

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

“IMPORTÂNCIA DO PATO DOMÉSTICO DA FAMÍLIA ANATIDAE (*Cairina moschata*) DE CRIAÇÕES RÚSTICAS PARASITADOS COM *Cryptosporidium*”

LIDIANE TAVARES DUARTE BERRIEL

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

“IMPORTÂNCIA DE PATOS DOMÉSTICO DA FAMÍLIA ANATIDAE (*Cairina moschata*) DE CRIAÇÕES RÚSTICAS PARASITADOS COM *Cryptosporidium*”

LIDIANE TAVARES DUARTE BERRIEL

Sob a Orientação da Professora
Teresa Cristina Bergamo do Bomfim

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Março de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B533 i Berriel, Lidianne Tavares Duarte, 1984-
Importância de patos doméstico da família Anatidae
(Cairina moschata) de criações rústicas parasitados
com Cryptosporidium / Lidianne Tavares Duarte Berriel.
- 2017.
77 f.

Orientador: Teresa Cristina Bergamo do Bomfim.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, PPGCV, 2017.

1. Pato doméstico. 2. Anseriformes. 3. Criações
rústicas. 4. Diagnóstico molecular. 5. Cryptosporidium
baileyi. I. Bomfim, Teresa Cristina Bergamo do, 1964
, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. PPGCV III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LIDIANE TAVARES DUARTE BERRIEL

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.


Dissertação aprovada em 30/03/2017.



Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim (IV/DPA - UFRRJ) (Orientadora)



Dra. Adriana Pittella Sudré (MIP/CMB - UFF)



Dra. Beatriz Brener de Figueiredo (MIP/CMB - UFF)

Dedico esta conquista as pessoas que nestes anos da minha vida, me fizeram entender o sentido do mais puro e verdadeiro amor:

Aos meus pais, Marisa e Sergio dedico todos os meus dias de luta como forma de gratidão, respeito e amor.

Aos meus filhos Ágatha e Enzo, minhas maiores razões para ser feliz. Nenhuma conquista me leva ao ápice da felicidade, como vocês conseguem fazer com tamanha simplicidade. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus amigos espirituais por terem me dado saúde, perseverança e serenidade no decorrer desses dois anos.

A Professora Teresa Cristina Bergamo do Bomfim, por acreditar em minha capacidade e transmitir seus conhecimentos intelectuais com tamanha simplicidade e generosidade. Obrigada pela paciência, atenção e amizade.

Ao meu companheiro, amigo e parceiro de todos os momentos Marcelo Santiago Berriel, que me impulsiona a lutar pelos meus sonhos, que acredita no meu potencial e me ajuda nos momentos difíceis. Se este trabalho chegou até o fim, você tem uma participação fundamental. Para ele minha gratidão e meu eterno amor.

Aos meus avós Rita, Virgulino (*in memorian*) e Maria (*in memorian*) que fizeram da minha infância, algo muito sublime e sempre vibraram pela minha vitória.

A Amiga e professora Melissa Chambarelli, por me encorajar a fazer o mestrado, por fornecer muitas caronas com boas conversas. Nesses dois anos, meu carinho e nosso elo de amizade se fortaleceram.

Agradeço também aos grandes amigos do mestrado Amanda e Silvo, pelos dois anos de convivência e trocas de histórias de vida.

A Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, por proporcionar a oportunidade de aprimorar o meu desenvolvimento intelectual.

Ao curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias pelo incentivo e auxílio financeiro para conclusão desse trabalho e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela ajuda financeira através de bolsa de estudo.

Aos técnicos de laboratórios Ivan e Maurício, que sempre foram solícitos nestes dois anos.

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”

Chico Xavier.

RESUMO

BERRIEL, Lidiane Tavares Duarte. “Importância de patos doméstico da família Anatidae (*Cairina moschata*) de criações rústicas parasitados com *Cryptosporidium*”. 2017. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal. Rio de Janeiro, Brasil, 2017.

São poucos os criatórios industriais de pato doméstico no Brasil, pois para a população nacional, carne e ovos desta ave ainda são considerados restritos. As criações de subsistência são comuns no país e o comércio de aves vivas, abatidas, ovos e carne ocorrem principalmente entre os pequenos produtores, casas comerciais e feiras livres. Não existe registros ou conhecimento das condições higiênico sanitárias onde essas aves são criadas. A classe das aves está suscetível a se infectarem por três espécies de *Cryptosporidium* (*Cryptosporidium meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli*), além destas 13 genótipos. O trabalho teve como objetivos: diagnosticar microscopicamente a presença de *Cryptosporidium* spp. no pato doméstico da família Anatidae (*Cairina moschata*), provenientes de duas criações rústicas localizadas no Rio de Janeiro; realizar a caracterização genotípica seguida do sequenciamento e análises filogenéticas, comparando com as sequencias obtidas com aquelas sequências depositadas no GenBank. Como metodologia, amostras fecais de patos domésticos (*Cairina moschata*) foram colhidas em duas criações rústicas (Área A e B), totalizando 118 amostras, sendo 60 amostras da área A e 58 da área B. Os animais da coleta eram aves jovens que não ultrapassaram 30 dias de vida. Inicialmente foi realizada a pesquisa de oocistos *Cryptosporidium* spp., através da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar. No diagnóstico microscópico, de um total de 118 amostras analisadas 20 apresentaram positividade para *Cryptosporidium* (118/16,95%), sendo estas pertencentes a área A (60/33,33%). Para a realização da extração de DNA, foram selecionadas aquelas que apresentavam mais de 20 oocistos de *Cryptosporidium* spp. por campo microscópico, seguida de metodologias para o diagnóstico molecular tendo como alvo o 18S, que posteriormente foram sequenciadas e análises filogenéticas foram feitas. Neste estudo, foi diagnosticada a espécie *Cryptosporidium baileyi*, apresentando-se mais estreitamente relacionado às espécies gástricas, sendo uma espécie de importância em saúde animal.

Palavras-chave: Anseriformes, criações rústicas, diagnóstico molecular, *Cryptosporidium baileyi*.

ABSTRACT

BERRIEL, Lidiane Tavares Duarte. “Importance of domestic ducks of the family Anatidae (*Cairina moschata*) of rustic creations parasitized with *Cryptosporidium*”. 2017. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal. Rio de Janeiro, Brasil, 2017.

