

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

**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM PSITACÍDEOS EXÓTICOS
MANTIDOS EM CATIVEIRO NAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL:
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO
MOLECULAR**

Elís Domingos Ferrari

Médica Veterinária

Araçatuba - SP

2017

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

**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM PSITACÍDEOS EXÓTICOS
MANTIDOS EM CATIVEIRO NAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL:
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO
MOLECULAR**

Elís Domingos Ferrari

Orientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles

Coorientadora: Prof^a Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani

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

Araçatuba - SP

2017

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

Ferrari, Elís Domingos

F375o

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em psitacídeos exóticos mantidos em cativeiro nas regiões sul e sudeste do Brasil: avaliação de métodos de diagnóstico e classificação molecular / Elís Domingos Ferrari.
Araçatuba: [s.n], 2017.
49f. il.

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

Orientador: Prof. Adjunto: Marcelo Vasconcelos Meireles
Coorientadora: Profa. Adjunto: Katia Denise Saraiva Bresciani

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

CDD 636.51

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em psitacídeos exóticos mantidos em cativeiro nas regiões sul e sudeste do Brasil: Avaliação de métodos de diagnóstico e classificação molecular

AUTORA: ELÍS DOMINGOS FERRARI

ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

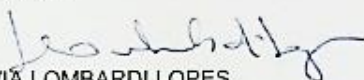
COORDINADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

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



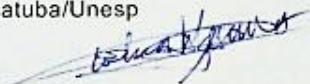
Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES

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



Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA

Doutor em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP

Araçatuba, 27 de outubro de 2017.

ELÍS DOMINGOS FERRARI– Catanduva - SP, 21 de janeiro de 1992. Graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA/ Unesp, no ano de 2014. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA/ Unesp, Campus de Araçatuba – SP, em agosto de 2015, sob orientação do Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles. Bolsista CAPES de setembro de 2016 a agosto de 2017.

”Sabemos o que somos, mas não o que podemos nos tornar”

William Shakespeare

Aos meus pais, que sempre me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles que, além de me orientar pelos caminhos da ciência com paciência e dedicação, ensinou valores sobre honestidade, responsabilidade e humildade.

A Prof^a. Dr^a Katia Denise Saraiva Bresciani pela coorientação, sempre disponível e disposta a ajudar, demonstrando empatia e preocupação com meu presente e futuro.

Aos meus pais, Regina e Maurilo, que sempre colocaram os meus sonhos acima das próprias prioridades, me apoiando, incentivando e aconselhando.

Aos meus irmãos, Douglas e Joyce, que sempre demonstraram preocupação e disposição para me ajudar.

Ao Bruno, o qual estive comigo nas etapas mais difíceis e, com amor e paciência, sempre me apoiou, incentivou e auxiliou, direta e indiretamente.

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

A todos os colegas e colaboradores do laboratório que, mesmo em pequenos detalhes, fizeram grande diferença para o resultado final deste trabalho.

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

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1 Introdução	13
2 Ciclo Biológico	14
3 Epidemiologia.....	16
4 Diagnóstico	18
5 Tratamento e Profilaxia	20
OBJETIVO.....	21
REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO	31
1 Introdução	32
2 Material e Métodos	33
3 Resultados.....	35
4 Discussão	38
5 Conclusão	40
REFERÊNCIAS.....	40

**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM PSITACÍDEOS EXÓTICOS
MANTIDOS EM CATIVEIRO NAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL:
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO
MOLECULAR**

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência e os métodos de diagnóstico para *Cryptosporidium* spp. em psitacídeos exóticos de cativeiro provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil. A purificação dos oocistos nas amostras fecais de 463 psitacídeos foi realizada por meio de centrifugo-flutuação em solução de Sheather. Para análise microscópica, nós utilizamos a coloração negativa de verde malaquita. A amplificação de um fragmento parcial do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp. foi feita usando-se nested PCR seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados (nPCR/S). As amostras também foram testadas por meio de PCR duplex em tempo real, visando-se amplificar um fragmento do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves. A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. pela microscopia e nested PCR (nPCR) foi de 3, 02% (14/463) e 4, 97% (23/463), respectivamente. A nPCR/S demonstrou positividade de 1, 73% (8/463) para *Cryptosporidium* genótipo III de aves, 0, 86% (4/463) para *Cryptosporidium parvum* e 0, 22% (1/463) para *Cryptosporidium canis*. A PCR duplex em tempo real demonstrou positividade de 9, 50% (44/463) para as criptosporidiose gástrica, sendo 1, 94% (9/463) para *C. galli*, 5, 83% (27/463) para *Cryptosporidium* genótipo III de aves e 1, 73% (8/463) para infecções mistas. Não houve diferença estatística significativa entre a positividade pela nPCR e microscopia ($p = 0.1237$) e houve concordância justa entre elas ($Kappa = 0.242$). Diferença estatística significativa ($p < 0.0001$) e concordância justa ($Kappa = 0.317$) foram obtidas nas comparações entre nPCR e PCR duplex em tempo real. Nós concluímos que a PCR duplex em tempo real é a melhor opção para o diagnóstico de criptosporidiose gástrica e que *Cryptosporidium* genótipo III de aves é o mais comum dentre as espécies/ genótipos de *Cryptosporidium* que acometem psitacídeos.

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

PREVALENCE OF *Cryptosporidium* spp. IN CAGED EXOTIC PSITTACINES FROM SOUTHERN AND SOUTHEASTERN BRAZIL: EVALUATION OF DIAGNOSTIC METHODS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the prevalence and diagnostic methods for *Cryptosporidium* spp. in caged adult exotic parrots from Southern and Southeastern Brazil. The oocyst purification in fecal samples from 463 psittacines was performed by centrifugal-flotation in Sheather's sugar solution. For microscopic analysis, we used malachite green negative staining. Amplification of a partial fragment of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* spp. was accomplished using nested PCR (nPCR) followed by sequencing of the amplified fragments (nPCR/S). Samples were also tested by duplex real-time PCR targeting the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium galli* and *Cryptosporidium* avian genotype III. The prevalence rates of *Cryptosporidium* spp. by microscopy and nPCR was 3.02% (14/463) and 4.97% (23/463), respectively. The nPCR/S showed positivity of 1.73% (8/463) for *Cryptosporidium* avian genotype III, 0.86% (4/463) for *Cryptosporidium parvum* and 0.22% (1/463) for *Cryptosporidium canis*. Duplex real-time PCR showed a positivity of 9.50% (44/463) for gastric cryptosporidiosis, 1.94% (9/463) for *C. galli*, 5.83% (27/463) for *Cryptosporidium* avian genotype III and 1.73% (8/463) for mixed infections. There was no statistically significant difference between positivity for nPCR and microscopy ($p = 0.1237$) and fair agreement between them (Kappa = 0.242). A significant statistical difference ($p < 0.0001$) and fair agreement (Kappa = 0.317) were obtained between nPCR and duplex real-time PCR. We found out that duplex real-time PCR is the best option for the diagnosis of gastric cryptosporidiosis and that *Cryptosporidium* avian genotype III is the most common *Cryptosporidium* species/genotype in psittacines.

Key-words: Cryptosporidiosis, polymerase chain reaction, microscopy, psittaciformes

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* pertencem ao filo Apicomplexa, classe Gregarinomorphea, subclasse Cryptogregaria e família Cryptosporidiidae (BARTA; THOMPSON, 2006; RYAN, 2016). Antes considerados parasitos de localização intracelular, porém, extracitoplasmática (BARTA; THOMPSON, 2006), atualmente considera-se que sua localização é epicelular. Os protozoários deste gênero são típicos do trato gastrointestinal (BARTA; THOMPSON, 2006; VALIGUROVÁ et al. , 2008), mas ocasionalmente infectam também os tratos respiratório, biliar (VALIGUROVÁ et al. , 2008) e urinário (TRAMPEL et al. , 2000), causando doença clínica e subclínica (SANTIN, 2013).

Após o primeiro relato de Tyzzer (1907), diversas espécies do gênero *Cryptosporidium* foram descritas em vários animais incluindo 152 espécies de mamíferos (FAYER et al. , 2000; FAYER, 2010) e diversas espécies de aves (MORGAN et al. , 2001; RYAN, 2010), além de anfíbios, peixes (RYAN, 2010) e répteis (ABE; MATSUBARA, 2015). Atualmente, 31 espécies do parasito são validadas (HOLUBOVÁ et al. , 2016; ŠLAPETA, 2013) e são descritos mais de 40 genótipos em diversos hospedeiros vertebrados (RYAN; HIJJAWI, 2015; XIAO; FAYER, 2008). Esses genótipos, apesar de morfologicamente semelhantes a algumas espécies já classificadas, diferem destas na composição genética. Devido à ausência de dados relacionados a outras características biológicas desses isolados, ainda não foi possível sua classificação em nível de espécie (FAYER, 2010; XIAO et al, 2002) e os dados sobre a especificidade aos hospedeiros ainda são bastante escassos.

