsa de mestrado (processo 2005/57626-2).

Ao Professor Ass. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, pelo seu entusiasmo em transmitir o conhecimento com paciência e compreensão além de me oferecer a oportunidade de presenciar a rotina laboratorial, pesquisando e absorvendo conhecimentos relacionados as espécies de aves encontradas na natureza deste grande e belo país.

Aos professores do Programa de Mestrado em Ciência Animal pelo seu esforço e dedicação em tornar-nos profissionais qualificados e preparados para o desafio da transmissão do conhecimento.

Ao Conselho do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal que sempre nos incentivou e nos deu suporte para a realização dos projetos realizados no programa desta instituição.

Aos técnicos de Laboratório, trabalhadores da manutenção e da limpeza, desta unidade, que tem grande contribuição mantendo os laboratórios aptos à realização da pesquisa.

As funcionárias da Biblioteca pela sua índole aprazível e prestativa contribuindo nos momentos de pesquisa e estudo, bem como na confecção final desta dissertação.

Aos alunos e estagiários da graduação que trabalharam no Laboratório de Ornitopatologia que contribuíram para este experimento, e pelos momentos agradáveis de convivência, principalmente ao Rômulo Godik Antunes e Alex Akira Nakamura.

À Professora Assistente Doutora Cárís Maroni Nunes pela contribuição com o processamento de parte das amostras .

À Médica Veterinária Marta Brito Guimarães, responsável pelo atendimento no Ambulatório de Aves da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

Ao responsável pelo atendimento de animais silvestres do Hospital Veterinário da Faculdade de Odontologia da UNESP - Campus de Araçatuba, Professor Assistente Doutor Sérgio Diniz Garcia.

À responsável pelo Setor de Clínica de Animais Silvestres do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal Professora Assistente Doutora Karin Werther.

Ao Parque Zoológico Municipal de Bauru.

Ao Zoológico Municipal de São José do Rio Preto.

Ao Foz tropicana Parque das Aves.

Ao Aquário Municipal de Santos.

Ao Parque Zoobotânico Orquidário Municipal de Santos.

Ao Aquário do Guarujá.

Ao CETAS do parque ecológico do Tietê

Ao Parque Zoológico de Goiânia.

À Clínica de Medicina Veterinária de Animais Silvestres Vida Livre.

Ao criatório comercial de aves selvagens Kalu.

Aos criadores de aves selvagens e exóticas das cidades de Araçatuba e Birigui.

Ao amigo José Antônio Cabrerizo pela ajuda na rotina da sala de necropsia e pelos bons momentos de troca de idéias.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

## **Sumário**

|                                     | <b>Páginas</b> |
|-------------------------------------|----------------|
| Resumo                              | <b>9</b>       |
| Summary                             | <b>10</b>      |
| Capítulo 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS   | <b>11</b>      |
| 1.1 - Infecção em galinha doméstica | <b>14</b>      |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 1.2 - Infecção em perus          | 15 |
| 1.3 - Infecção em codornas       | 16 |
| 1.4 - Infecção em aves selvagens | 16 |
| 1.5 - Infecção em avestruzes     | 18 |
| 1.6 - Infecção em seres humanos  | 18 |
| Referências                      | 20 |

## Capítulo 2 - OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM AVES SELVAGENS BRASILEIRAS

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Summary                                                                    | 31 |
| Resumo                                                                     | 32 |
| 1 – Introdução                                                             | 33 |
| 2 - Material e Método                                                      | 34 |
| 2.1 - Amostras de fezes                                                    | 34 |
| 2.2 - Extração de DNA genômico                                             | 35 |
| 2.3 - Reação de Nested-PCR                                                 | 35 |
| 2.4 - Sequenciamento dos fragmentos amplificados                           | 35 |
| 2.5 - Alinhamento e tradução das seqüências de nucleotídeos e edição final | 35 |
| 3 – Resultados e Discussão                                                 | 36 |
| Referências                                                                | 38 |
| Tabela1 -                                                                  | 43 |
| Tabela 2                                                                   | 44 |
| Anexo 1                                                                    | 45 |



## **OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM AVES SELVAGENS BRASILEIRAS**

**Resumo** - Devido à escassez de informações referentes à ocorrência de *Cryptosporidium* em aves selvagens no Brasil, este projeto foi realizado visando à detecção de *Cryptosporidium* em amostras de fezes de várias espécies de aves selvagens da fauna brasileira, por meio da reação em cadeia de polimerase – “nested” (n-PCR). Um total de 488 amostras de 146 espécies de aves selvagens foi coletado em zoológicos, criatórios, Hospitais Veterinários e residências, para extração do DNA genômico de oocistos e realização de n-PCR, visando à amplificação de fragmentos dos genes da subunidade 18S do RNA ribossômico e da actina. Foi observada amplificação para *Cryptosporidium* em 20 (4,7%) das amostras examinadas. Por meio de sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados foram identificadas duas espécies de *Cryptosporidium*: *C. galli* em curiós (*Oryzoborus angolensis*) e *C. baileyi* em urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*).

**PALAVRAS-CHAVE:** Fauna, Brasil, Aves, *Cryptosporidium* spp, PCR.

## OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cryptosporidium* spp. IN WILD BIRDS FROM BRAZIL

**SUMMARY** - Due to the paucity of data related to the occurrence of *Cryptosporidium* in wild birds from Brazilian fauna, this research was accomplished in order to screen fecal samples from various species of wild birds in Brazil for the presence of *Cryptosporidium* by the use of nested polymerase chain reaction (n-PCR). A total of 488 fecal samples from 146 species of wild birds were collected in Zoos, Veterinary Hospitals, breeder's facilities and residences. After extraction of genomic DNA from oocysts n-PCR was accomplished for amplification of fragments from 18S subunit of the ribosomal RNA gene and from actin gene. Positive amplification for *Cryptosporidium* was obtained in 20 (4.09%) samples. Sequencing of amplified fragments allowed the identification of *C. galli* in lesser-seed finches (*Oryzoborus angolensis*) and *C. baileyi* in black vulture (*Coragyps atratus*).

**KEY WORDS:** Fauna, Brazil, birds, *Cryptosporidium* spp., PCR.

## CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes (CAREY et al., 2004; XIAO; RYAN, 2006).

Os relatos de criptosporidiose nos últimos 30 anos aumentaram consideravelmente em várias espécies animais e no ser humano, gerando, proporcionalmente, um aumento do número de pesquisas visando à elucidação de vários aspectos relacionados a essa parasitose, principalmente no que se refere à sua taxonomia, especificidade, epidemiologia, patogenia, diagnóstico e tratamento.

Através de experimentos utilizando-se transmissão cruzada entre espécies e, principalmente, técnicas de biologia molecular, como genotipagem e estudos filogenéticos, alguns autores sugerem a existência de pelo menos 16 espécies de *Cryptosporidium*: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. suis* e *C. wrairi* em mamíferos, *C. baileyi*, *C. meleagridis* e *C. galli*, em aves, *C. serpentis* e *C. saurophilum* em répteis e *C. molnari* e *C. scophthalmi* em peixes (ALVAREZ-PELLITERO et al., 2004; FAYER et al., 2005; LEAV et al., 2003; MORGAN et al., 2002; RYAN et al., 2003; RYAN et al., 2004; SITJÀ-BOBADILLA; ALVAREZ-PELLITERO, 2003; THOMPSON, 2002; TZIPORI; WARD, 2002; XIAO et al., 2004).

Existe ainda a classificação deste parasito como genótipos adaptados a diversos hospedeiros. Esses genótipos, apesar de morfologicamente semelhantes a algumas espécies já classificadas, diferem das mesmas em sua composição genética. Devido à ausência de dados relacionados a outras características biológicas desses isolados, ainda não foi possível sua classificação em nível de espécie (XIAO et al., 2002).