There are few industrial duck farms in Brazil, because for the national population, the meat and eggs of this bird are still considered restricted. Subsistence creations are common in the country, and trade in live, slaughtered poultry, eggs and meat mainly occurs among small producers, commercial houses and free markets. There are no records or knowledge of the hygienic sanitary conditions where these birds are created. The class of birds is susceptible to infection by three species of *Cryptosporidium* (*Cryptosporidium meleagridis*, *C. baileyi* and *C. galli*), in addition to these 13 genotypes. The objective of this study was to diagnose the presence of *Cryptosporidium* spp. in the domestic duck of the family Anatidae (*Cairina moschata*), from two rustic creations located in Rio de Janeiro; Carry out the genotypic characterization followed by sequencing and phylogenetic analyzes, comparing with the sequences obtained with those sequences deposited in GenBank. As a methodology, fecal samples of domestic ducks (*Cairina moschata*) were collected in two rustic creations (Area A and B), totaling 118 samples, 60 samples from area A and 58 from area B. The animals of the collection were young birds that did not exceed 30 days of life. Initially the research of oocysts *Cryptosporidium* spp. was carried out, through the technique of centrifugation and flotation in saturated solution of sugar. In the microscopic diagnosis, 20 samples from area A showed positivity (118 / 16.95%). Of these, we selected those that had more than 20 oocysts of *Cryptosporidium* spp. By microscopic field for the extraction of DNA, followed by molecular diagnostic methodologies targeting 18S, which were later, sequenced and phylogenetic analyzes were performed. In this study, the species *Cryptosporidium baileyi*, was diagnosed, being more closely related to the gastric species, being a species of importance in animal health.

Key words: Anseriformes, criações rústicas, diagnóstico molecular, *Cryptosporidium baileyi*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da formação do vacúolo parasitóforo juntamente com a zona alimentadora de *Cryptosporidium* spp. na interação da célula do hospedeiro (Fonte: CLODE 2015). 6
- Figura 2.** Diagrama representando do ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum* (Fonte: CURRENT, GARCIA, 1991). 7
- Figura 3.** Imagens da localização de coleta das amostras fecais provenientes de patos (*Cairina moschata*): 1- Mapa do Brasil com a localização do estado do Rio de Janeiro, assinalando a região metropolitana do Rio de Janeiro; 2- Região Metropolitana do Rio de Janeiro com os seus municípios (<http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-regiao-metropolitana-do-rio-de-janeiro/>); 3 - Município do Rio de Janeiro subdividido em municípios (<http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-regiao-metropolitana-do-rio-de-janeiro/>), assinalando as áreas de coletas (Áreas A, B), com os respectivos números totais de amostras. 32
- Figura 4.** Imagens gerais das criações rústicas de patos onde foram analisadas amostras fecais de animais jovens. A e B, imagens da Área A, localizada no município de Seropédica; C e D imagens da Área B, localizada no município de Paracambi. 34
- Figura 5.** (A) Oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados na microscopia óptica após a utilização da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar, provenientes de amostras fecais de pato doméstico (*Cairina moschata*) de uma criação rústica, localizado no município de Seropédica, Rio de Janeiro. (B) comparação entre um oocisto de coccídeo (▼) e um oocisto de *Cryptosporidium* spp. (↓) (— = 10 µm). 42

Figura 6. Amplificação pela Nested-PCR do gene alvo 18S. Eletroforese em gel de agarose a 2 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* spp. provenientes de pato doméstico (*Cairina moschata*). M = marcador de peso molecular, C+ = controle positivo bovino (*C. parvum*) e C - = controle negativo (amostra de pato negativa no exame microscópico), 1 a 10 amostras de patos positivas. 42

Figura 7. Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes das 10 amostras de pato doméstico (*Cairina moschata*), evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.), tamanho da sequência utilizada para comparação: 721pb. 46

Figura 7. Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes das 10 amostras de pato doméstico (*Cairina moschata*), evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.), tamanho da sequência utilizada para comparação: 721pb (continuação). 47

Figura 8. Relação genética entre os isolados de *Cryptosporidium* spp. baseada no sequenciamento total do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 710pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura-2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequências obtidas do Genbank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pato doméstico (*Cairina moschata*), da área A. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tamanho das sequências obtidas de *Cryptosporidium* após análise da qualidade dos cromatogramas das amostras de pato doméstico (*Cairina moschata*), referente à área A de acordo com aquelas amostras que amplificaram DNA. 43

Tabela 2 Sequências obtidas do GenBank de *Cryptosporidium baileyi* utilizadas como comparação com as sequências obtidas neste estudo, com as suas respectivas similaridades. 44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Sequências utilizadas para o gene alvo 18S, registradas no 'Genbank', e que foram comparadas com as obtidos no estudo para a construção da árvore filogenética. 39

Quadro 1 Sequências utilizadas para o gene alvo 18S, registradas no 'Genbank', e que foram comparadas com as obtidos no estudo para a construção da árvore filogenética (Continuação). 40

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Criação de patos	3
2.2 Breve Históricos sobre <i>Cryptosporidium</i>	4
2.3 Taxonomia e Ciclo biológico do <i>Cryptosporidium</i>	5
2.4 Diagnóstico	9
2.4.1 Diagnóstico através da microscopia	9
2.4.2 Diagnóstico por Métodos Imunológicos	9
2.4.3 Diagnóstico Através das Ferramentas Moleculares	10
2.5 Espécies <i>Cryptosporidium</i> parasitando aves	12
2.5.1 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	12
2.5.2 <i>Cryptosporidium baileyi</i>	13
2.5.3 <i>Cryptosporidium galli</i>	14
2.6 Genótipos de <i>Cryptosporidium</i> parasitando aves	15
2.7 Criptosporidiose em aves	18
2.7.1 Criptosporidiose por <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	18
2.7.2 Criptosporidiose por <i>Cryptosporidium baileyi</i>	19
2.7.3 Criptosporidiose por <i>Cryptosporidium galli</i>	21
2.7.4 Criptosporidiose em aves por <i>Cryptosporidium parvum</i>	21
2.7.5 Criptosporidiose ocasionada pelos genótipos aviário	22
2.8 <i>Cryptosporidium</i> em aves de produção.	23
2.9 Epidemiologia de <i>Cryptosporidium</i> spp.	25
2.10 Controle e Prevenção.	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Laboratórios da Realização da Pesquisa	31
3.2. Local e Procedimentos de Coleta das Amostras Fecais	31
3.3 Descrições das Criações	33
3.4 Processamento das Amostras Fecais e Diagnóstico Microscópico	33
3.5 Extração de DNA.	35
3.6 Reações de PCR e Nested-PCR para o gene alvo 18S	35