A primeira descrição em aves foi realizada por Tyzzer (1929), que detectou todos os estágios de *Cryptosporidium* no epitélio cecal. Posteriormente, Slavin (1955) descreveu uma nova espécie, *Cryptosporidium meleagridis*, que causa quadro clínico de diarreia em aves e também enfermidade em seres humanos. Em meados da década de 80, Current et al. (1986) classificaram uma nova espécie, *Cryptosporidium baileyi* e, finalmente, Pavlásek (1999) descreveu e classificou uma espécie parasitando proventrículo, classificando-a como *Cryptosporidium galli*.

Em aves, a criptosporidiose constitui-se em uma das principais infecções por

protozoários com potencial zoonótico, se manifestando como enfermidade respiratória, gástrica ou entérica, de curso agudo ou crônico (GOODWIN, 1989; NAKAMURA; MEIRELES, 2015; RYAN, 2010; SRÉTER; VARGA, 2000) nas ordens Accipitriformes, Anseriformes, Bucerotiformes, Caprimulgiformes, Cathartiformes, Charadriiformes, Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Passeriformes, Phoenicopteriformes, Piciformes, Psittaciformes, Strigiformes, Struthioniformes (NAKAMURA; MEIRELES, 2015). Em algumas situações, *Cryptosporidium* spp. é considerado um agente secundário e oportunista que pode contribuir ou ser a causa de óbitos em psitacídeos (RAVICH et al. , 2014).

Além dessas espécies, há a descrição dos genótipos I (MEIRELES et al. , 2006; NAKAMURA et al. , 2009; NG et al. , 2006), II (MEIRELES et al. , 2006; NAKAMURA et al. , 2009; NG et al. , 2006; NGUYEN et al. , 2013; SANTOS et al. , 2005; SEVÁ et al. , 2011), III (MAKINO et al. , 2010; NAKAMURA et al. , 2014, 2009; NG et al. , 2006), IV (NG et al. , 2006), V (ABE; MAKINO, 2010) e VI (CHELLADURAI et al. , 2016). Recentemente, *Cryptosporidium* genótipo V foi classificado como uma espécie denominada *Cryptosporidium avium* (HOLUBOVÁ et al. , 2016).

2 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. é uma das principais características que o aproxima dos gregarinos (Figura 1), sendo iniciado pelos oocistos que são eliminados já esporulados no ambiente, portanto, hábeis a infectar um novo hospedeiro que os ingerir ou, em alguns casos, os inalar. Adentrando o novo organismo, haverá a excitação, a qual permitirá a liberação dos quatro esporozoítos de cada oocisto, os quais farão adesão às células epiteliais de predileção. Uma vez aderidos, eles serão englobados pelas microvilosidades para que haja a formação do vacúolo parasitóforo, permitindo que o parasito assuma a posição epicelular. A partir desta etapa, os trofozoítos podem iniciar a merogonia e se reproduzir assexuadamente, ou a partir de reprodução de sexuada através dos macrogamontes e microgamontes, sendo que a segunda dará origem aos oocistos esporulados (BARTA; THOMPSON, 2006; CLODE et al. , 2015). Uma terceira forma de reprodução baseia-se na capacidade de evitar a merogonia e iniciar a divisão mitótica a partir da fusão de

esporozoítos. Outras particularidades são os estágios extracelulares do ciclo, particularmente trofozoítos e estruturas similares aos gamontes, que são capazes de se desenvolver fora das células hospedeiras, fazendo com que este protozoário não seja um microrganismo de localização obrigatoriamente epitelial, quando em condições ideais para seu desenvolvimento (BARTA; THOMPSON, 2006).

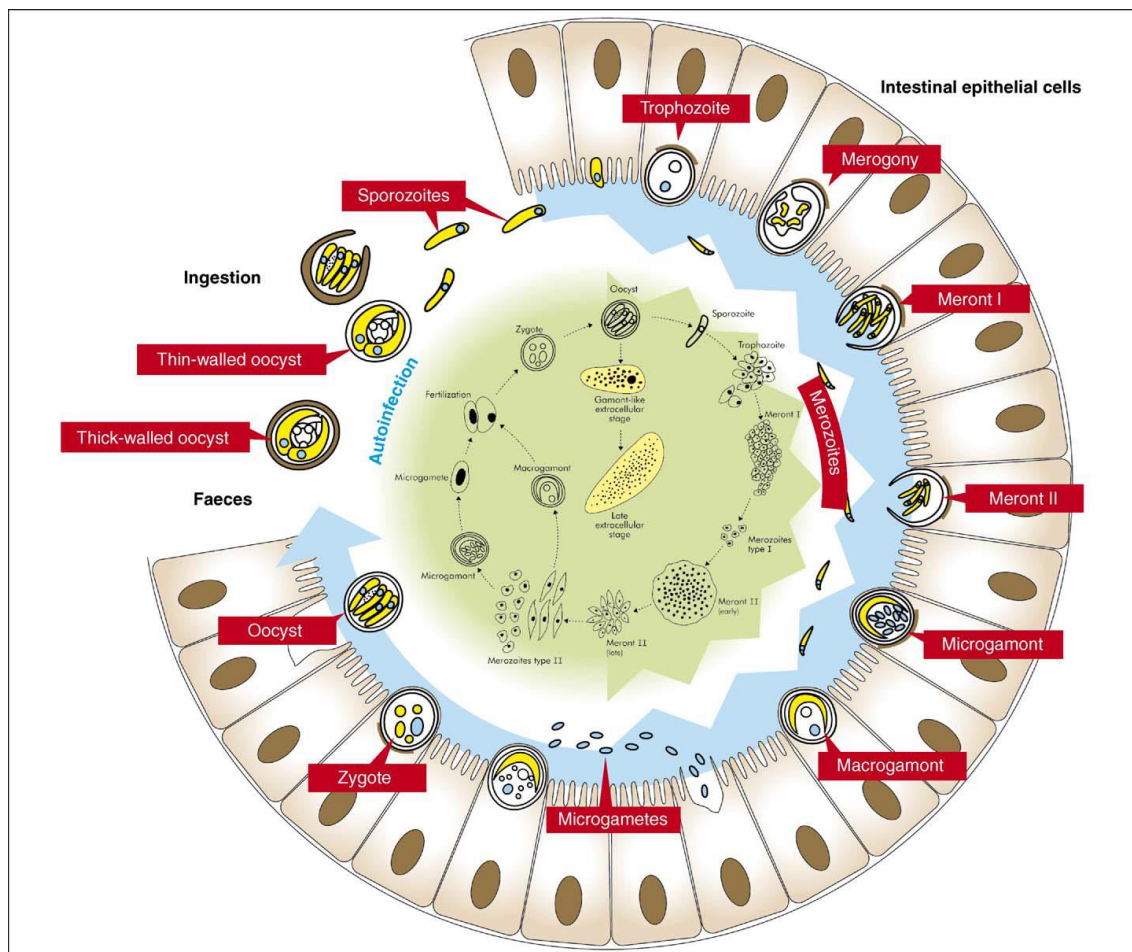


Figura 1- Ciclo de vida intestinal de *Cryptosporidium* spp. demonstrando as fases intracelulares e extracelulares (BARTHA; THOMPSON, 2006).

Os oocistos podem apresentar parede fina ou, em sua maioria, de parede grossa. Os de parede fina podem existir ainda no hospedeiro, portanto, causando reinfecção, e os de parede grossa são eliminados no ambiente (CURRENT; REESE, 1986). Os oocistos eliminados nas fezes permanecem infectantes por vários meses, dependendo das condições climáticas, sendo que por até seis meses em temperatura

média de 20°C, três meses de 25 a 30°C e sete meses quando a 15°C (ANDERSON, 1985; FAYER et al. 1998; JENKINS et al. , 2003).

3 EPIDEMIOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS

Em psitacídeos, a maior parte das descrições de infecção por *Cryptosporidium* spp. está relacionada à calopsita (*Nymphicus hollandicus*), provavelmente, devido ao fato dessas aves serem bastante difundidas como animais de estimação. *Cryptosporidium* genótipo III é causador de criptosporidiose gástrica e é relatado com maior frequência em psitacídeos que as outras espécies e genótipos descritos em aves (Tabela 1).

No Brasil, já foram descritas em psitacídeos as espécies *C. avium* (NAKAMURA et al. , 2014), *C. galli* (NAKAMURA et al., 2009, 2014) e *Cryptosporidium parvum* (NAKAMURA et al. , 2009), além dos genótipos II (SEVÁ et al. , 2011) e III de aves (GOMES et al. , NAKAMURA et al. , 2009, 2014). Nenhum relato brasileiro foi feito a partir de uma população de estudo contendo somente psitacídeos, sendo assim, a ocorrência nesta ordem não é bem definida no país.

Cryptosporidium avium, *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* diferem em termos de virulência e tropismo tecidual. Em relação ao órgão de predileção dos agentes etiológicos, tem-se que o *C. avium* parasita as microvilosidades do íleo e ceco (HOLUBOVÁ et al. , 2016), *C. baileyi*, o epitélio do trato respiratório, bursa de Fabricius, cloaca e rins (GOODWIN, 1989), *C. galli* infecta o proventrículo (PAVLÁSEK, 1999; RYAN et al. , 2003) e *C. meleagridis*, o epitélio do intestino delgado (SLAVIN, 1955).