A identificação de outros coccídios como *Toxoplasma*, *Isospora*, *Eimeria*, *Sarcocystis* e *Caryospora* é realizada determinando as características biológicas, juntamente com análise da morfologia de oocistos, esporocistos e esporozoítos. A análise morfológica de oocistos do gênero *Cryptosporidium* não é definitiva para o diagnóstico, pois os oocistos são muito pequenos (4-8  $\mu$ m), com pequena

variação morfológica ou mesmo idênticos entre as diferentes espécies, sem esporocistos e difíceis de serem visualizados. Além disso, os antígenos presentes na parede de oocistos são conservados para todo o gênero *Cryptosporidium*, não permitindo a diferenciação entre espécies por testes imunológicos (FAYER et al., 2000).

A análise da especificidade por espécies é útil no estudo da taxonomia do gênero *Cryptosporidium*, mas requer grande quantidade de oocistos e disponibilidade de animais e instalações para manutenção das várias espécies a serem infectadas (FAYER et al., 2000). O único método de diferenciação confiável entre as espécies de *Cryptosporidium* é a caracterização genética dos isolados (MORGAN et al., 1999, SARGENT et al., 1998).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* é realizada mais comumente utilizando da reação em cadeia de polimerase e suas variantes, seguida da técnica de poliformismo no comprimento de fragmentos de DNA submetidos à digestão com enzimas de restrição (RFLP) ou a sequenciamento. O *locus* utilizado com mais frequência é o gene da subunidade 18S do rRNA, que apresenta cinco cópias por genoma e menor polimorfismo, pelo fato de apresentar evolução mais lenta, sendo portanto, o *locus* de escolha para amostras de animais que podem estar infectados por espécies ou genótipos ainda não classificados, como aves silvestres e exóticas. Outros *loci* que podem ser utilizados são aqueles com maior polimorfismo, como os genes da actina, da proteína gp-60 ou da proteína do choque térmico (HSP-70). Estes dois *loci* apresentam alto polimorfismo e, conseqüentemente, são muito úteis na análise genética de espécies ou genótipos geneticamente similares como o *C. baileyi* e *Cryptosporidium* sp. de avestruzes, ou mesmo, a subgenotipagem de amostras da mesma espécie, permitindo a detecção de variações intraespécies, que são extremamente importantes em estudos epidemiológicos (PENG et al., 2003; XIAO et al., 2004).

Após o primeiro relato de infecção em aves por Tyzzer(1929), *Cryptosporidium* spp. vem assumindo importância crescente para aves, com vários casos de infecções gastrintestinais, respiratórias e na bursa de Fabricius de aves domésticas e selvagens (SRÉTER; VARGA, 2000).

Em aves a criptosporidiose constitui-se em uma das principais infecções por protozoários, se manifestando como doença de curso agudo envolvendo o trato respiratório ou digestivo, sendo relatada em mais de 30 espécies de várias Ordens, como Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes e Struthioniformes, nas Américas do Sul e do Norte, na Europa, na África, na Ásia e na Oceania (SRÉTER; VARGA, 2000).

A infecção por *C. baileyi* é considerada como parte do complexo respiratório das aves, no qual há etiologia multifatorial envolvendo bactérias, vírus e protozoários, além de fatores ambientais (GOODWIN et al., 1996; SRÉTER; VARGA, 2000). O significado da infecção por *Cryptosporidium* no proventrículo, intestino e/ou bursa de Fabricius permanece indefinido para a maioria das espécies aviárias, embora o parasitismo intestinal possa provocar doença clínica e aumento da mortalidade em perus (SLAVIN, 1955) e codornas (HOERR et al., 1986).

Análises epidemiológicas têm indicado alta prevalência da infecção por *Cryptosporidium* em aves. Tzipori e Campbell (1981) encontraram, através do teste de imunofluorescência indireta, anticorpos contra o *Cryptosporidium* sp. em 88% (sendo 25 amostras com 22 sendo positivas) em galinha doméstica. Snyder et al. (1988), analisando soros de 18 lotes de frangos de corte, utilizando da técnica de ELISA indireta, encontraram, em média, 24% de animais positivos por lote.

Em estudo realizado por Goodwin e Brown (1988), 6,4% (sendo 68 positivos em um total de 1065 atendimentos) dos frangos de corte foram positivos para *Cryptosporidium* sp., sendo a criptosporidiose a segunda infecção por protozoários mais prevalente.

A ocorrência de *Cryptosporidium* em várias espécies de aves foi estudada também por Ley et al. (1988), através da coloração de esfregaços de fezes com a técnica da auramina O, observando-se positividade em 27 entre 197 frangos de corte, quatro entre 113 matrizes de corte, uma entre 75 poedeiras comerciais, um entre dois pavões, seis entre 33 psitacídeos e um entre dois anseriformes examinados.

No Brasil, há relatos de infecção por *C. baileyi* em galinha doméstica (CARDOZO et al., 2005; MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992), em avestruzes

(SANTOS et al., 2005) e em codornas e patos Huber et al. (2007). Jacobsen et al. (2006) relataram infecção por *Cryptosporidium* sp. em intestinos, bursa de Fabricius e traquéia de frangos, sem classificação da espécie de *Cryptosporidium*.

Em estudo epidemiológico mais recente, envolvendo várias espécies de aves na Austrália, Josephine et al. (2006) encontraram positividade de 6,25% para *Cryptosporidium*, em um total de 430 amostras de aves analisadas pela reação em cadeia de polimerase.

#### 1.1 - Infecção em galinha doméstica

Gorham et al. (1987) examinaram a incidência de criptosporidiose e aerossaculite em frangos de corte e correlacionaram a infecção por *C. baileyi* com o índice de mortalidade. Nesse estudo, *C. baileyi* foi encontrado, na bursa de Fabricius, em dois entre oito lotes pesquisados, sendo que os maiores índices de mortalidade foram observados nos dois lotes infectados.

Correlação semelhante foi efetuada por Snyder et al. (1988) que, pesquisando *C. baileyi* em 18 lotes de frangos de corte, observaram média de 24% (numero de animais) de aves positivas por lote. Os animais com sorologia negativa apresentavam relação, coincidente ou não, com melhor desempenho zootécnico, que poderia ser devido não somente à ausência de exposição a *C. baileyi*, mas também a um conjunto de medidas de manejo sanitário que impediram uma exposição a outros agentes etiológicos.

Goodwin et al. (1996), analisando a influência da traqueíte em frangos de corte, causada por *C. baileyi*, no desenvolvimento ponderal e condenação de carcaças em abatedouros, encontraram infecção por esta espécie em 10-60% dos lotes infectados, demonstrando assim correlação positiva entre o grau de traqueíte com o percentual de queda de ganho de peso, e também entre a presença de aerossaculite e a porcentagem de condenação de carcaças.

A influência da infecção por *C. baileyi*, após inoculação via oral ou intratraqueal, sobre os parâmetros zootécnicos de frangos de corte alojados em gaiolas, foi estudada por Meireles et al. (1998). Houve redução transitória do ganho de peso das aves infectadas, no período em que foi observada maior eliminação de oocistos nas fezes. Experimento semelhante foi realizado, tendo como diferencial o alojamento das aves em piso e a inoculação de *Escherichia*

*coli*, por via respiratória, sendo constatado que *C. baileyi* predispõe as aves à infecção secundária por *E. coli*, além de ser agente primário de enfermidade respiratória severa (MEIRELES et al., 1999).

Egyed et al. (2002) demonstraram, após infecção experimental via intratraqueal com *C. baileyi*, em galinhas, a presença de sintomas respiratórios como dispnéia e espirros e redução no ganho de peso. Neste mesmo experimento não houve comprometimento do ganho de peso nem sinais clínicos em aves inoculadas por via oral, apesar da presença do parasito em cloaca e bursa de Fabricius.