3.7 Purificação, Quantificação de DNA e Sequenciamento	37
3.8 Alinhamentos das sequências e análises filogenéticas	38
4. RESULTADOS	41
4.1 Diagnóstico microscópico de <i>Cryptosporidium</i> spp.	41
4.2 Diagnóstico Molecular	41
4.3 Análise das Sequências e Filogenia	43
5. DISCUSSÃO	49
5.1 Diagnóstico Molecular	53
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

Aves da ordem Anseriformes são compostas por aproximadamente 161 espécies aquáticas distribuídas por 48 gêneros e três famílias: Anatidae, Anhimidae e Anseranatidae, sendo que, algumas classificações incluem também a família Dendrocygnidae. Os anatídeos incluem animais como o pato, ganso, cisne e têm distribuição cosmopolita, enquanto que os animídeos estão restritos à América do Sul (FIGUEROLA, GREEN, 2006). Esta ordem é constituída por aves consideradas resistentes às doenças, de maior rusticidade que galinhas (*Gallus gallus*) e por isso requerem menor cuidado durante as criações (MEULLEN, DIKKEN, 2003), e raramente são submetidas a tratamentos devido a alguma doença.

Os representantes desta ordem, habitam zonas aquáticas continentais como lagos, pântanos, rios e estuários, no entanto algumas espécies mudam-se para habitats marinhos durante a época de reprodução. A plumagem destas aves é muito variada, sendo algumas espécies monocromáticas enquanto que outras bastante coloridas. As crias dos anseriformes são bastante precoces e ao eclodirem dos ovos estão prontas para nadar. Estas aves têm membranas interdigitais, numa adaptação ao meio aquático. São aves omnívoras que se alimentam de folhas, frutos e raízes de plantas terrestres e aquáticas, cereais, pequenos répteis, anfíbios e crustáceos, larvas de insetos e anélídeos. Muitas das espécies de anseriformes são migratórias. Nesta ordem, inclui algumas espécies domesticadas para exploração de carne, penas ou ovos. Muitas espécies são consideradas como especiarias gastronômicas ou cinegéticas (VIEIRA, 2012).

São poucos os criatórios industriais de patos no Brasil, pois para a população nacional, carne e ovos destas espécies ainda são considerados iguaria restrita a determinadas classes sociais ou costumes regionais. Porém, as criações de subsistência são comuns no país e o comércio de aves vivas, ovos e carne ocorrem principalmente entre os pequenos produtores, casas comerciais e feiras livres. Ressalta-se que não existem registros ou conhecimento das condições higiênico sanitárias onde essas aves são criadas.

Muitas doenças abordadas na Medicina Veterinária foram evidenciadas a sensibilidade dessa ordem a diferentes patógenos. Estes, resultando em doenças clínicas ou subclínicas são importantes, principalmente, considerando os aspectos epidemiológicos, pois algumas destas enfermidades apresentam alto risco de transmissão para galinhas, tornando-se uma das maiores preocupações atuais na saúde avícola.

Pesquisas a respeito de doenças de anseriformes ainda são restritas a alguns países, como a China, que é um dos maiores produtores mundiais destas aves. No Brasil, são necessários maiores estudos, pois produtos oriundos de criações de subsistência são livremente comercializados sem qualquer fiscalização, tornando-se também um risco à saúde pública.

Embora haja muitas doenças por parasitos protistas, muitas das doenças que estes animais possam albergar estão geralmente focadas nas causadas por vírus e bactérias que é o foco da grande maioria das pesquisas. Dentre as doenças ocasionadas por protistas parasitas, destacam-se as ocasionadas pelo agente etiológico do gênero *Cryptosporidium* spp. e dentro deste, três espécies são reconhecidas como válidas infectantes para aves (*Cryptosporidium meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli*), cada uma destas infecta uma variedade de espécies da classe das Aves; apresentando predileção por sítios de parasitismo, assim como, também variações na sua sintomatologia clínica. A grande maioria das doenças afetam aves aquáticas jovens, destacando a importância de cuidados intensivos durante as primeiras semanas de vida.

Em adição, têm sido relatados 13 genótipos com “status” de espécies desconhecidas, sendo estes os genótipos: Avian I-VI; o genótipo pato preto; o genótipo da galinhola

(woodcock) Euro-asiática e genótipos de gansos I-V. Com relação aos genótipos pouco se conhece sobre os possíveis danos que poderiam ocasionar em seus hospedeiros.

Diante do exposto acima, o presente trabalho tem como objetivo: diagnosticar microscopicamente a presença de *Cryptosporidium* spp. no pato doméstico da família Anatidae (*Cairina moschata*), provenientes de duas criações rústicas localizadas no Rio de Janeiro; Caracterizar genotipicamente espécies e/ou genótipos do gênero de *Cryptosporidium* e realizar o sequenciamento e análises filogenéticas, comparando com as sequencias obtidas com aquelas sequencias depositadas no GenBank.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criações de patos

O "pato-mudo" é uma ave originária da América Central e do Sul, onde foi domesticada pelas culturas indígenas. A espécie selvagem é denominada de *Cairina moschata sylvestris* e a doméstica de *Cairina moschata momelanotus*. É um pato que se distingue da maioria das aves aquáticas domésticas em vários aspectos, tendo algumas marcantes, tais como, possuem carúnculas ("verrugas vermelhas") na cabeça e em redor dos olhos (o macho mais do que a fêmea); não emitirem sons altos, são melhores voadores do que nadadores e, à noite, tendem a voar para as árvores (caso existam por perto) e empoleiram-se nelas. O seu bico é fino e comprido. Conseguem levantar/aumentar as penas no topo da cabeça, formando uma "crista" quando se sentem ameaçados. Estes patos são robustos e resistentes, pois apesar de serem aves tropicais, adaptaram-se facilmente também às condições frias (VIEIRA, 2012).

As criações de patos domésticos são atividades simples, de fácil manejo, não exigindo espaço amplo para a criação, além de não ser preciso investir financeiramente em equipamentos muito sofisticados. A criação destes animais é principalmente para a produção de ovos e carne. O tempo de retorno financeiro é rápido, essa ave têm uma capacidade de adaptação muito grande à vários ambientes. Apesar de elas serem fáceis de criar em comparação com outras aves, é preciso seguir alguns requerimentos básicos para garantir um plantel saudável. No Brasil o consumo de pato ainda é restrito a 13 gramas por habitante por ano. Na China, o consumo é de 1,5 kg por ano e na Europa chega a 1 kg por habitante por ano. A carne de pato também é bastante consumida nos Estados Unidos, Egito e Arábia Saudita (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2011).