Quando *C. galli* é a espécie responsável pela infecção e a enfermidade se apresenta de forma clínica, os sintomas se caracterizam como anorexia e emagrecimento e vômito crônico acometendo o proventrículo (MAKINO et al. , 2010; RAVICH et al. , 2014).

Tabela 1- Espécies de *Cryptosporidium* spp. descritas em psitacídeos

Espécies/ Genótipos	Espécies de aves	Países	Autores
<i>Cryptosporidium avium</i>	<i>Agapornis fischeri</i> , <i>Agapornis roseicollis</i> , <i>Amazona aestiva</i> , <i>Lophochroa leadbeateri</i> , <i>Melopsittacus undulatus</i> , <i>Nymphicus hollandicus</i>	Brasil, China, Estados Unidos, Japão	Abe; Makino, 2010; Abe et al. , 2015; Curtiss et al. , 2015; Li et al. , 2016; Nakamura et al. , 2014; Qi et al. , 2011; Zhang et al. , 2015
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	<i>Melopsittacus undulatus</i> , <i>Nymphicus hollandicus</i>	China, Irã	Gharagozlou et al. , 2014; Li et al. , 2016
<i>Cryptosporidium galli</i>	<i>Aratinga leucophthalmu</i> , <i>Neophema pulchella</i> , <i>Nymphicus hollandicus</i>	Austrália, Brasil	Antunes et al. , 2008; Nakamura et al. , 2009, 2014; Ng et al. , 2006
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Japão	Abe; Iseki, 2004; Abe; Makino, 2010
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Brasil	Nakamura et al. , 2009
<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Amazona aestiva</i> , <i>Ara chloroptera</i> , <i>Brotogeris tirica</i> , <i>Cacatua moluccensis</i> , <i>Pionus maximiliani</i> , <i>Platycercus eximius</i> , <i>Psittacula eupatria</i>	Brasil, Itália, Malásia	Holsback et al. , 2013; Papini et al. , 2012; Rohela et al. , 2005
Genótipo de ferret	<i>Melopsittacus undulatus</i>	China	Li et al. , 2016
Genótipo II de aves	<i>Aratinga leucophthalma</i> , <i>Aratinga solstitialis</i> , <i>Cacatua leadbeateri</i> , <i>Eclectus roratus</i> , <i>Polytelis alexandrae</i> , <i>Psittacula eupatria</i>	Austrália, Brasil	Ng et al. , 2006; Sevá et al. , 2011
Genótipo III de aves	<i>Agapornis roseicollis</i> , <i>Brotogeris tirica</i> , <i>Eolophus roseicapilla</i> , <i>Nymphicus hollandicus</i>	Austrália, Brasil, China, Estados Unidos, Japão	Abe; Makino, 2010; Gomes et al. , 2012; Makino et al. , 2010; Nakamura et al. , 2009, 2014; Ng et al. , 2006; Qi et al. , 2011; Ravich et al. , 2014

A infecção por *C. baileyi* é considerada parte do complexo respiratório das aves, como um agente primário ou secundário (BLAGBURN et al. , 1987). Em infecções respiratórias por *C. baileyi*, há acúmulo de muco na traquéia, nos pulmões e nos sacos aéreos, com presença de sinais clínicos caracterizados por dispneia, coriza e eventual mortalidade (RYAN et al. , 2003) e a infecção na bursa de Fabricius pode resultar em imunossupressão (ELADL et al. , 2014; NACIRI et al. , 1989).

Cryptosporidium meleagridis é a única espécie de aves que também acomete mamíferos (NAKAMURA; MEIRELES, 2015), inclusive podendo se caracterizar como uma infecção entérica zoonótica (RYAN, 2010).

A infecção por *C. avium* geralmente é subclínica (HOLUBOVÁ et al. , 2016), embora haja um relato de infecção em uma cacatua-rosa (*Lophochroa leadbeateri*) que apresentava letargia, anorexia e prolapso cloacal (CURTISS et al. , 2015).

Embora os genótipos não possuam características de infecção bem definidas, por meio de análise filogenética é possível identificar as espécies correlatas, permitindo que algumas informações sejam inferidas. Por meio de análises filogenéticas sabe-se que o *Cryptosporidium* genótipo I e II de aves são geneticamente próximos a *C. baileyi* (MEIRELES et al. , 2006) e os genótipos III, IV e VI são geneticamente similares a *C. galli* (CHELLADURAI et al. 2016; MAKINO et al. , 2010; NG et al. , 2006).

Os dados sobre a especificidade de *Cryptosporidium* spp. por hospedeiros ainda são bastante escassos. As espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. que ocorrem em psitacídeos ainda são pouco elucidadas, mas sua identificação seria importante para determinar o potencial patogênico e zoonótico do parasito (RAVICH et al. , 2014).

4 DIAGNÓSTICO

A criptosporidiose não apresenta sinais ou lesões patognomônicas e a sintomatologia clínica pode estar associada à infecção por outros patógenos entéricos, dificultando o diagnóstico clínico (BAROUDI et al. , 2013; RAVICH et al. , 2014). Casos clínicos sugerem que psitacídeos com infecção por *Cryptosporidium* spp. , como agente primário ou secundário, apresentam fezes esverdeadas, regurgitação

crônica ou intermitente, perda de peso e outros sinais inespecíficos, como letargia, fraqueza, hiporexia e penas eriçadas (RAVICH et al. , 2014).

No diagnóstico necroscópico macroscópico de psitacídeos hospedeiros do protozoário podem-se evidenciar espessamento ou adelgaçamento da parede do proventrículo e dilatação intestinal. Lesões microscópicas associadas à criptosporidiose em psitacíformes podem ser observadas por meio de exames histopatológicos, notando-se hiperplasia do epitélio dos ductos das glândulas proventriculares, com presença do parasito intraluminal, proventriculite, ventriculite linfocítica e enterite não supurativa com presença do protozoário na mucosa (RAVICH et al. , 2014). Nos rins, ureteres e cloaca há descrição de inflamação associada à presença do parasito (CURTISS et al. , 2015; DOSTER; MAHAFFEY, 1979).

Conhecer os locais de predileção para cada espécie do parasito em um organismo é importante para um correto diagnóstico (RAVICH et al. , 2014). A utilização de exames complementares quase sempre é necessária devido à sintomatologia inespecífica. As técnicas utilizadas para diagnóstico dessa parasitose não são adotadas rotineiramente em laboratórios de ornitopatologia (NAKAMURA et al. , 2014), mas inúmeras são as técnicas disponíveis para se efetuar o diagnóstico.

A experiência é um fator fundamental para diagnóstico de criptosporidiose, uma vez que os oocistos do gênero *Cryptosporidium* são pequenos, quando comparados a outros coccídios, não apresentam esporocistos, são difíceis de serem visualizados e são morfológicamente similares a esporos de fungos e leveduras (CASEMORE, 1991; ELLIOT et al. , 1999). Apesar dos oocistos de algumas espécies apresentarem morfologia e morfometria distintas, a análise microscópica não os distingue, pelo fato de apresentarem pequena variação morfológica e morfométrica e, em muitos casos, serem idênticos entre diferentes espécies ou genótipos (RYAN, 2010).

As técnicas de coloração para microscopia são amplamente utilizadas, possuem baixo custo e são rápidas e fáceis de executar. Pela coloração negativa com verde malaquita, os oocistos desse parasito são observados ao microscópio como estruturas redondas a ovaladas, brilhantes e envoltas por um fundo verde (ELLIOT et al. , 1999).

As técnicas imunológicas como *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), apresentam maior sensibilidade que as técnicas de coloração, no entanto, os antígenos da parede dos oocistos apresentam reatividade cruzada entre diferentes espécies de *Cryptosporidium*, não sendo possível o diagnóstico espécie-específico (FAYER et al. , 2000; JEX et al. , 2008).

O único método de identificação confiável entre as diferentes espécies de *Cryptosporidium* é a caracterização molecular, sendo estas opções de diagnóstico as mais sensíveis e específicas (RYAN et al. , 2014). Embora seja uma técnica de alto custo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados, detecta baixas quantidades de DNA nas amostras e permite a identificação de *Cryptosporidium* em nível de espécie. O gene mais utilizado para realização de caracterização molecular do parasito é o 18S rRNA que, por ser bastante conservado, permite a identificação de todas as espécies de *Cryptosporidium* spp. (RYAN et al. , 2014).

5 TRATAMENTO E PROFILAXIA

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

Os oocistos de *Cryptosporidium* são altamente resistentes à maioria dos desinfetantes e, quando sensíveis, necessitam de períodos maiores que uma hora de contato para que 90% deles sejam inativados. O único desinfetante efetivo que pode ser usado em água potável é o ozônio (KORICH et al. , 1990). A temperatura parece ser um fator importante para a viabilidade dos oocistos, sendo a inativação relacionada a maiores temperaturas (JENKINS et al. , 2002).

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em psitacídeos mantidos em cativeiro e realizar comparações entre métodos de diagnóstico para detecção de *Cryptosporidium* spp. e de espécies gástricas do parasito.

REFERÊNCIAS

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

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

ABE, N.; MATSUBARA, K. Molecular identification of *Cryptosporidium* isolates from exotic pet animals in Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 209, p. 254-257, 2015

.