Na galinha doméstica são escassos os relatos de infecção natural no intestino delgado (GOODWIN, 1988; GOODWIN; BROWN, 1989), ceco (ITAKURA et al., 1984; TYZZER, 1929) e reto (GOODWIN; BROWN, 1989). Nestes relatos, a infecção era sempre assintomática.

## 1.2 - Infecção em perus

Slavin (1955) relatou infecção por *C. meleagridis* em perus, de 10 a 14 dias de idade, com quadro clínico de diarreia e mortalidade. Com auxílio de raspados de mucosas e cortes histológicos, o autor demonstrou o parasito em grande número no terço distal do intestino delgado.

Infecção no trato respiratório por *Cryptosporidium* sp. foi relatada por Glisson et al. (1984), em perus de sete semanas de idade, que apresentavam aumento de volume bilateral dos seios infra-orbitários, conjuntivite serosa e morbidade de 5 a 10%. À microscopia, os seios nasais estavam distendidos por 1-1,5ml de fluido viscoso, claro e espumoso. Lesões similares foram descritas por TARWID et al. (1985), em dois lotes de perus, de quatro a cinco semanas de idade, evidenciando-se à necropsia excesso de muco na traquéia e nos seios infra-orbitários, além de aumento de mortalidade.

A criptosporidiose intestinal em perus, após o relato de Slavin (1955), foi diagnosticada somente por Goodwin et al. (1988). As aves apresentavam diarreia e o intestino delgado distendido por gás e conteúdo mucoso. *Cryptosporidium* sp. foi encontrado nas porções média e distais do intestino delgado, concentrado nos dois terços distais das vilosidades e ausente nas criptas.

Gharagozlou et al. (2006) relataram infecção por *Cryptosporidium* sp. em 35,3% em perus de uma a sete semanas de idade, que apresentavam emaciação, diarreia, letargia e redução no ganho de peso; os oocistos foram visualizados nas criptas do epitélio intestinal, principalmente jejuno e íleo.

### 1.3- Infecção em codornas

O primeiro relato de criptosporidiose em codornas foi feito por Tham et al. (1982). Um lote de 1000 aves de quatro semanas de idade apresentava sinais clínicos caracterizados por depressão, espirros e dificuldade respiratória, com morbidade de 50% e mortalidade de 10%.

Alto índice de mortalidade foi registrado em codornas por Hoerr et al. (1986), em um lote de 2.500 animais. Em cinco lotes anteriores e sucessivos as aves apresentavam diarreia.

Murakami et al. (2002) relataram a presença de conjuntivite, traqueíte e sinusite com presença de *Cryptosporidium* sp. associado a *Mycoplasma* sp. em sete de 17 codornas de uma granja com 75.000 matrizes.

Cardozo et al. (2005) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* sp. em bursa de Fabricius e cloaca de codornas, após inoculação experimental com o protozoário proveniente de frangos naturalmente infectados.

### 1.4- Infecção em aves selvagens

Em patos já foi encontrada criptosporidiose associada à conjuntivite (MASON, 1986) e a sintomas respiratórios com presença de excesso de muco na traquéia, cavidade nasal e seios infra-orbitais (O'DONOGHUE et al., 1987).

Em pesquisa de oocistos em aves de vida livre Graczik et al. (1998) demonstraram que gansos (*Branta canadensis*), podem atuar como fonte de contaminação ambiental, pela eliminação de oocistos de *C. parvum* nas fezes.

Zhou et al. (2004) constataram que 23,4% de amostras de fezes de gansos (*Branta canadensis*) analisadas eram positivas para *Cryptosporidium* sp.. Entre as espécies identificadas estavam os genótipos I e II de ganso, genótipo de pato, *C. parvum* e *C. hominis*.

Mais recentemente, no Canadá, Jellison et al. (2004) identificaram mais cinco novos genótipos de *Cryptosporidium* em gansos (*Branta canadensis*),



nessa mesma espécie, foi encontrada prevalência de 81,8% a 90% de *Cryptosporidium* sp. nas amostras de fezes pesquisadas utilizando a técnica de imunofluorescência (KASSA et al., 2004).

Em relação à Ordem Psitaciformes, Doster e Mahafey (1979), mediante utilização de microscopias ótica e eletrônica, descreveram estágios evolutivos de *Cryptosporidium* sp. na cloaca de papagaios (*Amazona autumnalis*). Morgan et al. (2000) constataram infecção por *C. meleagridis* em epitélio das vilosidades do intestino delgado em um Periquito de coleira (*Psitacula krameri*). Infecção intestinal por *Cryptosporidium* sp. associada a sinais clínicos foi encontrada em periquitos australianos (*Melopsitacus undulatus*) (GOODWIN; KRABILL, 1989), espécies variadas de cacatuas (GOODWIN; KABRILL, 1989; LINDSAY et al., 1990) e , com alto índice de mortalidade, em *Agapornis* sp. (BELTON; POWEL, 1987).

Criptosporidiose no trato respiratório foi diagnosticada em um pavão (*Pavo cristatus*) de duas semanas de idade que apresentava tosse espirros e corrimento óculo-nasal (MASON; HARTLEY, 1980).

Em faisões de espécies variadas, *Cryptosporidium* sp. foi detectado no trato respiratório associado a problemas respiratórios e na conjuntiva associado a conjuntivite (RANDALL, 1986), sendo que em ambos os casos não foram isolados outros agentes patogênicos.

Ley et al. (1988), por meio da coloração de esfregaços de fezes, de várias espécies aviárias, com a técnica de Auramina O, relataram pela primeira vez a infecção por *Cryptosporidium* sp. em periquitos australianos (*Melopsitacus undulatus*), araras (espécie não citada no artigo) e cisnes da tundra (*Cygnus columbianus*).

Em tentilhões já foi encontrada infecção renal associada a *Cryptosporidium* sp. (GARDINER; IMES, 1984) e ainda, infecção no epitélio da mucosa dos ductos e das glândulas do proventrículo de aves com diarreia aguda (BLAGBURN et al., 1990). Esta espécie foi posteriormente classificada como *C. galli* (RYAN et al., 2003).

### 1.5 – Infecção em avestruzes

No estado de São Paulo foram encontrados avestruzes apresentando prolapso de cloaca, associado à mortalidade. Essas aves apresentavam infecção nos epitélios do reto, cloaca e bursa de Fabricius e oocistos com características morfológicas e moleculares (PCR-RFLP) semelhante às de *C. baileyi* (SANTOS et al., 2005). Análise molecular posterior demonstrou que o isolado de avestruz provavelmente representa uma nova espécie de *Cryptosporidium* relacionada filogeneticamente a *C. baileyi* (MEIRELES et al., 2006).

### 1.6 – Infecção em humanos

Infecção em humanos comumente é causada por uma espécie exclusiva do homem, *C. hominis* ou por *C. parvum*, caracterizando uma infecção zoonótica com inúmeros casos descritos na literatura (FAYER et al., 2000; MILLARD et al., 1994; PREISER et al., 2003; SULAIMAN et al., 1998; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002).

No entanto, por meio da utilização de técnicas de biologia molecular foi possível a identificação de *C. canis* (CAMA et al., 2003; PEDRAZA-DIAS et al., 2001; PIENIAZEK et al., 1999) *C. felis* (CAMA et al., 2003; PEDRAZA-DIAS et al., 2001), *C. meleagridis* (CAMA et al., 2003; McLAUCHLIN et al., 2000; PEDRAZA-DIAS et al., 2000; XIAO et al., 2001) *C. muris* (GUYOT et al., 2001; TIANGTIP; JONGWUTWES, 2002) e os genótipos suíno (CAMA et al., 2003) e cervídeo (ONG et al., 2002) de *Cryptosporidium* causando infecção em humanos, o que demonstra que animais domésticos e silvestres, sejam mamíferos ou aves, podem atuar como reservatórios, contaminando fontes de água, alimentos, ou transmitindo para animais domésticos (OLSON et al., 2004).