O mercado de patos por si só já é bem especializado já que atende a um nicho de apreciadores de sua carne. Portanto, a qualidade do produto tanto sanitariamente como visualmente são fatores muito importantes. De maneira geral, os cuidados necessários para a criação são menores que os do frango, sendo a ave bem mais rústica a ambiente e sanidade, que não requer investimentos maiores para se ter alta performance como é necessário para o frango onde o produtor pode atender seu tempo a outras produções sem prejudicar o lote.

Alguns avicultores, no sul do Brasil e no estado de Minas Gerais, estão trocando a produção de frangos pelo pato, por ser um animal mais resistente às variações de temperatura. O pato, comparado com o frango, tem uma resistência melhor ao calor. Então, as temperaturas mais altas não vão trazer problemas como trariam para o frango (VIEIRA, 2012).

A falta de tradição na culinária justifica a ausência de grandes criatórios de patos no Brasil e também não existem grandes produtores no território, sendo que a pouca produção se destina a pequenos produtores e muito destes de fundo de quintal (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2011).

Nas criações rústicas, geralmente, existe o hábito da criação de diversos animais em uma mesma área, muitas das vezes sem uma estrutura adequada de manejos e cuidados sanitários. Partindo deste princípio, animais que possuem o mesmo convívio com outros animais em uma determinada área, serão reservatórios e disseminadores de diversos patógenos, expondo o risco de infecção de algum patógeno tanto para animais da mesma espécie ou não assim como também para os seres humanos (GOMES et al., 2009). Portanto, se faz necessário maiores investigações sobre a saúde desses animais, principalmente relacionados às parasitoses e a suas possíveis implicações com o meio ambiente.

2.2 Breve históricos sobre *Cryptosporidium*

A primeira descrição de *Cryptosporidium* infectando as células epiteliais do estômago de camundongos foi feita em 1907 por TYZZER, que nomeou o gênero de *Cryptosporidium* e que mais tarde, observando a localização gástrica do parasito nominou a espécie *Cryptosporidium muris* (TYZZER, 1912).

A família Cryptosporidiidae foi estabelecida somente em 1911 por LÉGER e em 1912, TYZZER, descreveu outra espécie do mesmo gênero, tendo esta, como local de parasitismo, as células epiteliais intestinais de camundongos, denominando-a de *Cryptosporidium parvum*.

A primeira descrição deste microrganismo em aves foi realizada em 1929, por TYZZER, que descreveu *Cryptosporidium* spp. em cecos de frangos nomeando a espécie de *Cryptosporidium parvum*, o que mais tarde foi considerado como sinonímia de *Cryptosporidium baileyi* (CURRENT et al., 1986). Em 1955, SLAVIN relatou um microrganismo, estruturalmente similar em perus, nomeando de *Cryptosporidium meleagridis* e atribuindo ao agente mortalidade em animais jovens de uma criação comercial.

Em 1971, foi descrito o primeiro caso de diarreia em bezerros tendo como agente etiológico *Cryptosporidium* (PANCIERA et al., 1971).

Em 1976, dois relatos simultâneos de criptosporidiose em pacientes humanos imunocompetentes e com imunodepressão, chamaram a atenção na medicina humana, pelo fato deste microrganismo ainda não ter sido diagnosticado nesse hospedeiro (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976).

Em 1993, o interesse no estudo da criptosporidiose humana aumentou depois de um surto, devido à contaminação de reservatórios de água, em Milwaukee, Wisconsin, que atingiu um número estimado de 403 mil pessoas (MACKENZIE et al., 1994).

A significância do gênero foi inicialmente reconhecida, pelo fato de ser um patógeno oportunista em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (NANNINI; OKHUYSEN, 2002) e atualmente, a criptosporidiose é uma doença bem estudada e relatada em várias espécies de hospedeiros.

Com o aperfeiçoamento dos métodos moleculares para detecção e identificação de espécies, genótipos e subtipos envolvidos com a infecção em determinados hospedeiros; houve um avanço nos estudos taxonômicos e epidemiológicos, assim como a subgenotipagem genômica, proteômica e investigações bioquímicas, todas direcionadas para elucidar novas descobertas e caracterização de novas espécies de *Cryptosporidium* (FAYER; XIAO, 2008).

2.3 Taxonomia e Ciclo biológico do *Cryptosporidium*

Seguindo a classificação de Levine (1980) *Cryptosporidium* apresenta a seguinte posição sistemática: Filo Apicomplexa Levine, 1970; Classe Sporozoea Leuckart, 1879; Subclasse Coccidia Leuckart, 1879; Ordem Eucoccidiida Léger & Duboscq, 1910; Sub-ordem Eimeriina Léger, 1911; Família Cryptosporidiidae Léger, 1911; Gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907. *Cryptosporidium* spp. possuem um ciclo monoxeno, tendo seis estágios de desenvolvimento, todos estes infectando a célula do hospedeiro e localizando-se em vacúolo parasitóforo.

A localização do microrganismo é intracelular extracitoplasmática encontrando-se nas microvilosidades de células epiteliais (SMITH, 1993). As formas endógenas permanecem na superfície das células epiteliais, formando uma organela multimembranosa, na união do parasito com a célula epitelial, a qual se acredita ter importância na absorção de nutrientes da célula parasitada (SPANNO; CRISANTI, 2000), conhecida como vacúolo parasitóforo. Neste momento os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos. Esta peculiaridade de infecção

confere grande proteção aos agentes antimicrobianos, ao mesmo tempo em que é suprido de energia e nutrientes da célula hospedeira (TZIPORI e WARD, 2002).

Segundo Clode, 2015, baseado em estudos experimentais, o vacúolo parasitóforo possui dois estágios: fase extracelular, na qual ocorre a extensão das microvilosidades da membrana da célula hospedeira. Separando o parasito tanto do citoplasma como da célula hospedeira. Já na fase epicelular, o vacúolo pode ser formado por incorporação de componentes do hospedeiro (Figura. 1).