ABE, N.; MATSUO, K.; MAKINO, I. *Ascaridia nymphii* n. sp. (Nematoda: Ascaridida) from the alimentary tract of a severely emaciated dead cockatiel *Nymphicus hollandicus*. **Parasitology Research**, p. 1-8, 2015.

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

ANTUNES, R. G.; SIMÕES, D. C.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from

Brazil. **Avian Diseases**, v. 52, p. 702-705, 2008.

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

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

BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; GIAMBRONE, J.; SUNDERMANN, C. A.; HOERR, F. J. Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 66, p. 442-449, 1987.

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

CHELLADURAI, J. J.; CLARK, M. E.; KVÁČ, M.; HOLUBOVÁ, N.; KHAN, E.; STENGER, B. L. S.; GIDDINGS, C. W.; MCEVOY, J. *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium avian* genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). **Parasitology Research**, p. 3-6, 2016.

CLODE, P. L.; KOH, W. H.; THOMPSON, R. C. A. Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? **Trends in Parasitology**, v. 31, p. 614-624, 2015.

CURRENT, W. L.; REESE, N. C. A Comparison of Endogenous Development of Three Isolates of *Cryptosporidium* in Suckling Mice. **The Journal of Eukaryotic**

Microbiology, v. 33, p. 98-108, 1986.

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

CURTISS, J. B; LEONE, A. M.; WELLEHAN, J. F. JR; EMERSON, J. A.; HOWERTH, E. W.; FARINA, L. L. Renal and cloacal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* avian genotype V) in a Major Mitchell's Cockatoo (*Lophochroa leadbeateri*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** v. 46, p. 934-937, 2015.

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

ELADL, A. H.; HAMED, H. R.; KHALIL, M. R. Consequence of cryptosporidiosis on the immune response of vaccinated broiler chickens against Newcastle disease and/or avian influenza. **Veterinary Research Communications**, v. 38, p. 237-247, 2014.

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

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

FAYER, R.; MORGAN, U. M.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*:

transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1305-1322, 2000.

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.

GHARAGOZLOU, M. J.; NOURI, M.; POURHAJATI, V. Cryptosporidial Infection of Lower Respiratory Tract in a Budgerigar (*Melopsittacus undulates*). **Archives of Razi Institute**, v. 69, p. 95-97, 2014.

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

GOODWIN, M. A. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Avian Pathology**, v. 18, p. 365-384, 1989.

HOLSBACK, L.; CARDOSO, M. J. L.; FAGNANI, R.; PATELLI, T. H. C. Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 302-306, 2013.

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

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

JENKINS, M.; TROUT, J. M.; HIGGINS, J.; DORSHC, M.; VEAL, D.; FAYER, R. Comparison of testes for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Parasitology Research**, v. 89, p. 1-5, 2003.

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

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

LI, Q.; LI, L.; TAO, W.; JIANG, Y.; WAN, Q.; LIN, Y.; LI, W. Molecular investigation Of *Cryptosporidium* in small caged pets in northeast China: host specificity and zoonotic implications. **Parasitology Research**, p. 1-7, 2016.

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

MEIRELES, M. V.; SOARES, M. R.; SANTOS, M. M. A. B.; GENNARI, S. M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from

ostrich (*Struthiocamelus*). **Jornal of Parasitology**, v. 92, p. 623-626, 2006.

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

NACIRI, M.; MAZZELLA, O.; COUDERT, F. Interactions cryptosporidies-virus sauvage ou vaccinal de la maladie de Marek chez le poulet. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 165, p. 383-387, 1989.

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

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

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

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

NGUYEN, S. T.; FUKUDA, Y.; TADA, C.; HUYNH, V. V.; NGUYEN, D. T.; NAKAI, Y. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in ostriches (*Struthio camelus*) on a farm in central Vietnam. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 8-11, 2013.

PAPINI, R.; GIRIVETTO, M.; MARANGI, M.; MANCIANTI, F.; GIANGASPERO, A. Endoparasite infections in pet and zoo birds in Italy. **The Scientific World Journal**, p. 1-10, 2012.

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

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

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

ROHELA, M.; LIM, Y.; JAMIAH, I.; KHADIJAH P. Y. Y.; LAANG, S. T.; MOHD, M. H.; NURULHUDA, Z. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in wrinkled hornbill and other birds in the kuala lumpur national zoo. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, p. 34-40, 2005.

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

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

RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. **International Journal for Parasitology**, v. 45(6), p. 367-373, 2015.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. 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.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporididae) from birds. **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.

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

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARÃES, M. B.; SOUZA, S. O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J. A.; DUARTE, V. V.; SOARES,

R. M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 27-32, 2011.

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

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

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

TRAMPEL, D. W.; PEPPER, T. M.; BLAGBURN, B. L. Urinary tract cryptosporidiosis in commercial laying hens. **Avian Diseases**, v. 44, p. 479-484, 2000.

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

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

VALIGUROVÁ, A.; JIRKŮ, M.; KOUDELA, B.; GELNAR, M.; MODRY, D.; ŠLAPETA, J. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. **International Journal for Parasitology**, v. 38 (8-9), p. 913-922, 2008.

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

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

ZHANG, X.; ZHANG, N.; ZHAO, G.; ZHAO, Q.; ZHU, X. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* infection in pet parrots in North China. **Biomed Research International**, p. 1-7, 2015.

CAPÍTULO 2 - *Cryptosporidium* spp. IN CAGED EXOTIC PSITTACINES FROM BRAZIL: EVALUATION OF DIAGNOSTIC METHODS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

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

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

²Faculdades Adamantinenses Integradas (FAI), Adamantina, Brazil

³Fundação Municipal de Ensino Superior, Bragança Paulista, Brazil

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

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the prevalence of and diagnostic methods for *Cryptosporidium* spp. in caged adult exotic parrots from Southern and Southeastern Brazil. Oocysts were purified from fecal samples from 463 psittacines by centrifugal-flotation in Sheather's sugar solution. *Cryptosporidium* spp. were detected by malachite green negative staining and nested PCR targeting the 18S rRNA gene. *Cryptosporidium* species were identified by sequencing nested PCR amplicons. Samples were also tested by duplex real-time PCR targeting the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium galli* and *Cryptosporidium* avian genotype III. The prevalence rates of *Cryptosporidium* spp. determined by microscopy and nested PCR were 3. 0% (14/463) and 5. 0% (23/463), respectively. The nested PCR/sequencing identified avian genotype III (1. 7%; 8/463), *Cryptosporidium parvum* (0. 9%; 4/463) and *Cryptosporidium canis* (0. 2%; 1/463). Duplex real-time PCR was positive for gastric *Cryptosporidium* in 9. 5% (44/463) of the samples. Among them, 1. 9% (9/463) were positive for *C. galli*, 5. 8% (27/463) were positive for avian genotype III and 1. 7% (8/463) showed mixed infections with *C. galli* and avian genotype III. With regards to the positive detection of *Cryptosporidium* spp. , there was no statistically significant difference between nested PCR and microscopic analysis ($p = 0. 1237$), and a fair agreement existed between them (Kappa = 0. 242). A statistically significant difference ($p < 0. 0001$) and fair agreement (Kappa = 0. 317) were obtained between nested PCR/sequencing and duplex real-time PCR for the detection of gastric *Cryptosporidium*. We determined that nested PCR and duplex real-time PCR are the best options for the detection of *Cryptosporidium* spp. and gastric *Cryptosporidium*, respectively, and that avian genotype III is the most common *Cryptosporidium* genotype/species in psittacines.

Key Words: *Cryptosporidium*, PCR, microscopy, psittacines

1. INTRODUCTION

Cryptosporidium spp. are protists typically found in the gastrointestinal tract (Valigurová et al. , 2008) that occasionally infect respiratory (Dhillon et al. , 1981), biliary (Kovatch and White, 1972) and urinary tracts (Trampel et al. , 2000), causing clinical and subclinical infections (Santín, 2013) in a wide range of vertebrate hosts.

In birds, the valid species are *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin, 1955), *Cryptosporidium baileyi* (Current et al. , 1986), *Cryptosporidium galli* (Pavlásek, 1999) and *Cryptosporidium avium* (Holubová et al. , 2016). In addition to these species, there are descriptions of the *Cryptosporidium* avian genotypes I (Ng et al. , 2006), II (Santos et al. , 2005; Meireles et al. , 2006; Ng et al. , 2006), III, IV (Ng et al. , 2006), and VI (Chelladurai et al. , 2016); the black duck genotype (Morgan et al. , 2001), the Eurasian woodcock genotype (Ryan et al. , 2003), the goose genotypes I-IV (Jellison et al. , 2004; Zhou et al. , 2004) and the duck genotype (Zhou et al. , 2004) infecting birds.

Avian species belonging to 16 orders have already been identified as hosts of *Cryptosporidium* (Nakamura and Meireles, 2015). In Psittaciformes, cryptosporidiosis manifests as an acute disease of the digestive and respiratory tracts. Clinical and necroscopic diagnosis of cryptosporidiosis is difficult since the clinical signs and macroscopic lesions related to cryptosporidiosis are not pathognomonic. Furthermore, *Cryptosporidium* infections in birds are often associated with infections by other pathogens (Ravich et al. , 2014).