Apesar de não haver definição sobre a participação de aves na cadeia epidemiológica de infecções por *C. meleagridis* no homem, trabalhos utilizando infecção experimental demonstraram que oocistos dessa espécie são infectantes para camundongos, ratos, coelhos e bovinos (DARABUS, 1997; DARABUS; OLARIU, 2003; SRÉTER; VARGA, 2000), evidenciando que essa espécie, além de infectar aves, também pode promover infecção em mamíferos. AKIYOSHI et al. (2003) demonstraram que um isolado de *C. meleagridis* de origem humana

promoveu infecção em camundongos, suínos e bovinos, com infectividade e virulência iguais as de *C. parvum*.

Há relatos de criptosporidiose humana em mais de 90 países localizados em seis continentes (UNGAR, 1990; XIAO et al., 2004). Dentre os surtos documentados 31 envolveram mais de 10.000 pessoas após exposição à água de piscinas (DILLINGHAM et al., 2002) e um ocorreu na cidade de Milwaukee, nos Estados Unidos, envolvendo aproximadamente 400.000 pessoas, tendo como origem água de bebida contaminada (MackENZIE et al., 1994).

A ocorrência de vários surtos de criptosporidiose em pessoas se deve ao fato dos oocistos serem resistentes à inativação em condições ambientais e à ação do cloro utilizado no tratamento de água, ao pequeno tamanho dos oocistos, à baixa dose infectante (menos de 10 oocistos) (OKHUYSEN et al., 1999) e ao fato dos oocistos já serem eliminados esporulados nas fezes e, conseqüentemente, na forma infectante. Essas características tornam essa parasitose uma importante causa de surtos relacionados à água de bebida e destinada a lazer, como água de piscinas, a alimentos contaminados, hospitais, creches e em humanos que tem contato direto com animais (DILLINGHAM et al., 2002).

A facilidade de transmissão desse parasito para as pessoas, aliada ao fato da inexistência de um tratamento efetivo para a criptosporidiose, faz com que essa parasitose continue a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente em seres humanos imunossuprimidos e crianças em países em desenvolvimento (ASHBOLT, 2004; LEAV et al., 2003).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M.I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M.J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁSQUEZ, S.; NIETO, J.M. *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.

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

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

BELTON, D.J.; POWEL, I.B. Cryptosporidiosis in love birds (*Agapornis* sp.). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 35, p. 15, 1987.

BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S.; HOERR, F.J.; ATLAS, F.J.; TOIVIO-KINNUCAN, M. *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplera bella*: passeriformes, estrilgidae). **Avian Diseases**, v. 34, p. 1027-1030, 1990.

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

CARDOZO, V.S.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. Transmissão experimental de *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Criptosporidiidae) isolado

de frango de corte à codorna japonesa (*Coturnix japonica*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, p. 119-124, 2005.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water research**, v. 38, p. 818-862, 2004.

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

DARABUS, G.; OLARIU, R. The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 6, p. 225-228, 2003.

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

DOSTER, A.R.; MAHAFFEY, E.A. Cryptosporidia in the cloacal coprodeum of red-lored parrots (*Amazona autumnalis*). **Avian Diseases**, v. 23, p. 654-661, 1979.

EGYED, Z.; SRÉTER, T.; SZELL, Z.; BESZTERI, B.; DOBOS-KOVACS, M.; MARIALIGETI, K.; CORNELISSEN, W.C.A.; VARGA, I. Polyphasic typing of *Cryptosporidium baileyi*: a suggested model for characterization cryptosporidia. **Journal of Parasitology**. v. 88, p. 237-243, 2002.

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

629, 2005.

GARDINER, C.H.; IMES, G.D. Cryptosporidium sp. in the kidneys of a black-throated finch. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, p. 1401-1402, 1984.

GHARAGOZLOU, M.J.; DEZFOULIAN, O.; RHABARI, S.; BOKAIE, S.; JAHANZAD, I.; RAZAVI, N.E. Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 282-258, 2006.

GLISSON, J.A.; BROWN, J.R.; BRUGH, T.P.; PAGE, R.K.; KLEVEN, S.H.; DAVIS, R.B. Sinusitis in turkeys associated with respiratory cryptosporidiosis. **Avian Diseases**, v.28, p. 783-790, 1984.

GOODWIN, M.A. Small-intestinal cryptosporidiosis in a chicken. **Avian Diseases**, v. 32, p. 844-848, 1988.

GOODWIN, M.A.; BROWN, J. Histologic incidence and distribution of Cryptosporidium sp. infection in chickens: 68 cases in 1986. **Avian Diseases**, v. 32, p. 365-369, 1988.

GOODWIN, M.A., BROWN, J. Intestinal cryptosporidiosis in chickens. **Avian Diseases**, v. 33, p. 770-777, 1989.

GOODWIN, M.A.; KRABILL, U.A. Diarrhea associated with small-intestinal cryptosporidiosis in a budgerigar and in a cockatiel. **Avian Diseases**, v. 33, 829-833, 1989.

GOODWIN, M.A.; BROWN, J.; RESURRECION, R.S.; SMITH, A.J. Respiratory coccidiosis (Cryptosporidium baileyi) among Northern Georgia broilers in one company. **Avian diseases**, v. 40, p. 572-575, 1996.

GORHAM, S.L.; MALLINSON, E.T.; SNYDER, D.B.; ODOR, E.M. Cryptosporidia

in the bursa of Fabricius: a correlation with mortality rates in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 16, p. 205-211, 1987.

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

GUYOT, K.; FOLLET-DUMOULIN, A.; LELIEVRE, E.; SARFATI, C.; RABODONIRINA, M.; NEVEZ, G.; CAILLIEZ, J.C.; CAMUS, D.; DEI-CAS, E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3472-3480, 2001.

HOERR, F.J.; CURRENT, W.L.; HAYNES, T.B. Fatal cryptosporidiosis in a quail. **Avian Diseases**, v. 30, p. 421-425, 1986.

HUBER, F.; SILVA, S.; BONFIM, T.C.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; BELLO, A.R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 65-74, 2007.

ITAKURA, C.; GORYO, M.; UEMURA, T. Cryptosporidial infection in chickens. **Avian Pathology**, v. 13, p. 487-499, 1984.

JACOBSEN, G.; BARCELOS, A.S.; FLORES, M.L.; SEGABINAZI, S.D.; LAGAGGIO, V.R.A. *Cryptosporidium* sp. em intestinos, bursa de Fabricius e traquéia de frangos (*Gallus gallus*). **Ciência Rural**, v. 36, p. 682-684, 2006.

JELLISON, K.L.; DISTEL, D.L.; HEMOND, H.F.; SCHAUER, D.B. Phylogenetic analyses of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada Geese (*Branta Canadensis*): evidence for five novel genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, 452-458, 2004.

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

KASSA, H.; HARRINGTON B.J.; BISESI, M.S. Cryptosporidiosis: a brief literature review and update regarding *Cryptosporidium* in feces of Canada geese (*Branta canadensis*). **Journal of Environmental Health**, v. 66, p. 34-40, 2004.

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

LEY, D.H.; LEVY, M.G.; HUNTER, L.; CORBET, W.; BARNES, J.H. *Cryptosporidia*-positive rates of avian necropsy accessions determined by examination of auramine O-stained fecal smears. **Avian Diseases**, v. 32, p. 108-113, 1988.

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; HOERR, F.J. Small intestinal cryptosporidiosis in cockatiels associated with *Cryptosporidium baileyi*-like oocysts. **Avian Diseases**, v. 34, p.791-793, 1990.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVIS, J.P. 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.

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

MASON, R.W.; HARTLEY, W.J. Respiratory cryptosporidiosis in a peacock chick. **Avian Diseases**, v. 24, p. 771-776, 1980.



MCLAUCHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DIAZ, S.; NICHOLS, G.L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3984-3990, 2000.

MEIRELES, M.V.; FIGUEIREDO, P.C. Isolamento e identificação de *Cryptosporidium baileyi*, Current et al., 1986 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em frangos de corte. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, p. 125-130, 1992.

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

MEIRELES, M.V.; PAULILLO, A.C.; SILVA, G.S.; COSTA, A.J.; DORETTO JÚNIOR, L.; MACHADO, R.Z. Infecção experimental por *Cryptosporidium baileyi* em aves de corte: aspectos clínicos, parasitológicos e zootécnicos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, p. 11-14, 1998.

MEIRELES, M.V.; PAULILLO, A.C.; SILVA, G.S.; LUVIZOTTO, M.C.R.; COSTA A.J.; ANDREATTI FILHO, R. L. Experimental infection with *Cryptosporidium baileyi* in floor-pen raised broilers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 1, p. 37-42, 1999.

MILLARD, P.S.; GENSHEIMER, K.F.; ADDISS, D.G.; SOSON, D.M.; BECKETT, G.A.; HOUCK-JANKOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v. 272, p. 1192-1196, 1994.

MORGAN, U.M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A.A.; THOMPSON, R.C.A. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. **International**

**Journal for Parasitology**, v. 29, 1733-1751, 1999.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S. R.; FAYER, R.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-neck parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 182-183, 2000.

MORGAN, U.M.; FALL, A.; WARD, L.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, A.R.C.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 433-440, 2002.

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

O'DONOGHUE, P.J.; THAM, V.L.; SARAM W.G.; PAULL, K.L.; MCDERMOTT, S. *Cryptosporidium* infections in birds and mammals and attempted cross-transmission studies. **Veterinary Parasitology**, v. 26, p. 1-11, 1987.

OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L.; CRABB, J.H.; STERLING, C.R.; DUPONT, H.L.

Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults.

**Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1275 – 1281, 1999.

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

ONG, C.S.L.; EISLER, D.L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V.W.K.; TOMBLIN J.; BOWIE, W.R.; ISSAC-RENTON, J.L. Novel *Cryptosporidium* genotypes specific

in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 263-268, 2002.

PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; MCLAUCHLIN, J. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p.189-194, 2000.

PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; IVERSEN, A.M.; STANLEY, P.J.; McLAUCHLIN, J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 293-296, 2001.

PENG, M.M.; WILSON, M.L.; HOLLAND, R.E.; MESHNIK, S.R.; LAL, A.A.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* sp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. **Parasitology Research**, v. 90, p. 175-180, 2003.

PIENIAZEK, N.J.; BORNAY-LLINARES, F.J.; SLEMENDA, S.B.; SILVA, A.J.; MOURA, I.N.; ARROWOOD, M.J.; DITRICH, O.; ADDISS, D.G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 444-449, 1999.

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

RANDALL, C.J. Conjunctivitis in pheasants associated with cryptosporidial infection. **Veterinary Record**, v. 118, p. 211, 1986.

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

809-813, 2003.

RYAN, U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H.L.; SULAIMAN, I. SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDLE, R.; RBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R.C.A.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v.4, p. 769-773, 2004.

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

SARGENT, K.D.; MORGAN, U.M.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C.A. Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 221-227, 1998.

SITJÀ-BOBADILLA, A.; ALVAREZ-PELLITERO, P. Experimental transmission of *Cryptosporidium molnari* (Apicomplexa: Coccidia) to gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Parasitology Research**, v. 91, p. 209-214, 2003.

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

SNYDER, D.B.; CURRENT, W.L.; COHEN, E.R. Serologic incidence of *Cryptosporidium* in Delmarva broiler flocks. **Poultry Science**, v. 67, p. 730-735, 1988.

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

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

TARWID, J.N.; LAWTHORN, R.J.; RIDDELL, C. Cryptosporidiosis in the respiratory tract of turkeys in Saskatchewan. **Avian Diseases**, v. 29, p. 528-532, 1985.

THAM, V.L.; KNIESBERG, S.; DIXON, B.R. Cryptosporidiosis in quails. **Avian Pathology**, v. 11, 619-626, 1982.

THOMPSON, R.C.A. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools – towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 493-496, 2002.

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

TIANGTIP, R.; JONGWUTIWES, S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, p. 357-364, 2002.

TYZZER, E.E. Coccidiosis in gallinaceous birds. **American Journal of Hygiene**, v. 10, p. 269. 1929.

TZIPORI, S.; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, p. 455-456, 1981.

TZIPORI, T.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1047-1058, 2002.

UNGAR, B.L.P. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*)**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 59-82.

XIAO, L.; RYAN, M. A. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinions in Infectious Diseases**, v. 17, p. 483-490, 2006.

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

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

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

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

## CAPÍTULO 2 - OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM AVES SELVAGENS BRASILEIRAS\*

DANIEL C. SIMÕES<sup>1,2</sup>; RÔMULO G. ANTUNES<sup>1,3</sup>; ALEX A. NAKAMURA<sup>2,4</sup>;  
MARCELO V. MEIRELES<sup>1</sup>

ABSTRACT:-SIMÕES, D.C.; ANTUNES, R.G.; NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, M.V. [**Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in wild birds from Brazil.**] Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em aves selvagens brasileiras. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rua Clóvis Pestana, 793, Bairro Dona Amélia, Araçatuba, SP, 16050-680, Brasil. E-mail: [marcelo@fmva.unesp.br](mailto:marcelo@fmva.unesp.br)

Due to the paucity of data related to the occurrence of *Cryptosporidium* in wild birds from Brazilian fauna, this research was accomplished in order to screen fecal samples from various species of wild birds in Brazil for the presence of *Cryptosporidium* by the use of nested polymerase chain reaction (n-PCR). A total of 488 fecal samples from 146 species of wild birds were collected in Zoos, Veterinary Hospitals, breeder's facilities and residences. After extraction of genomic DNA from oocysts n-PCR was accomplished for amplification of fragments from 18S subunit of the ribosomal RNA gene and from actin gene. Positive amplification for *Cryptosporidium* was obtained in 20 (4.09%) samples. Sequencing of amplified fragments allowed the identification of *C. galli* in lesser-seed finches (*Oryzoborus angolensis*) and *C. baileyi* in black vulture (*Coragyps atratus*).

KEY WORDS: *Cryptosporidium* spp., wild birds, molecular characterization, occurrence, Brazil.

**RESUMO** - Devido à escassez de informações referentes à ocorrência de *Cryptosporidium* em aves selvagens no Brasil, este projeto foi realizado visando à detecção de *Cryptosporidium* em amostras de fezes de várias espécies de aves selvagens da fauna brasileira, por meio da reação em cadeia de polimerase – “nested” (n-PCR). Um total de 488 amostras de 146 espécies de aves selvagens foi coletado em zoológicos, criatórios, Hospitais Veterinários e residências, para extração do DNA genômico de oocistos e realização de n-PCR, visando à amplificação de fragmentos dos genes da subunidade 18S do RNA ribossômico e da actina. Foi observada amplificação para *Cryptosporidium* em 20 (4,1%) das amostras examinadas. Pelo sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados foram identificadas duas espécies de *Cryptosporidium*: *C. galli* em curiós (*Oryzoborus angolensis*) e *C. baileyi* em urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*).

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cryptosporidium* spp., aves selvagens, caracterização molecular, ocorrência, Brasil.

\*Sob os auspícios da FAPESP

<sup>1</sup>Curso de Medicina Veterinária, UNESP, Campus de Araçatuba, Rua Clóvis Pestana, 793, Bairro Dona Amélia, Araçatuba - SP .

<sup>2</sup>Bolsista de mestrado, FAPESP.

<sup>3</sup>Bolsista de iniciação científica, FAPESP.