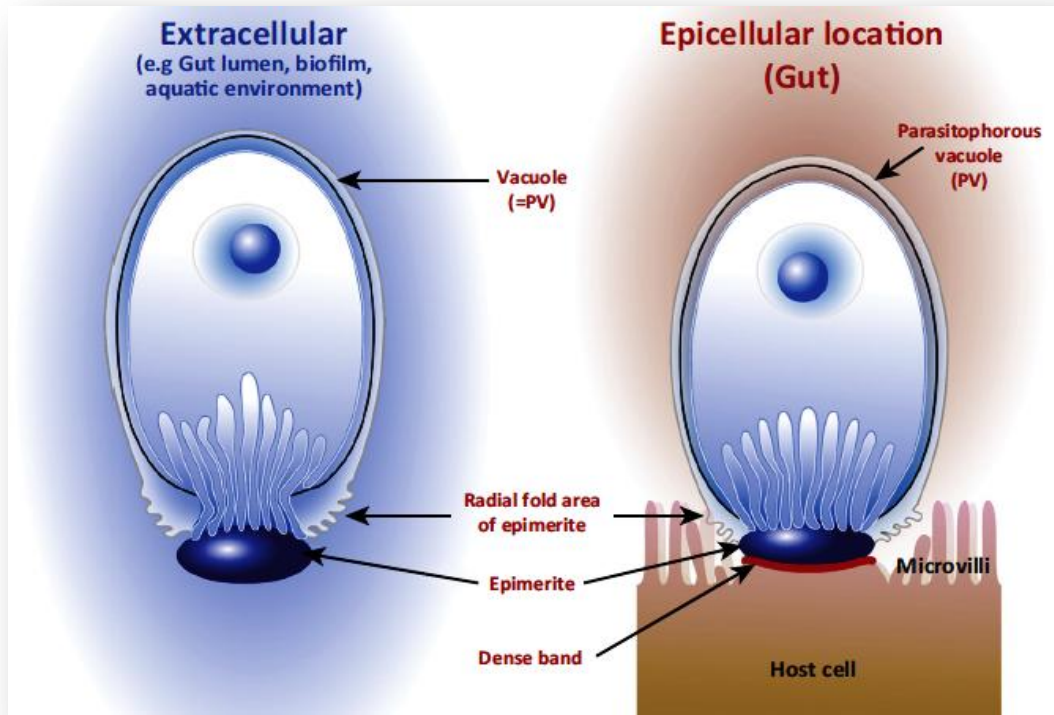


Figura 1. Representação esquemática da formação do vacúolo parasitóforo juntamente com a zona alimentadora de *Cryptosporidium* spp., na interação da célula do hospedeiro (Fonte: CLODE 2015).

Após o desencistamento os esporozoítos são liberados do oocisto e parasitam as células epiteliais do trato gastrointestinal ou respiratório. Nessas células, o parasito sofre multiplicação assexuada (esquizogonia ou merogonia) e depois a multiplicação sexuada (gametogonia), produzindo microgametas e macrogametas. Em seguida há a fecundação do macrogameta pelo microgameta, o oocisto se desenvolve e esporula no próprio local de infecção. Dois tipos diferentes de oocistos são produzidos, depois da esporogonia: um de parede espessa, que é comumente excretado pelo hospedeiro e um de parede fina, que é envolvido na autoinfecção interna (FAYER, 2007). Na figura 2, encontra-se um esquematizado o ciclo biológico de *Cryptosporidium*.

Os avanços aplicados às técnicas moleculares levaram a uma melhor compreensão da taxonomia e da filogenia de *Cryptosporidium* (RYAN et al., 2014). Devido a similaridades morfológicas dos oocistos observados na microscopia tanto de espécies quanto de genótipos, não sustentando uma classificação correta de espécie. Estes avanços foram cruciais para uma identificação confiável, na descrição da interação parasito / hospedeiro e de uma análise mais

precisa na avaliação de risco de um determinado isolado / espécie e / ou genótipo e / ou subtipos como zoonose (ZAHEDI et al., 2016).

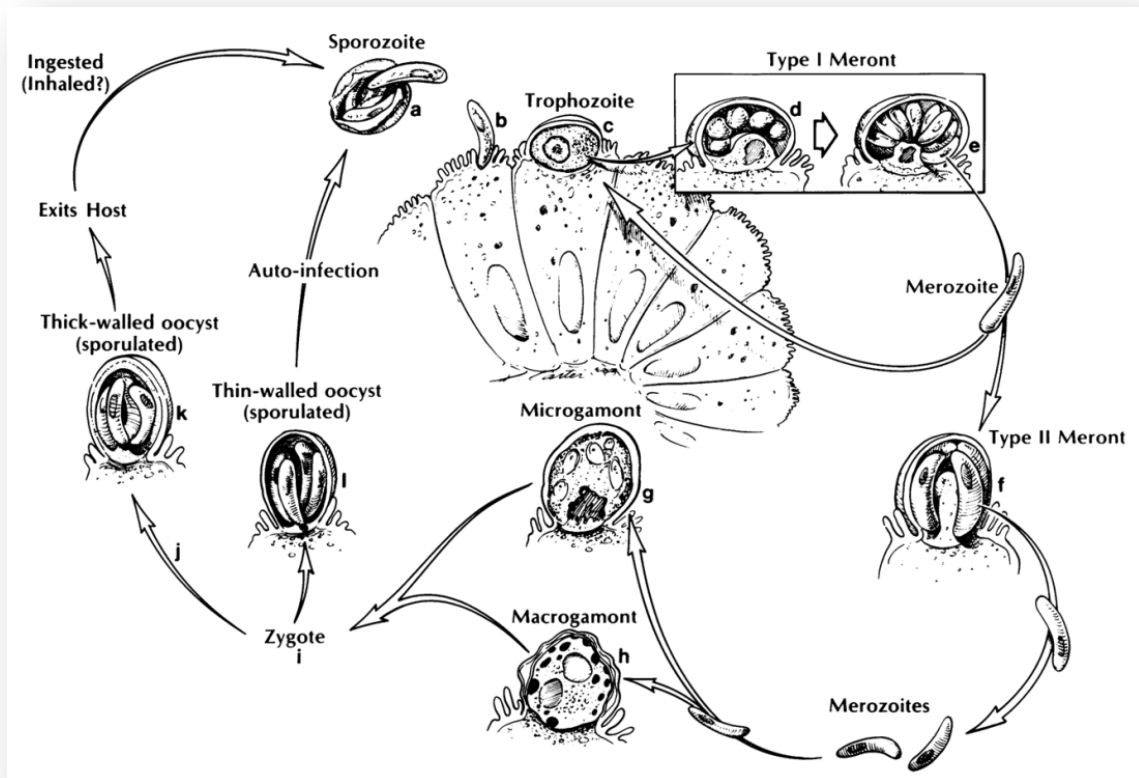


Figura 2. Diagrama representando do ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum* (Fonte: CURRENT, GARCIA, 1991).