Infections in birds by gastric *Cryptosporidium* such as *C. galli* and avian genotype III are subclinical or associated with anorexia, weight loss and chronic vomiting (Makino et al. , 2010; Ravich et al. , 2014). *C. baileyi* infection is frequently related to respiratory clinical signs (Current et al. , 1986), and *C. meleagridis* infection occurs in the gut, causing symptoms related to the intestinal tract (Sréter et al. , 2000).

C. meleagridis is the only zoonotic species in birds (Nakamura and Meireles, 2015). In some countries, *C. meleagridis* infection in humans may present a frequency similar to or greater than *C. parvum* infection (Cama et al. , 2003; Morgan et al. , 2001). Studies using phylogenetic analyses suggest that *C. meleagridis* isolated from humans and birds are genetically related (Wang et al. , 2014). Furthermore, the detection of *C. parvum* in bird feces has been increasingly frequent, with reports in several avian species (Nakamura and Meireles, 2015). Due to these facts, the zoonotic potential of avian cryptosporidiosis must be observed carefully, owing to the direct or indirect contact between humans and food or pet animals.

Microscopic analysis is an inexpensive, easy and rapid technique that allows visualization of *Cryptosporidium* oocysts (Elliot et al. , 1999), while molecular methods, although expensive, detect even low amounts of DNA in stool samples and allow for the identification of parasite species (Ryan et al. , 2014). The decision of whether to opt for any diagnostic method in epidemiological studies depends on the cost-benefit analysis for each animal species.

The objective of this study was to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in caged psittacines. Furthermore, we accomplished the comparison between diagnostic methods for the detection of *Cryptosporidium* spp. and gastric avian *Cryptosporidium* species and genotypes.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study population and fecal sample collection

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine, Araçatuba, process FOA 2015-00572.

Fecal samples were obtained from 463 adult exotic captive psittacines belonging to 24 species (Table A. 1), randomly selected from 36 aviaries located in the Southern and Southeastern regions of Brazil during a bird exhibition at the 2015 Ornithological Championship of the Ornithological Federation of Brazil (FOB).

Samples were collected from the bottom of the cage at the time of the bird's reception at the championship to avoid cross-contamination. Each sample was collected using a disposable wooden spatula and then stored at 4° C in 2 mL microtubes containing 0. 9% sodium chloride solution.

2.2. Fecal sample purification and microscopic examination

The fecal samples were purified in a 2. 0 mL microtube by centrifugal-flotation using Sheather's sugar flotation solution [454 g of table sugar, 355 mL of phosphate buffered saline (PBS) pH 7. 4, 0. 1% Tween 20]. The resulting sediment from 463 fecal samples was resuspended in 200 µL of PBS/0. 01% Tween 20 and divided into two aliquots. One aliquot was diluted with 10% buffered formaldehyde for microscopic analysis intended to screen for oocysts and the determination of morphological and morphometric data, and the other aliquot was frozen at -20°C for DNA extraction.

Cryptosporidium spp. oocyst screening and morphometric analysis were accomplished using malachite green negative staining (Elliot et al. , 1999). Length and width of avian genotype III oocysts (n=20) from PCR/sequencing and duplex real-time PCR positive fecal samples were measured under optical microscopy at 1000x magnification (Olympus BX 50).

2.3. Genomic DNA extraction and PCR amplification

Genomic DNA was extracted from the oocysts using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), following the manufacturer's guidelines, except that the samples were incubated for 60 minutes in ASL buffer at 99°C before DNA extraction. Nested PCR was performed for the amplification of an ~587 bp fragment of the 18S subunit gene of *Cryptosporidium* spp. (Ryan et al. , 2003). Genomic DNA from *C. parvum* and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively. The amplified fragments were visualized by GelRed® stained gel electrophoresis (Biotium, Fremont, USA).

Duplex real-time PCR was performed in the CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA) using primers and minor groove binding (MGB) probes specific for gastric cryptosporidiosis (Nakamura et al. , 2014). *C. galli* and avian genotype III genomic DNA and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively.

2.4. Molecular cloning

The amplicons from 14 samples that were positive by duplex real-time PCR and negative by microscopy and nested PCR were purified using the PureLink™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and cloned using the CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), following the manufacturer's guidelines.

2.5. DNA sequence analysis

The nested PCR amplicons and plasmids from molecular cloning were purified using Illustra ExoProStar 1-Step® (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, England), following the manufacturer's guidelines. Sequencing was accomplished using the ABI Prism® Dye Terminator Cycling Sequence kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) in the automated sequencer, ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City,

USA). DNA sequences were assembled with CodonCode Aligner version 4.0.1 software (CodonCode Corporation, Dedham, USA). The consensus sequences were aligned with homologous sequences published in GenBank using Clustal W (Thompson et al., 1997) and the BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

Nucleotide sequences generated in this study were submitted to the GenBank database under the accession numbers MF462153 to MF462158.

2. 7. Statistical analysis

The data analysis consisted of descriptive statistics, frequency analysis (McNemar test) to verify the paired proportions and the Kappa correlation coefficient to evaluate the agreement between the methods. The database was created in Microsoft Office Excel 2010, and statistical results were considered significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The rates of results positive for *Cryptosporidium* spp. obtained by microscopy and nested PCR were 3.0% (14/463) and 5.0% (23/463), respectively. The sequencing of nested PCR amplicons allowed the identification of avian genotype III (1.7%; 8/463), *C. parvum* (0.9%; 4/463) and *Cryptosporidium canis* (0.2%; 1/463). All the sequences had 100% genetic similarity with sequences previously published in GenBank (GQ227480, AH006572, AF308600 and AF112576).

The use of formalin for the preservation of oocysts was aimed at preventing excystation (Widmer et al., 2007) and oocyst disintegration (Jirků et al., 2008) during the storage of oocysts from gastric *Cryptosporidium*, as observed in our laboratory with *C. serpentis* oocysts preserved in potassium dichromate (unpublished results). The mean size of avian genotype III oocysts was described elsewhere as $6.7 \times 5.2 \mu\text{m}$ (Makino et al., 2010), which is similar to the $6.4 \times 5.0 \mu\text{m}$ ($n=20$) mean size we found for oocysts from samples positive for avian genotype III. Although structural variation is expected over time during the storage of oocysts in several fixatives, Duszynski and Gardner (1991) found that *Eimeria* oocysts preserved in 10% buffered formalin maintained structural integrity for at least 115 days.

Microscopic staining techniques are widely used for *Cryptosporidium* spp. diagnosis because they have low costs and are easy to perform (Elliot et al., 1999). Several samples that were classified as negative by microscopy tested positive by nested PCR and duplex real-time PCR (Table 1). Oocyst screening by microscopy showed that

all positive samples had a low number of oocysts per slide (Figure 1). Since infections with gastric species of *Cryptosporidium* in birds, as a rule, have a low number of oocysts in fecal samples (Nakamura et al. , 2009), false-negative results may occur when microscopy is used for *Cryptosporidium* detection in birds.

Two samples that were considered positive by microscopy tested negative by nested PCR and duplex real-time PCR. Numerous factors may decrease the sensitivity of PCR and generate false-negative results, such as a low number of oocysts in feces of birds infected by gastric *Cryptosporidium* species (Nakamura et al. , 2009) associated with PCR inhibitors coextracted with DNA (Schrader et al. , 2012). The rates of positive results for *Cryptosporidium* spp. obtained by nested PCR were similar to those described in the literature in which psittacines were included in the studied populations (Nakamura et al. , 2009, 2014; Qi et al. , 2011).

Duplex real-time PCR was positive for gastric *Cryptosporidium* in 9. 5% (44/463) of the samples. Among them, 1. 9% (9/463) were positive for *C. galli*, 5. 8% (27/463) were positive for avian genotype III and 1. 7% (8/463) showed mixed infections with *C. galli* and avian genotype III (Table 1).

Duplex real-time PCR aims to quickly and specifically detect the gastric species/genotypes of *Cryptosporidium* that are the most frequent causes of cryptosporidiosis in Passeriformes and Psittaciformes (Nakamura et al. , 2014). The amplification of fragments of smaller sizes and the use of MGB probes increases the sensitivity and the specificity of real-time PCR, respectively (Chakravorty et al. , 2006). Nine samples that were positive by microscopy were negative by nested PCR but positive by duplex real-time PCR. All samples classified as avian genotype III by nested PCR/sequencing also tested positive by duplex real-time PCR. We detected mixed infection in eight samples using duplex real-time PCR. The identification of mixed infections by gastric species is another advantage of duplex real-time PCR since mixed infections are not easily identified by nested PCR/sequencing.

Positivity for gastric *Cryptosporidium* obtained by duplex real-time PCR was lower than that described by Nakamura et al. (2014), who used fecal samples from birds originating from either captivity or the wild and housed in individual cages closely placed side by side. Samples from this study were collected at the time of each bird's reception at the facility to avoid cross-contamination. Additionally, the birds originated from a championship, so it is assumed that the owners have exhibited birds with better

physical status and, consequently, better health status, therefore reducing the chance of clinical or subclinical infections and oocyst shedding.