<sup>4</sup>Curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses - FMVZ – USP.



## 1 - INTRODUÇÃO

Três espécies que parasitam aves, *Cryptosporidium galli*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium meleagridis*, são descritas em Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Phoenicopteriformes, Psittaciformes e Struthioniformes (JOSEPHINE et al., 2006; MEIRELES et al., 2006; MORGAN et al., 2001; SANTOS et al., 2005; XIAO et al., 2004). Há ainda descrição de aproximadamente 30 genótipos de *Cryptosporidium* que infectam aves, ainda sem classificação em nível de espécie (JOSEPHINE et al., 2006; MEIRELES et al., 2006; XIAO et al., 2004).

*C. baileyi* infecta o trato respiratório, bursa de Fabricius e cloaca da galinha doméstica e de outras aves (SRÉTER; VARGA, 2000). *C. meleagridis* é um parasito de células epiteliais do intestino de perus (SLAVIN, 1955; SRÉTER; VARGA, 2000) e de outras aves (MORGAN et al., 2000). Essa espécie pode ainda infectar mamíferos (SRÉTER et al., 2000), entre os quais o ser humano (CAMA et al., 2003; GATEI et al. 2003), em alguns países com frequência semelhante ou superior a de infecções por *Cryptosporidium parvum* (CAMA et al., 2003; XIAO et al., 2001).

O proventrículo é o sítio de replicação de *C. galli*. Seus hospedeiros naturais reconhecidos até o momento são o flamingo cubano (*Phoenicopterus ruber ruber*), várias espécies de tentilhões (Spermestidae e Fringillidae), galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*), Urogalo (*Tetrao urogallus*), Tetrax (*Tetrastes bonasia rupestris*), galo de campina (*Paroaria dominicana*), calau (*Buceros rhinoceros*), periquito turquesa (*Neophema pulchella*), pintarroxo de bico roxo (*Pinicola enucleator*), canário (*Serinus canaria*) e calopsita (*Nymphicus hollandicus*) (JOSEPHINE et al., 2006; RYAN et al., 2003).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* é realizada mais comumente por meio da reação em cadeia de polimerase e suas variantes, seguida da técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos de DNA submetidos à digestão com enzimas de restrição (RFLP) ou o sequenciamento. O locus utilizado com mais frequência é o gene da subunidade 18S do rRNA, pelo fato de apresentar evolução mais lenta, sendo portanto, o locus de escolha para amostras de animais que podem estar infectados por espécies ou genótipos

ainda não classificados, como aves silvestres e exóticas. Outro *locus* que pode ser utilizado é o gene da actina, que apresenta alto polimorfismo, sendo útil para análise genética de espécies ou genótipos geneticamente similares, ou mesmo, para subgenotipagem de amostras da mesma espécie, permitindo a detecção de variações intra-espécies, que são extremamente importantes em estudos epidemiológicos (PENG et al., 2003; XIAO et al., 2004).

Devido à escassez de literatura pertinente ao assunto, particularmente no Brasil, a presente pesquisa objetivou avaliar a ocorrência deste parasito em amostras de fezes de aves selvagens brasileiras.

## **2 - MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1 - Amostras de fezes**

As amostras de fezes foram colhidas nas cidades de Andradina, Araçatuba, Bariri , Bauru, Birigui, Botucatu, Guarujá, Jaboticabal, Mairiporã, Promissão, Santos, São Paulo e São José do Rio Preto, no estado de São Paulo, Goiânia, no estado de Goiás e Curitiba e Foz do Iguaçu, no estado do Paraná, totalizando 488 amostras de fezes provenientes de 146 espécies e 39 famílias de aves (Acciptridae, Anhimidae, Ardeidae, Accipitridae, Anatidae, Cracidae, Cathartidae, Cotingidae, Charadriidae, Columbidae, Cariamidae, Coerebidae, Cuculidae, Columbidae, Ciconidae, Emberezidae, Falconidae, Fringilidae, Furnariidae, Icteridae, Laridae, Nyctibiidae, Psittacidae, Phoenicopteridae, Rallidae, Rheidae, Tyrannidae, Psophiidae, Ramphastidae, Rallidae, Strigidae, Spheniscidae, Sulidae, Thraupidae, Muscicapidae, Tytonidae, Tinamidae, Threskiornithidae,). As amostras ficaram armazenadas em torno de 15 dias em solução de bicromato de potássio 2,5% (concentração final), refrigeradas a 4° C e posteriormente foram submetidas à concentração e purificação de oocistos por centrífugo-flutuação em solução de Sheather.

Nas amostras positivas pela reação em cadeia de polimerase - “nested” (n-PCR) foi realizada pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* utilizando-se a coloração negativa com verde malaquita (ELLIOT et al., 1999), para realização de análises morfológica e morfométrica.

## **2.2 - Extração de DNA genômico**

A extração de DNA genômico dos oocistos foi realizada segundo MEIRELES et al. (2007), com adaptações no volume final (150 µl), utilizando-se chelex 100® (Bio-rad, Hercules, Califórnia, USA) e polivinilpirrolidona K-90 (PVP) (USB, Cleveland, Ohio, USA), lise alcalina da parede de oocistos, isotiocianato de guanidina (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e recuperação do DNA com sílica ativada (Sigma, St. Louis, Missouri, USA).

## **2.3 - Reação de nested-PCR**

Para amplificação de fragmentos dos genes da subunidade 18S do RNA ribossômico (18S rRNA) e da actina foram utilizadas as técnicas previamente desenvolvidas por Xiao et al. (1999) e Sulaiman et al. (2002).

## **2.4 - Sequenciamento dos fragmentos amplificados**

Os fragmentos resultantes da reação secundária da n-PCR foram purificados utilizando-se o kit de purificação de DNA GFX PCR DNA band purification® (GE Health Sciences, Champaign, Illinois, USA) e submetidos a sequenciamento automático utilizando-se o DYEnamic®ET dye terminator cycle sequencing kit® (GE Health Sciences, Champaign, Illinois, USA). As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático MegaBACE® (GE Health Sciences, Champaign, Illinois, USA), em duplicata e nas duas direções, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores das reações secundárias da n-PCR.

## **2.5 - Alinhamento e tradução das seqüências de nucleotídeos e edição final**

A determinação das seqüências consenso foi realizada utilizando-se do programa Codoncode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). Foram considerados somente os nucleotídeos com valor de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20.

Após determinação das seqüências consenso as mesmas foram alinhadas a seqüências homólogas disponíveis no GenBank, com auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999).

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha das espécies e da idade das aves das quais as amostras foram colhidas foi feita de acordo com sua disponibilidade. Desse modo, a grande maioria das amostras foi proveniente de aves adultas. Não há informações na literatura sobre a idade de maior ocorrência de infecção por *C. galli* e *C. meleagridis* em aves. LINDSAY et al. (1988) demonstraram maior sensibilidade à criptosporidiose em galinhas de dois a 14 dias de idade, após infecção experimental com *C. baileyi*. No entanto, infecções por algumas espécies de *Cryptosporidium* podem ocorrer com mais frequência em animais adultos, como observado por Fayer et al. (2005) em bovinos naturalmente infectados por *C. bovis*.

Foi observada amplificação positiva em 20 (4,09%) de um total de 488 amostras examinadas, distribuídas entre dez espécies de aves (Tabela 1). No único trabalho publicado sobre epidemiologia molecular de *Cryptosporidium* em aves, Josephine et al. (2006) também observaram baixa ocorrência de infecção na Austrália, sendo encontrada positividade de 6,25% em um total de 430 amostras de aves analisadas pela PCR para os genes do 18S rRNA e da actina.