Atualmente, 29 espécies de *Cryptosporidium* foram reconhecidas como válidas (ZAHEDI, 2016), incluindo o *C. rubeyi* que foi recentemente descrito em solo de habitações de esquilos (*Spermophilus* sp.) (LI et al., 2015).

A maioria das infecções por *Cryptosporidium* atribuíveis à humanos referem-se a *C. hominis* e *C. parvum*, estas foram responsáveis pela maioria dos surtos de veiculação hídrica, com uma exceção, de um surto hídrico ocorrido no Reino Unido causado por *C. cuniculus*, espécie diagnosticada em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (CHALMERS et al., 2009; XIAO, 2010; RYAN et al., 2014). Outras espécies, tais como: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzer*, *C. erinacei* e *C. horse* e os genótipos skunk (Cangambá) e esquilo I, tem sido registrados parasitando humanos imunocompetentes e imunocomprometidos (XIAO, 2010; WALDRON et al., 2011; ELWIN et al., 2012a; NG et al., 2012; KVAC et al., 2013; RASKOVA et al., 2013; LIU et al., 2014).

Pouco se sabe sobre a distribuição das espécies e subtipos de *Cryptosporidium* com potenciais zoonóticos e não zoonóticos em populações de animais silvestres (APPELBEE et al., 2005; ZIEGLER et al., 2007; RYAN et al., 2014). Evidências moleculares conclusivas, ligando a contaminação de abastecimento de água por animais selvagens em bacias com

surtos de criptosporidiose em populações humanas são escassas. Contudo, um recente surto no Reino Unido, por via aquática causada por *C. cuniculi* de coelhos silvestres destacou a importância da vida selvagem na dispersão de *Cryptosporidium* as fontes de água potável associado a risco para a saúde humana (CHALMERS et al., 2009; ELVIN et al., 2012).

Várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* foram identificados em fonte de água potável, águas pluviais, fluxo de sedimentos, águas residuais e água do mar em várias regiões geográficas, incluindo as espécies *C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. cuniculus*, *C. meleagridis* e *C. canis* e bem como "sequências ambientais" não identificadas como espécie, que provavelmente representam genótipos de animais silvestres que poderiam contaminar águas (ZHOU et al., 2004; JIANG et al., 2005; YANG et al., 2008; JELLISON et al., 2004; NICHOLS et al., 2010; KOOMPAPONG, SUKTHANA, 2012; Van DYKE et al., 2012; XIAO et al., 2012; GALVAN et al., 2014; LI et al., 2014.; MAHMOUDI et al., 2015). Estudos conduzidos por Jiang et al. (2005) e Feng et al. (2007), demonstraram que os animais silvestres são a principal fonte de contaminação de *Cryptosporidium* em água potável, incluindo a espécie *C. ubiquitum* e genótipo I originário de esquilo.

2.4 Diagnóstico

2.4.1 Diagnóstico através da microscopia

A microscopia é utilizada para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* e é a metodologia mais antiga aplicada em amostras ambientais de água, de alimentos, de fezes e de tecidos (O'DONOGHUE, 1995; QUINTERO-BETANCOURT et al., 2003), porém utilizada isoladamente não é capaz de identificar as espécies envolvidas, além de ser uma metodologia muito demorada, requerer um bom treinamento (FALL et al., 2003).

As técnicas utilizadas na visualização de oocistos na microscopia podem ser as de concentração e de coloração. Entre as técnicas de coloração podemos destacar a Dimetil Sulfóxido (DMSO) (POHJOLA et al., 1985), Kinyoun (MA; SOAVE, 1983), Safranina-azul de metileno (BAXBY et al., 1984) e Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), porém todas são de baixa especificidade e/ou sensibilidade, em especial para amostras contendo pequenas quantidades de oocistos (MORGAN; THOMPSON 1998).

Os métodos de concentração dos oocistos passaram a ser utilizados com grande sucesso na detecção da infecção, já que a concentração das fezes possui importância relevante para aumentar as chances de encontrar oocistos. Podem ser utilizadas técnicas comuns de flutuação em solução saturada de açúcar, sal ou sulfato de zinco (ARROWOOD, 1997), porém não são totalmente eficientes. Assim como as de coloração, são incapazes de identificar as espécies envolvidas com a infecção do hospedeiro.

Quando se utilizam técnicas de flutuação em solução de açúcar, os oocistos podem ser observados ligeiramente róseos; na microscopia de campo claro ou no contraste de fase, são claros e refringentes. Os oocistos deformam a partir de 15 minutos de observação, quando estão em solução saturada de açúcar, perdendo sua forma esférica, assim como, também, a sua coloração rósea (CURRENT; GARCIA, 1991).

2.4.2 Diagnóstico por Métodos Imunológicos

Os métodos imunológicos podem oferecer algumas vantagens em relação à microscopia, para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e diagnóstico da criptosporidiose. A microscopia de fluorescência, principalmente através da técnica de imunofluorescência direta (DFA) reconhece epítomos na superfície oocistos, tem demonstrado elevada especificidade (96-100%) e sensibilidade (98,5-100%) na detecção de oocistos de

Cryptosporidium em esfregaços fecais e amostras ambientais (GRACZYK al. de 1996; SMITH, et. al, 2003).

A detecção de antígenos de *Cryptosporidium* em amostras fecais ("coproantígenos") é outra abordagem diagnóstica. Imunoensaios como o teste ELISA e o teste Imunocromatografia (IC) (NEWMAN et al., 1993; GARCIA; SHIMIZU, 1997), demonstraram especificidade elevada (98-100%), porém mesmo assim a sensibilidade de detecção coproantígeno pode ser menor do que a maioria das abordagens microscópicas (GARCIA; SHIMIZU, 2000; JOHNSTON et al., 2003).