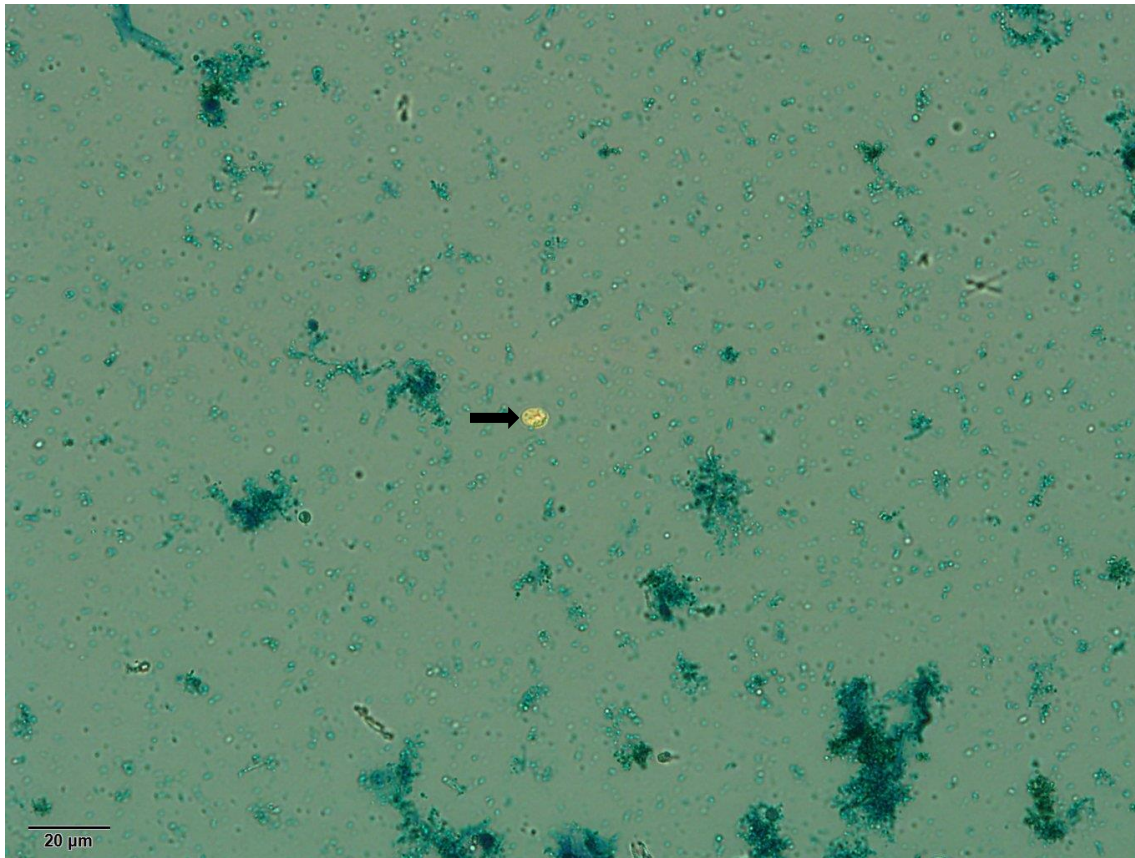


Figure 1. *Cryptosporidium* avian genotype III oocyst (arrow). Fecal sample from a *Nymphicus hollandicus* (MG1 aviary – Table A. 2) using malachite green negative staining.

The amplicons from 12 duplex real-time PCRs were successfully cloned and sequenced. The cloned amplicons were 100% similar to sequences from avian genotype III (GenBank GQ227480) or *C. galli* (GenBank GU734645 and KT352999) (Table A. 2). Molecular cloning was performed to confirm the specificity of duplex real-time PCR. Nakamura et al. (2014) have described high specificity for both primers and probes to detect avian genotype III and *C. galli*.

Avian genotype VI was described in the proventriculus of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) (Chelladurai et al. , 2016). Even though we have not detected avian genotype VI in 12 samples submitted for cloning and sequencing, we cannot ensure that none of the duplex real-time PCR positive reactions detected this genotype since it presents the same annealing regions on the 18S rRNA gene for primers and probes used for duplex real-time PCR, except one and two substitutions in the *C. galli*

and avian genotype III forward primers, respectively, and one substitution in the avian genotype III probe.

There was no significant difference between nested PCR and microscopic analysis results ($p = 0.1237$) by the McNemar test, and the Kappa correlation coefficient showed a fair agreement (Kappa = 0.242) (Landis and Koch, 1977) between them. The rates of positive results obtained by duplex real-time PCR and nested PCR/sequencing for the diagnosis of gastric cryptosporidiosis were significantly different ($p < 0.0001$). The concordance between duplex real-time PCR and nested PCR/sequencing was also considered fair (Kappa=0.317).

Table 1. Results of three diagnostic techniques for *Cryptosporidium* spp. in fecal samples of parrots.

Malachite green negative staining (<i>Cryptosporidium</i> spp.)	Nested PCR		Duplex Real-Time PCR		No. samples (%)
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Amplicon sequencing (No. samples)	<i>C. galli</i>	Avian genotype III	
-	-	-	+	-	8 (1.7)
-	+	ns ^a (1)	+	-	1 (0.2)
+	-	-	+	+	1 (0.2)
-	-	-	+	+	7 (1.5)
-	-	-	-	+	13 (2.8)
-	+	Avian genotype III (3)	-	+	3 (0.7)
+	+	Avian genotype III (5)	-	+	5 (1.1)
+	-	-	-	+	6 (1.3)
+	-	-	-	-	2 (0.4)
-	+	<i>C. canis</i> (1) <i>C. parvum</i> (4) ns (9)	-	-	14 (3.0)
-	-	-	-	-	403 (87.0)
					463 (100)

^a Samples not sequenced.

Parrots seem to be infected mainly by host-adapted *Cryptosporidium* species/genotypes (Xiao et al. , 2002). Avian genotype III is common in psittacines (Makino et al. , 2010; Nakamura et al. , 2014; Ng et al. , 2006; Ravich et al. , 2014), as demonstrated in this study in both molecular tests. The clinical significance of gastric cryptosporidiosis in parrots is still poorly understood and has been associated with clinical and subclinical infections (Makino et al. , 2010; Ravich et al. , 2014). More sensitive and specific molecular techniques have become essential for the specific diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds.

In several countries, *C. parvum* is the main causative agent of human cryptosporidiosis (Xiao and Feng, 2008). There is only one report of *C. parvum* causing clinical disease in birds (Zylan et al. , 2008). *C. parvum* is not considered to be a major cause of disease in birds, although there are many reports of detection of *C. parvum* DNA in fecal samples of asymptomatic birds from several orders (Nakamura et al. , 2009; Reboredo-Fernández et al. , 2015; Oliveira et al. , 2017). In parrots, *C. parvum* has been found in *Nymphicus hollandicus* (Nakamura et al. , 2009) and now, we describe it in three *Forpus* sp. and in one *Psittacula krameri*.

The possible transmission of *C. canis* among children and a dog has been suggested (Xiao et al. , 2007), and its occurrence ranges from 0. 04% (1/2414) in individuals with diarrhea (Leoni et al. , 2006) to 4. 0% (12/302) in immunosuppressed individuals (Cama et al. , 2003). *C. canis* DNA was found in a fecal sample from *P. krameri*. *C. canis* is commonly associated with infection in dogs (Fayer et al. , 2001) and has never been found in birds.

The coexistence of birds and other domestic animals in the same environment is common and facilitates the transmission of *Cryptosporidium* spp. oocysts among different host species. All the samples positive for *C. canis* and *C. parvum* DNA tested negative by microscopy. The presence of DNA from *Cryptosporidium* species adapted to mammals in feces from parrots may indicate an absence of proper management practices in the aviary, which may have allowed the psittacines to ingest oocysts from contaminated food or water and shed oocysts mechanically.

4. CONCLUSION

Zoonotic *Cryptosporidium* species, such as *C. parvum* and *C. canis*, can be observed in fecal samples from psittacines. Nested PCR and duplex real-time PCR were the best options for the detection of *Cryptosporidium* spp. and gastric *Cryptosporidium*,

respectively, in psittacines. Although several *Cryptosporidium* species/genotypes have been found in this study, avian genotype III was the most commonly detected in the feces of captive exotic psittacines from the Southern and Southeastern regions of Brazil.

FINANCIAL DISCLOSURES

This work was supported by the São Paulo Research Foundation [Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2015/26334-8)] and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) for a master's degree scholarship awarded to E. D. Ferrari.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Cama, V. A. , Bern, C. , Sulaiman, I. M. , Gilman, R. H. , Ticona, E. , Vivar, A. , Kawai, V. , Vargas, D. , Zhou, L. , Xiao, L. , 2003. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. J. Eukaryot. Microbiol. 50, 531–533. doi:10. 1111/j. 1550-7408. 2003. tb00620. x
- Chakravorty, S. , Pathak, D. , Dudeja, M. , Haldar, S. , Hanif, M. , Tyagi, J. S. , 2006. PCR amplification of shorter fragments from the devR (Rv3133c) gene significantly increases the sensitivity of tuberculosis diagnosis. FEMS Microbiol. Lett. 257, 306–311. doi:10. 1111/j. 1574-6968. 2006. 00187. x
- Chelladurai, J. J. , Clark, M. E. , Kváč, M. , Holubová, N. , Khan, E. , Stenger, B. L. S. , Giddings, C. W. , McEvoy, J. , 2016. *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). Parasitol. Res. 115, 1901–1906. doi:10. 1007/s00436-016-4930-8
- Current, W. L.; Upton, S. J.; Haynes, T. B. , 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. J. Protozool. 33, 289-296.
- Dhillon, A. S. , Thacker, H. L. , Dietzel, A. V. , Winterfield R. W. , 1981. Respiratory cryptosporidiosis in broiler chickens. Avian. Dis. 25, 747-751.