*C. galli* foi identificado em sete amostras, de um total de 55 (12,7%), provenientes de curiós (*Oryzoborus angolensis*) e *C. baileyi* em uma amostra de urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*) (Tabela 2). Este é o primeiro relato de infecção por *Cryptosporidium* nestes hospedeiros. *C. baileyi* é a espécie mais frequentemente encontrada em galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*), e a infecção por essa espécie já havia sido relatada no Brasil em galinhas (MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992; CARDOZO et al., 2005) e em codornas e patos (HUBER et al., 2007).

Oocistos de *Cryptosporidium* geralmente apresentam a via oral como porta de entrada. No caso de predadores, como aves de rapina, os oocistos podem ser provenientes de ingestão de vísceras contaminadas. Graczyk et al. (1996a,b, 1997) demonstraram a possibilidade de eliminação passiva de oocistos de *Cryptosporidium*, sendo possível que as aves tenham ingerido as vísceras de uma presa infectada, com posterior eliminação passiva de oocistos nas fezes.

Hernandez-Divers et al. (2006) relataram a presença do urubu-de-cabeça-preta em proximidades de criatórios domésticos de aves, possibilitando o contato com patógenos dessas aves, entre eles o *Cryptosporidium*.

Por outro lado Kelli et al. (2007) constataram que 98% das presas consumidas por urubu-de-cabeça-preta são mamíferos, reduzindo assim a possibilidade de que *C. baileyi* encontrado neste experimento tenha sido eliminado de forma passiva nas fezes.

As análises morfométrica e morfológica dos oocistos foram limitadas pelo fato de que a maioria das amostras positivas na n-PCR apresentava-se negativa à microscopia ou havia no máximo 2 oocistos por lâmina. No entanto, os oocistos de *C. galli* encontrados apresentaram morfologia e morfometria compatíveis com outras descrições dessa espécie (RYAN et al., 2003).

Não foi possível identificar a maioria das espécies de *Cryptosporidium* por meio de sequenciamento, mesmo em amostras positivas pela n-PCR, provavelmente porque quando há um número muito pequeno de oocistos na amostra a amplificação resulta em pequena quantidade de DNA para realização da reação de sequenciamento, particularmente quando o número de pares de base dos fragmentos amplificados é alto (actina: ~ 1005 pb; 18S rRNA: ~ 830 pb), como observado por Robinson et al. (2006).

Apesar do gene da actina apresentar alto polimorfismo, não foi observada variação genética entre os diferentes isolados de *C. galli* identificados, nem entre o isolado de *C. baileyi* e outras seqüências dessa espécie publicadas no GenBank.

A ocorrência de *Cryptosporidium* sp. em fezes de aves adultas, seja de cativeiro ou de vida livre, como observado neste experimento e por Josephine et al. (2006), é baixa. As duas espécies de *Cryptosporidium* identificadas não representam problema de saúde pública. Aliada a esse fato, a baixa ocorrência de infecção por este parasito em aves selvagens sugere que esses animais não apresentam risco importante de contaminação para humanos.

**Agradecimentos:** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (2005/53809-5) e pela bolsa de mestrado para Simões, D.C. (2005/57626-2).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CARDOZO, S.V.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. Transmissão experimental de *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa:Cryptosporidiidae) isolado de frango de corte à codorna japonesa (*Coturnix japonica*). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 14, p. 119-124, 2005.

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

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

GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R.W.; CUEVAS, L.E.; PARRY, C.M.; CUNLIFFE, N.A.; BEECHING, N.J.; HART, C.A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 1458-1462, 2003.

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

GRACZYK, T.K., CRANFIELD, M.R., FAYER, R.; TROUT, J.; GOODALE, H.J.

Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts is retained upon intestinal passage through a migratory water-fowl species Canada goose (*Branta Canadensis*). *Tropical Medicine and International Health*, v. 2, p. 341-347, 1997.

GRACZYK, T.K.; FAYER, R.; CRANFIELD, M.R. *Cryptosporidium parvum* is not transmissible to fish, amphibians, or reptiles. *Journal of Parasitology*, v. 82, p. 748-751, 1996b.

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

HERNANDEZ-DIVERS, S. M.; VILLEGAS, P.; PRIETO, F.; UNDA J. C.; STEDMAN, N.; RITCHIE, B.; CARROL, R.; HERNANDEZ-DIVERS, S. J. A survey of selected avian pathogens of backyard poultry in northwestern Ecuador. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 20, p. 147-158, 2006.

HUBER, F.; SILVA, S. DA; BOMFIM, T.C.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; BELLO, A.R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 150, p. 65-74, 2007.

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

KELLI, N. E.; SPARKS, D. W.; DE VAULT, T. L.; RHODES JUNIOR, O. E. Diet of black and turkey vultures in forest landscape. *The Wilson Journal of Ornithology*, v. 119, p. 267-270, 2007.

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; SUNDERMANN, C.A.; GIAMBRONE, J.J. Effect of broiler chicken age on susceptibility to experimentally induced *Cryptosporidium baileyi* infection. *American Journal of Veterinary Research*, v. 49, n.8, p. 1412-1413, 1988.

MEIRELES, M.V.; FIGUEIREDO, P.C. Isolamento e identificação de *Cryptosporidium baileyi*, *Current et alii.*, 1986 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em frangos de corte. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 1,2, p. 125-130, 1992.

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

MEIRELES, M. V.; SOARES, R.M.; BONELLO, F.; GENNARI, S.M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in capybara (*Hydrocoerus hydrochaeris*) in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 147, p. 166-170, 2007.

MORGAN, U. M.; MONIS, P. T. ; XIAO, L. ; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.; O'DONOGUE, P.; GASSER, R.; MURRAY, A.; FAYER,. R; BLAGBURN, B.L.; LAL, A.A.; THOMPSON, A.R.C. Molecular and phylogenetic characterization of. *Cryptosporidium* from birds. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 289-296, 2001.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S. R.; FAYER, R.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C.; *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-neck parrot (*Psittacula krameri*). *Australian Veterinary Journal*, v. 78, p. 182-183, 2000.

PENG, M.M.; WILSON, M.L.; HOLLAND, R.E.; MESHNIK, S.R.; LAL, A.A.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* sp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitology Research*, v. 90, p. 175-180, 2003.

ROBINSON, G.; THOMAS, A.L.; DANIEL, R.G.; HADFIELD, S.J.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Sample prevalence and molecular characterisation of



*Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, v. 142, p. 163-167, 2006.

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

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

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

SRÉTER, T.; KOVÁCS, G.; DA SILVA, A.J.; PIENIAZEK, N.J.; SZÉLL, Z.; DOBOS-KOVÁCS, M.; MÁRIALIGETI, K.; VARGA, I. Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 735-738, 2000.

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

SULAIMAN, I.M.; LAL, A.A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *Journal of Parasitology*, v. 88, p. 388-394, 2002.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 25, p.4876-4882, 1997.

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHEKLEY, W.;

CABRERA, L.; GILMAN, R. H.; LAL, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*, v. 183, p. 492-497, 2001.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.M.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J.; FAYER, R.; LAL, A.A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1578-1583, 1999.