Kits de diagnóstico, também, podem ser utilizados, porém estes dependem de uma inspeção visual da intensidade de coloração, o que pode levar a uma interpretação subjetiva dos resultados dos testes. As vantagens de alguns testes de coproantígenos com ensaios de microscopia é que estes podem detectar o estágio da doença (pré-patência), podem ser utilizados com mais rapidez, são mais eficazes em relação aos custos e são capazes de rastrear um grande número de amostras fecais (GARCIA; SHIMIZU, 2000; JOHNSTON et al., 2003), em menor tempo. Contudo, vale ressaltar que os métodos imunológicos também não permitem que uma espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* seja identificado.

2.4.3 Diagnóstico Através das Ferramentas Moleculares

As ferramentas moleculares para a detecção de *Cryptosporidium* spp. se mostram bastante eficazes não apenas para o simples diagnóstico de amostras suspeitas, mas para caracterizar espécies, genótipos e subtipos, proporcionando avanços na compreensão da biologia, evolução e epidemiologia deste agente (OIE, 2008; XIAO, 2010; CHECKLEY et al., 2015). Portanto as técnicas de extração de DNA deste protozoário incluem sempre um passo de rompimento dos oocistos, seja por meios físicos, mecânicos, enzimáticos ou ainda a combinação destes (SCORZA et al., 2003; HUBER, 2007).

Em 1991, Mark Laxer foi o primeiro a aplicar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (LAXER et al., 1991). E desde então, a técnica vem sendo aperfeiçoada com a redução de gastos e otimização das reações. Um dos grandes problemas nas reações de PCR é a presença de inibidores que podem estar presentes, principalmente, quando se utilizam fezes (contendo sais biliares, bilirrubina e polissacarídeos complexos). Desta forma, diminuindo sua sensibilidade em até 1000 vezes para detecção do seu DNA (WARD, WANG, 2001). Para reduzir a ação destas substâncias, são previamente utilizadas técnicas de concentração e purificação dos oocistos, aumentando assim a sensibilidade das reações (TZIPORI; WIDMER, 2008).

Com o DNA extraído deve-se realizar a PCR, diversos genes alvos são utilizados para caracterizar genotipicamente as espécies pertencentes ao gênero *Cryptosporidium*, dentre eles o 18S (RNA ribossomal), COWP (proteína da parede do oocisto), HSP70 (proteína de choque térmico de 70kDa), o gene codificante da glicoproteína 60kDa (GP60), e o gene que codifica a Actina (XIAO; RYAN, 2007). A ampla utilização do gene 18S para a genotipagem do gênero *Cryptosporidium* se deve a sua natureza de cópias múltiplas, além da presença de regiões semi-conservadas e hipervariáveis que facilita o desenho de iniciadores específicos para o gênero (XIAO, 2010). A determinação de subgenótipos, envolvendo a pesquisa de variação dentro de uma determinada espécie ou genótipo requer o uso de *loci* mais variáveis como o gene hipervariável da glicoproteína 60-kDa (GP60) e o uso de microsatélites (FERGUSON et al., 2006).

Além dos procedimentos da PCR e Nested-PCR, para a identificação das espécies, genótipos e subtipos, torna-se necessária a realização de procedimentos complementares, tais como a digestão por enzimas ou o sequenciamento da amostra positiva (HUBER, 2007; OIE, 2008).

A técnica do Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição – RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorfism*) é um dos métodos mais empregados para a determinação de espécies e genótipos de *Cryptosporidium*. A técnica se baseia na digestão dos produtos da PCR por enzimas específicas, denominadas enzimas de restrição ou endonucleases. Estas enzimas clivam o DNA em fragmentos de determinados tamanhos, cuja análise no gel de agarose, resulta em diferentes padrões de tamanhos de fragmentos. Apesar de ser uma técnica relativamente simples, sua aplicação é limitada por pequenas falhas e por não diferenciar subgenótipos contidos em uma mesma espécie ou de genótipos de diferentes regiões geográficas, além disso, a técnica também não é capaz de detectar infecções mistas (WIDMER et al., 2002).

A PCR em Tempo Real (*Real time PCR*), que foi desenvolvida no início dos anos 90, permite que a amplificação da PCR seja monitorada em tempo real. A vantagem principal desta técnica sobre a PCR convencional é que ela permite a análise dos produtos, não sendo necessária a manipulação após sua amplificação (GASSER, 2006). Além disso, esta técnica permite diferenciar as espécies testadas, sem o uso adicional de RFLP ou sequenciamento, que diminui o tempo necessário para o processamento das amostras (RAMIREZ, et al., 2006). Por outro lado, a dificuldade no uso da PCR em Tempo Real é que produtos de amplificação inespecífica não são diferenciados dos produtos de amplificação desejados, além de ser uma técnica onerosa financeiramente (HUBER, 2007).

2.5 Espécies de *Cryptosporidium* parasitando aves

Atualmente, apenas três espécies de *Cryptosporidium* spp. são reconhecidas como válidas tendo como hospedeiros a classe das aves, sendo estas, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium galli*. Além destas, têm sido relatados 13 genótipos com “status” de espécies desconhecidas, sendo estes os genótipos Avian I-VI, o genótipo pato preto, o genótipo da galinhola (woodcock) da Euro-asiática e genótipos de gansos I-V (RYAN, XIAO, 2014; ABE, MAKINO, 2010).

2.5.1 *Cryptosporidium meleagridis*

A espécie *Cryptosporidium meleagridis*, além da infecção em aves, é transmitida para humanos, sendo considerada como um patógeno emergente em humanos e é a terceira espécie mais comumente diagnosticada neste hospedeiro (XIAO, FAYER, 2008; BAROUDI et al., 2013), ficando atrás apenas de *C. parvum* e *C. hominis* (QUAH et al., 2011; LI et al., 2015).

Entretanto, nenhum dos genótipos foi considerado patogênico para humanos e parecem ser adaptados aos hospedeiros da classe das aves (FENG, 2010; RYAN, POWER, 2012). São considerados genótipos distintos, no entanto, no futuro poderão ser descritos como novas espécies, uma vez que mais informações sobre a sua biologia se tornarem disponíveis (RYAN, 2010).

A primeira descrição de criptosporidiose aviária foi feita por Tyzzer em 1929, mas após 35 anos, Slavin diagnosticou estruturas semelhantes à *Cryptosporidium* no íleo de perus e nomeou o parasito de *Cryptosporidium meleagridis* (SLAVIN, 1955), assim como descreveu os estágios assexuados e sexuados do seu ciclo de vida.