- Duszynski, D. , Gardner, S. L. , 1991. Fixing coccidian oocysts is not an adequate solution to the problem of preserving protozoan type material. *J. Parasitol.* , 77, p. 52-57.
- Elliot, A. , Morgan, U. M. , Thompson, R. C. , 1999. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45, 139–142. doi: 10. 2323/Jgam. 45. 139
- Fayer, R. , Trout, J. M. , Xiao, L. , Morgan, U. M. , Lal, A. A. , Dubey, J. P. , 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87, 1415-1422. doi: 10. 1645/0022-3395(2001)087[1415:CCNSFD]2. 0. CO;2
- Hall, T. A. , 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Holubová, N. , Sak, B. , Horčíčková, M. , Hlásková, L. , Květoňová, D. , Menchaca, S. , McEvoy, J. , Kváč, M. , 2016. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol. Res.* 115, 2243–2251. doi:10. 1007/s00436-016-4967-8
- Jellison K. L. , Distel, D. L. , Hemond, H. F. , Schauer, D. B. , 2004. Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 452-458. doi:10. 1128/AEM. 70. 1. 452-458
- Jirku, M. , Valigurová, A. , Koudela, B. , Krízek, J. , Modrý, D. , Slapeta, J. , 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol. (Praha).* 55, 81-94.
- Kovatch, R. M. , White, J. D. , 1972. Cryptosporidiosis in two juvenile rhesus monkeys. *Vet. Path.* 9, 426-440.
- Landis, J. R. , Koch, G. G. , 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33, 159-174.
- Leoni, F. , Amar, C. , Nichols, G. , Pedraza-Díaz, S. , McLauchlin, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* 55, 703-707. doi: 10. 1099/jmm. 0. 46251-0
- Makino, I. , Abe, N. , Reavill, D. R. , 2010. *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). *Avian Dis.* 54, 1102–1107. doi: 10. 1637/9227-123009-Case. 1
- Meireles, M. V. , Soares, R. M. , dos Santos, M. M. A. B. , Gennari, S. M. , 2006.

- Biological Studies and Molecular Characterization of a *Cryptosporidium* Isolate From Ostriches (*Struthio Camelus*). J. Parasitol. 92, 623–626. doi:10. 1645/0022-339592
- Morgan, U. M. , Monis, P. T. , Xiao, L. , Limor, J. , Sulaiman, I. , Raidal, S. , O. , O. , R. B. , G. , Murray, A. , Fayer, R. , Blagburn, B. L. , Lal, A. A. , Thompson, R. C. , 2001. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. Int. J. Parasitol. 31, 289–296.
- Nakamura, A. A. , Homem, C. G. , da Silva, A. M. J. , Meireles, M. V. , 2014. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. Vet. Parasitol. 205, 7–13. doi:10. 1016/j. vetpar. 2014. 07. 033
- Nakamura, A. A. , Meireles, M. V. , 2015. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. Braz. J. Vet. Parasitol. 24, 253–267. doi:10. 1590/S1984-29612015063
- Nakamura, A. A. , Simões, D. C. , Antunes, R. G. , da Silva, D. C. , Meireles, M. V. , 2009. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. Vet. Parasitol. 166, 47–51. doi:10. 1016/j. vetpar. 2009. 07. 033
- Ng, J. , Pavlasek, I. , Ryan, U. , 2006. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7548–7553. doi:10. 1128/AEM. 01352-06
- Oliveira, B. C. M, Ferrari, E. D, Panegossi, M. F. C, Nakamura, A. A. , Corbucci, F. S. , Nagata, W. B, dos Santos, B. M, Gomes, J. F, Meireles, M. V, Widmer, G. , Bresciani, K. D. S. First description of *Cryptosporidium parvum* in carrier pigeons (*Columba livia*). Vet. Parasitol. 243, 148-150. doi: 10. 1016/j. vetpar. 2017. 06. 023
- Pavlásek, I. , 1999. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. Remed Klinicka Mikrobiol. 3, 290-301.
- Qi, M. , Wang, R. , Ning, C. , Li, X. , Zhang, L. , Jian, F. , Sun, Y. , Xiao, L. , 2011. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: Genetic diversity and potential public health significance. Exp. Parasitol. 128, 336–340. doi:10. 1016/j. exppara. 2011. 04. 003
- Ravich, M. L. , Reavill, D. R. , Hess, L. , Childress, A. L. , Wellehan, J. F. X. , 2014. Gastrointestinal cryptosporidiosis in captive psittacine birds in the United States: A case review. J. Avian Med. Surg. 28, 297–303. doi:10. 1647/1082-6742-28. 4. 297
- Reboredo-Fernández, A. , Ares-Mazás, E. , Cacciò, S. M.; Gómez-Couso, H. , 2015. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest

- Spain). *Parasitology*. 146, 917-925. doi:10. 1017/S0031182015000049
- Ryan, U.; Fayer, R.; Xiao, L. , 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. 141, 1667-1685.
- Ryan, U. , Xiao, L. , Read, C. , Zhou, L. , Lal, A. a, Pavlasek, I. , 2003. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4302–4307. doi: 10. 1128/AEM. 69. 7. 4302-4307. 2003
- Santín, M. , 2013. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *N. Z. Vet. J.* 61, 1–10. doi:10. 1080/00480169. 2012. 731681
- Santos, M. , Peiró, J. R. , Meireles, M. V, 2005. *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: clinical, morphological and molecular studies. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 7, 113–117. doi:10. 1590/S1516-635X2005000200008
- Schrader, C. , Schielke, A. , Ellerbroek, L. , Johne, R. , 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014–1026. doi:10. 1111/j. 1365-2672. 2012. 05384. x
- Slavin, D. , 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65, 262-266.
- Sréter, T. , Kovács, G. , da Silva, A. J. , Pieniazek, N. J. , Széll, Dobos-Kovács, M. , Márialigeti, K. , Varga, I. , 2000. Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 735-738. doi: 10. 1128/AEM. 66. 2. 735-738. 2000
- Thompson, J. D. , Gibson, T. J. , Plewniak, F. , Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. , 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882
- Trampel, A. D. W. , Pepper, T. M. , Blagburn, B. L. , 2000. Urinary tract cryptosporidiosis in commercial laying hens, *Avian Dis.* 44, 479–484.
- Valigurová, A. , Jirků, M. , Koudela, B. , Gelnar, M. , Modrý, D. , Šlapeta, J. , 2008. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int. J. Parasitol.* 38, 913–922. doi:10. 1016/j. ijpara. 2007. 11. 003
- Wang, Y. , Yang, W. , Cama, V. , Wang, L. , Cabrera, L. , Ortega, Y. , Bern, C. , Feng, Y. , Gilman, R. , Xiao, L. , 2014. Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: Evidence for cross-species transmission. *Int. J. Parasitol.* 44, 515–521. doi:10. 1016/j. ijpara. 2014. 03. 003

- Widmer, G. , Klein, P. , Bonilla, R. , 2007. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology*. 134, 1583-1588. doi: 10.1017/S0031182007002922
- Xiao, L. , Cama, V. A. , Cabrera, L. , Ortega, Y. , Pearson, J. , Gilman, R. H. , 2007. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2014-2016. doi: 10.1128/JCM.00503-07
- Xiao, L. , Feng, Y. , 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 309-323. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00377.x
- Xiao, L. , Sulaiman, I. M. , Ryan, U. M. , Zhou, L. , Atwill, E. R. , Tischler, M. L. , Zhang, X. , Fayer, R. , Lal, A. A. , 2002. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: Implications for taxonomy and public health. *Int. J. Parasitol.* 32, 1773–1785. doi:10.1016/S0020-7519(02)00197-2
- Zhou, L. , Kassa, H. , Tischler, M. L. , Xiao, L. , 2004. Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4211-4215. doi:10.1128/AEM.70.7.4211-4215
- Zylan, K. , Bailey, T. , Smith, H. V. , Silvanose, C. , Kinne, J. , Schuster, R. K. , Hyland, K. , 2008. An outbreak of cryptosporidiosis in a collection of Stone curlews (*Burhinus oedicephalus*) in Dubai. *Avian Pathol.* 37, 521–526. doi:10.1080/03079450802357019

Table A. 1. Geographic origin of fecal samples from captive psittacines.