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

Tabela 1. Procedência e número de amostras positivas para *Cryptosporidium*, por n-PCR, de acordo com a espécie de ave.

| <b>Espécie</b>        | <b>Nome Científico</b>         | <b>Procedência</b>    | <b>Amostras positivas</b> |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Araçari castanho      | <i>Pteroglossus castanotis</i> | São José do Rio Preto | 1                         |
| Canário-da-terra      | <i>Sicalis flaveola</i>        | São Paulo             | 2                         |
| Canário-da-terra      | <i>Sicalis flaveola</i>        | Mairiporã             | 1                         |
| Colerinha             | <i>Sporophila caerulescens</i> | São Paulo             | 1                         |
| Curió                 | <i>Oryzoborus angolensis</i>   | Araçatuba             | 1                         |
| Curió                 | <i>Oryzoborus angolensis</i>   | Birigui               | 6                         |
| Maracanã-cara-amarela | <i>Orthopsittaca manilata</i>  | Goiânia               | 1                         |
| Papagaio-verdadeiro   | <i>Amazona aestiva</i>         | Araçatuba             | 2                         |
| Pássaro preto         | <i>Gnorimopsar chopi</i>       | São Paulo             | 1                         |
| Sabiá laranjeira      | <i>Turdus rufiventris</i>      | São Paulo             | 1                         |
| Tucano-toco           | <i>Ramphastos toco</i>         | Bauru                 | 1                         |
| Tucano-toco           | <i>Ramphastos toco</i>         | Goiânia               | 1                         |
| Urubu-de-cabeça-preta | <i>Coragyps atratus</i>        | Jaboticabal           | 1                         |
| <b>Total</b>          |                                |                       | <b>20</b>                 |

Tabela 2. Identificação da espécie de *Cryptosporidium* em fezes de aves selvagens utilizando n-PCR para os genes do 18S rRNA e da actina.

| <b>Amostras</b>                                 |                                  |                       |                 |                                                          |
|-------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------|----------------------------------------------------------|
| <b>positivas/ total<br/>de amostras<br/>(%)</b> | <b>Espécie de ave</b>            | <b>Sequenciamento</b> |                 | <b>Espécie de<br/><i>Cryptosporidiu</i><br/><i>m</i></b> |
|                                                 |                                  | <b>Actina</b>         | <b>18S rRNA</b> |                                                          |
| 1/1 (100)                                       | <i>Coragyps atratus</i>          | -                     | +               | <i>C. baileyi</i>                                        |
| 7/55 (12,7)                                     | <i>Oryzoborus<br/>angolensis</i> | +                     | +               | <i>C. galli</i>                                          |

**Anexos:****Anexo 1**

Periódico indexado ao qual os artigos serão submetidos à publicação:

**REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**  
**Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**

**POLÍTICA EDITORIAL E INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

**Objetivo e política editorial**

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária tem periodicidade trimestral e destina-se à publicação de trabalhos científicos originais sobre temas relativos a Helminthos, Protozoários e Artrópodes parasitas e assuntos correlatos.

A publicação de artigos dependerá da observância das normas editoriais, dos pareceres do Corpo Editorial e ou relator *ad hoc*. Apesar de serem de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos nos trabalhos, os editores reservam-se o direito de sugerir ou solicitar modificações necessárias. A revista tem por finalidade publicar artigos completos, notas de pesquisa e artigos de revisão, sendo estes últimos condicionados a solicitação do corpo editorial. O (s) autor (res) deverá (ão) submeter o trabalho anexando carta devidamente assinada, declarando ser o artigo original, não publicado anteriormente, salvo sob a forma de resumo em eventos científicos, assim como, declaração de concordância de todos os autores com a submissão do trabalho.

**Taxas de publicação e tramitação:**

A taxa de tramitação é de R\$ 20,00, por trabalho, pagos no ato da submissão. A taxa de publicação de artigos aceitos é de R\$ 15,00, por página impressa, cujo valor total será informado aos autores quando da editoração. Os pagamentos deverão ser realizados através de cheque nominal a Fundação de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRJ (FAPUR). Não serão cobradas taxas, se pelo menos um dos autores for associado ao Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária.

**Apresentação de manuscritos/Instruções aos autores**

**Na elaboração do texto deverão ser observadas as seguintes normas:**

Os trabalhos deverão ser apresentados em três cópias impressas em uma só face, com páginas numeradas, não excedendo a 15 para artigos completos e 5 para notas de pesquisa, digitados em fonte Times New Roman tamanho 12, margens superior e inferior com 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaço entre linhas 1,5. As tabelas e as ilustrações deverão ser apresentadas em folhas separadas e anexadas ao final do trabalho. A versão final dos trabalhos, aceitos para publicação, deverá ser apresentada em disquete (3 ½ polegadas) ou em CD ROM identificados, em editor de texto compatível com o *Word for Windows*, sem formatação do texto, devidamente acompanhados de uma cópia impressa.

Os trabalhos podem ser redigidos em **português, espanhol ou inglês**, da forma mais concisa possível, com linguagem sempre que possível no passado e impessoal, com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos e lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente.

Página 1

REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

Siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso. As citações no texto devem ser efetuadas pelo sistema autor-data, conforme norma NBR 10520/2002 da ABNT.

Os artigos completos devem ser organizados obedecendo a seguinte seqüência:

**Título, Autores, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinação destes três últimos), **Agradecimentos** (facultativo) e **Referências Bibliográficas**.

As notas de pesquisa obedecem a seqüência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escrito em texto corrido.

**Características dos elementos de um trabalho científico:**

**Título/autores:** Original e traduzido e logo abaixo do título deve constar o (s) nome(s) do (s) autor (res). No rodapé, vinculação dos autores, órgão financiador e endereço completo para correspondência, incluindo e-mail, telefone e fax.

**Abstract:** Deve ser sempre escrito em língua inglesa, em um único parágrafo sem deslocamento, e inserido logo após os autores, constituindo-se em tradução fiel do resumo, seguido por key-words.

**Resumo:** deve conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo sem deslocamento, redigido na língua de origem do trabalho. Não deve conter citações bibliográficas; siglas e abreviações dos nomes de instituições. Deve ser informativo, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. Os trabalhos redigidos em língua inglesa deverão apresentar o resumo em língua portuguesa, seguido das palavras-chave.

**Palavras-chave e Key-words:** as palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho e seu uso limitado a cinco.

**Introdução:** Explicação clara e objetiva do problema, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

**Material e Métodos:** Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Trabalhos submetidos à avaliação em Comitê de Ética deverão incluir um parágrafo nesta seção para notificação.

**Resultados:** Sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações, auto-explicativas. O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo.

**Discussão:** Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente com os resultados, formando o tópico **Resultados e Discussão**.

**Tabelas:** Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final. A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário, lembrando que tabelas muito grandes são difíceis de serem lidas. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados. Todos os dados das tabelas devem ser digitados em minúsculo, exceto as siglas.

**Figuras:** as figuras são ilustrações tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema. Devem ser de boa qualidade e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, tal qual foram obtidas, nos casos de foto em papel enviar o(s) original(ais). A revista não publica figuras em cores.

**Conclusões:** As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Neste caso, este item não será necessário.

**Agradecimentos:** Quando necessário, limitados ao indispensável.

**Referências bibliográficas:** A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor, sem numeração, registrando-se o nome de todos os autores, usando as normas da ABNT (NBR 6023/2002) simplificada conforme exemplos:

**Livro:**

LEVINE, J. D. *Veterinary Protozoology*. Ames: ISU Press, 1985. 414 p.

**Artigo completo:**

BUGG, R. J.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; TOMPSON, R. C. A. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *Veterinary Journal*, v. 157, n. 3, p. 295-301, 1999.

**Resumo:**

LIMA, N. D. Eimeriose dos ruminantes. In: II SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 20, 1980, Fortaleza. *Anais ...* Brasília: C B P V, 1980. p. 79-97.

**Tese, dissertação:**

ARAUJO, M. M. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de Patos, Paraíba – Brasil*. 2002. 40 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

**Documento eletrônico:**



CDC. Epi Info, 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>. Acesso em: 10 jan. 2003.

JESUS, V. L. T.; PEREIRA, M. J. S.; ALVES, P. A. M. Susceptibilidade de raças bovinas a tricomonose genital. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: CBPV, 2002. 1 CD-ROM.

**Endereço para envio de trabalhos:**

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária  
UFRRJ/Instituto de Veterinária – Departamento de Parasitologia Animal  
Br 465, Km 7 Seropédica – Rio de Janeiro  
CEP: 23 890 000

e-mail: [revista-cbpv@ufrj.br](mailto:revista-cbpv@ufrj.br)

Tel/fax: (21) 2682-1617

Página 3