Brazilian state	Aviary	No. samples	Psittacine species
Minas Gerais	MG1	9	<i>Nymphicus hollandicus</i>
	MG2	4	<i>Platycercus</i> sp.
		27	<i>Psittacula krameri</i>
Rio de Janeiro	RJ115	2	<i>Agapornis</i> sp.
	RJ226	3	<i>Polytelis anthopeplus</i>
		2	<i>Platycercus</i> sp.
		1	<i>Psittacula cyanocephala</i>
		1	<i>Trichoglossus</i> sp.
Rio Grande do Sul	RS1	1	<i>Melopsittacus undulatus</i>
	RS2	7	<i>Psephotus haematonotus</i>
		3	<i>Neophema</i> sp.
		1	<i>Psephotus</i> sp.
		1	<i>Polytelis swainsonii</i>
		2	<i>Polytelis alexandrae</i>
		1	<i>Polytelis anthopeplus</i>
		3	<i>Platycercus</i> sp.
		2	<i>Psittacula krameri</i>
		2	<i>Nymphicus hollandicus</i>
		1	<i>Psittacula alexandri</i>
		1	<i>Psittacula cyanocephala</i>
		1	<i>Lathamus discolor</i>
		1	<i>Barnardius zonarius</i>
		1	<i>Psittacus erithacus</i>
		1	<i>Poicephalus senegalus</i>
	RS3	1	<i>Agapornis</i> sp.
Santa Catarina	SC1	6	<i>Forpus</i> sp.
	SC2	7	<i>Platycercus</i> sp.
	SC3	1	<i>Agapornis</i> sp.
	SC4	8	<i>Forpus</i> sp.
		17	<i>Psittacula krameri</i>
São Paulo	SP1	28	<i>Neophema</i> sp.
	SP2	1	<i>Bolborhynchus lineola</i>
	SP3	3	<i>Nymphicus hollandicus</i>
		1	<i>Agapornis</i> sp.
	SP4	17	<i>Bolborhynchus lineola</i>
		8	<i>Forpus</i> sp.
		1	<i>Neophema</i> sp.
		1	<i>Platycercus</i> sp.

To be continued

Continuation

Brazilian state	Aviary	No. samples	Psittacine species
São Paulo	SP5	6	<i>Bolborhynchus lineola</i>
		3	<i>Neophema</i> sp.
	SP6	3	<i>Neophema</i> sp.
		3	<i>Psilopsiagon aymara</i>
	SP7	8	<i>Platycercus</i> sp.
	SP8	3	<i>Bolborhynchus lineola</i>
		7	<i>Agapornis</i> sp.
	SP9	1	<i>Nymphicus hollandicus</i>
	SP10	1	<i>Psephotus haematonotus</i>
		1	<i>Neophema</i> sp.
	SP11	5	<i>Psittacula krameri</i>
		4	<i>Trichoglossus</i> sp.
		1	<i>Psittacula alexandri</i>
		2	<i>Psittacula cyanocephala</i>
		11	<i>Psephotus haematonotus</i>
	SP12	50	<i>Forpus</i> sp.
	SP13	7	<i>Neophema</i> sp.
		1	<i>Platycercus</i> sp.
		5	<i>Psittacula krameri</i>
		1	<i>Psittacula alexandri</i>
		1	<i>Barnardius zonarius</i>
	SP14	1	<i>Bolborhynchus lineola</i>
		3	<i>Forpus</i> sp.
		3	<i>Neophema</i> sp.
	SP15	6	<i>Platycercus</i> sp.
		5	<i>Psittacula krameri</i>
	SP16	50	<i>Nymphicus hollandicus</i>
		2	<i>Neophema</i> sp.
		2	<i>Platycercus</i> sp.
	SP17	2	<i>Psephotus haematonotus</i>
		3	<i>Neophema</i> sp.
		5	<i>Cyanoramphus</i> sp.
	SP18	5	<i>Platycercus</i> sp.
		6	<i>Psittacula krameri</i>
		1	<i>Polytelis swainsonii</i>
		1	<i>Polytelis alexandrae</i>
		3	<i>Polytelis anthopeplus</i>
		1	<i>Cacatua</i> sp.
		1	<i>Lathamus discolor</i>
		2	<i>Ecletus</i> sp.
		1	<i>Psittacus erithacus</i>
		3	<i>Poicephalus senegalus</i>

To be continued

Continuation

Brazilian state	Aviary	No. samples	Psittacine species
São Paulo	SP19	1	<i>Agapornis</i> sp.
	SP20	3	<i>Neophema</i> sp.
	SP21	5	<i>Nymphicus hollandicus</i>
	SP22	32	<i>Neophema</i> sp.
	SP23	1	<i>Neophema</i> sp.
		3	<i>Psittacula krameri</i>
	SP24	1	<i>Agapornis</i> sp.
	SP25	6	<i>Bolborhynchus lineola</i>
		3	<i>Forpus</i> sp.

Table A. 2. Positive fecal samples according to psittacine species, breeders and detection methods used.

Parrot Species	Aviary	N° of oocysts (Malachite Green)/ Slide	nPCR <i>Cryptosporidium</i> spp.	Sequencing of nPCR	Duplex Real-Time PCR	Sequencing of Molecular Cloning
<i>Agapornis</i> sp.	RS3	0	-	-	Avian genotype III	-
	SP8	0	+	NS*	-	-
	SP8	0	+	NS	-	-
	RJ1	0	-	-	Avian genotype III	Avian genotype III
<i>Bolborhynchus lineola</i>	SP8	0	+	Avian genotype III	Avian genotype III	-
	SP8	2	+	Avian genotype III	Avian genotype III	-
	SP25	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i> / Avian genotype III	<i>Cryptosporidium galli</i>
	SP4	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i>	-
	SP4	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i> / Avian genotype III	<i>Cryptosporidium galli</i>
	SP4	2	-	-	-	-
	SP4	1	-	-	-	-
	SP17	0	+	NS	<i>Cryptosporidium galli</i>	-
	SP17	0	+	<i>Cryptosporidium</i> sp.	-	-
	SP12	7	+	Avian genotype III	Avian genotype III	-
<i>Forpus</i> sp.	SP12	0	-	-	Avian genotype III	Avian genotype III
	SP12	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i> / Avian genotype III	<i>Cryptosporidium galli</i> / Avian genotype III
	SP12	0	-	-	Avian genotype III	-
	SP12	0	+	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-
	SP12	1	-	-	Avian genotype III	-
	SP12	10	-	-	Avian genotype III	-

To be continued

Continuation

Parrot Species	Aviary	N° of oocysts (Malachite Green)/ Slide	nPCR <i>Cryptosporidium</i> spp.	Sequencing of nPCR	Duplex Real-Time PCR	Sequencing of Molecular Cloning
<i>Forpus</i> sp.	SP12	0	-	-	Avian genotype III	Avian genotype III
	SP12	0	+	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-
	SP12	0	+	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-
	SP12	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i> / Avian genotype III	Avian genotype III
	SP12	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i>	-
	SP12	1	-	-	Avian genotype III	-
	SP12	1	-	-	Avian genotype III	-
	SP12	0	-	-	Avian genotype III	-
	SP25	5	+	Avian genotype III	Avian genotype III	-
	SC1	2	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i> / Avian genotype III	-
	SP4	0	-	-	Avian genotype III	-
	SP4	0	-	-	Avian genotype III	-
	SP22	0	-	-	Avian genotype III	-
	SP22	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i> / Avian genotype III	-
<i>Neophema</i> sp.	SP1	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i>	-
	SP1	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i>	-
	SP4	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i>	<i>Cryptosporidium galli</i>
	SP4	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i>	<i>Cryptosporidium galli</i>
<i>Nymphicus hollandicus</i>	SP21	5	-	-	Avian genotype III	-
	SP21	7	+	Avian genotype III	Avian genotype III	-

To be continued

Continuation

Parrot Species	Aviary	N° of oocysts (Malachite Green)/ Slide	nPCR <i>Cryptosporidium</i> spp.	Sequencing of nPCR	Duplex Real-Time PCR	Sequencing of Molecular Cloning
<i>Nymphicus hollandicus</i>	SP21	0	-	-	Avian genotype III	-
	SP3	0	+	Avian genotype III	Avian genotype III	-
	MG1	15	+	Avian genotype III	Avian genotype III	-
	MG1	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i>	<i>Cryptosporidium galli</i>
	SP15	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i> / Avian genotype III	Avian genotype III
	SP15	0	+	NS	-	-
	SP15	0	+	NS	-	-
	SP15	0	-	-	Avian genotype III	-
	SP15	1	-	-	Avian genotype III	-
	SP15	0	+	Avian genotype III	Avian genotype III	-
	SP15	0	+	NS	-	-
	SP15	0	-	-	Avian genotype III	-
	RS2	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i>	-
	SP17	0	+	NS	-	-
	SP7	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i>	-
<i>Psephotus haematondus</i>	SP11	0	-	-	Avian genotype III	-
<i>Psittacula krameri</i>	SP11	0	+	NS	-	-
	SP17	0	+	NS	-	-
	SP17	0	+	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-

To be continued

Continuation

Parrot Species	Aviary	N° of oocysts (Malachite Green)/ Slide	nPCR <i>Cryptosporidium</i> spp.	Sequencing of nPCR	Duplex Real-Time PCR	Sequencing of Molecular Cloning
<i>Psittacula krameri</i>	SC4	0	-	-	<i>Cryptosporidium galli</i> / Avian genotype III	Avian genotype III
	SC4	0	+	<i>Cryptosporidium canis</i>	-	-

*Not sequenced