Em uma pesquisa conduzida na República Tcheca entre 2012 e 2013 (MÁCA; PAVLÁSEK, 2015), utilizando 663 amostras fecais de Perdizes vermelhas (*Alectoris rufa*) criadas em cativeiro, foi detectado *Cryptosporidium* em 22% (146 amostras), sendo que 21% (142) de *C. meleagridis* e 0,6% de *C. baileyi* (4 amostras). Na Argélia entre 2010 e 2011, Baroudi et al. (2013), realizaram um estudo com 90 amostras do íleo de galinhas e 57 de

perus. Das amostras de galinhas, 26 continham *C. meleagridis* e cinco *C. baileyi*, enquanto nos perus 25 (43,9%) foram detectados apenas *C. meleagridis*.

Devido às diferenças genéticas, o *Cryptosporidium meleagridis* pode ser classificado em subtipos, sendo reportados na literatura tanto em humanos quanto em aves (ABE; MAKINO, 2010; XIAO, 2010; BAROUDI et al., 2013).

2.5.2 *Cryptosporidium baileyi*

A espécie *Cryptosporidium baileyi* é a segunda espécie de *Cryptosporidium* aviária descrita, foi originalmente isolada de frangos de corte de criação comercial, esta foi nomeada com base no seu ciclo de vida e características morfológicas (CURRENT et al., 1986). Atualmente é conhecido como a espécie de *Cryptosporidium* aviária mais frequente, principalmente em animais de corte, jovens, com menos de 50 dias (GOMES, 2009; RYAN, 2010; YUAN et al., 2014).

Infecções naturais por *C. baileyi* têm sido relatadas em vários sítios anatômicos de seus hospedeiros, incluindo a conjuntiva, nasofaringe, traqueia, os brônquios, os sacos aéreos, intestino delgado, intestino grosso, ceco, cloaca, bursa de Fabrício, rins e trato urinário (LINDSAY; BLAGBURN, 1990).

Após a inoculação oral, observou-se que os sítios primários de desenvolvimento eram a bursa de Fabrício e a cloaca (LINDSAY et al., 1986). Em inoculação intra traqueal de oocistos em galinhas, resultou em alta carga parasitária no trato respiratório (LINDSAY et al., 1986; BLAGBURN et al., 1987; LINDSAY et al., 1987). Infecções da conjuntiva ocorreram em algumas aves quando os oocistos foram colocados diretamente sobre o saco da conjuntiva (LINDSAY et al., 1987). No entanto, as aves eram mais propensas a desenvolverem infecções na bursa de Fabrício e na cloaca (LINDSAY et al., 1987).

Cryptosporidium baileyi é provavelmente a espécie mais comum na classe das aves, e tem sido relatada em uma variedade de espécies (LINDSAY; BLAGBURN, 1990; PAVLÁSEK, 1993; RYAN et al., 2003; ABE; ISEKI, 2004; JELLISON et al., 2004; KIMURA et al., 2004; CHVALA et al., 2006; HUBER et al., 2007; VAN ZEELAND et al., 2008). Sendo também demonstrada a infecção cruzada de *C. baileyi* entre várias espécies de aves (CURRENT et al., 1986; LINDSAY et al., 1987, 1989; LINDSAY; BLAGBURN, 1990; CARDOSO et al., 2005).

Na descrição do seu ciclo de vida há limitações, os estágios endógenos foram observados em alguns perus e nas infecções com alta carga parasitária, as aves desenvolveram estágios endógenos apenas na bursa de Fabrício (CURRENT et al., 1986). Hospedeiros mamíferos, como ratos e caprinos, inoculados experimentalmente, não adquiriram a infecção (CURRENT et al., 1986).

Cryptosporidium baileyi foi analisada utilizando os genes alvos incluindo o 18S, HSP70, COWP e Actina e demonstrou ser geneticamente uma espécie distinta (XIAO et al., 1999; SULAIMAN et al., 2000; XIAO et al., 2000; MORGAN et al., 2001; EGYED et al., 2002; SULAIMAN et al., 2002).

Geneticamente a espécie *Cryptosporidium baileyi* é mais estreitamente relacionado ao genótipo Avian I e II. A relação entre *C. baileyi* e outras espécies intestinais e gástricas não está claro quando se usa a análise filogenética para os genes 18S, Actina e COWP, mas a análise no locus HSP70 coloca *C. baileyi* em um ramo que contém todas as espécies de *Cryptosporidium* gástricas em vez do ramo que inclui as espécies intestinais (XIAO et al., 2002).

2.5.3 *Cryptosporidium galli*

A espécie *Cryptosporidium galli*, terceira espécie de *Cryptosporidium* aviária foi descrita pela primeira vez por Pavlásek (1999) em galinhas, com base nas diferenças biológicas. Posteriormente, o parasito foi redescritos com base nas diferenças moleculares associando-as com as biológicas (RYAN et al., 2003).

Ao contrário das outras duas espécies aviárias, os estágios do ciclo de vida de *C. galli* desenvolvem-se no proventrículo, e não no trato respiratório ou dos intestinos delgado e grosso (PAVLÁSEK, 1999, 2001). Pouco se sabe sobre o ciclo de vida de *C. galli*, mas o desenvolvimento das fases endógenas parece estar localizado nas células epiteliais glandulares do proventrículo e fases de trofozoítas, macrogamontes e oocistos têm sido observados (RYAN, 2010).

Cryptosporidium galli parece estar associado com doença clínica gerando alta mortalidade (BLAGBURN et al., 1990; PAVLÁSEK, 1999; MORGAN et al., 2001; PAVLÁSEK, 2001). A histopatologia do proventrículo de tentilhões (Passeriformes) infectados demonstrou necrose e hiperplasia das células epiteliais glandulares, com grande número de oocistos fixados à superfície de células epiteliais glandulares (MORGAN et al., 2001).

Infecções naturais *C. galli* já foram relatadas em várias espécies de aves domésticas e silvestres (PAVLÁSEK, 1999, 2001; RYAN et al., 2003; NG et al., 2006, RYAN et al., 2003). Futuros estudos são necessários para determinar a extensão da variabilidade de hospedeiros da classe das aves para *C. galli*. Neste sentido, estudo de transmissão cruzada demonstrou que oocistos de *C. galli* foram infecciosos para pintos (*Gallus gallus*) com nove dias de idade, mas não para frangos de 40 dias de idade, o fator idade foi primordial para a infecção (PAVLÁSEK, 2001).

Análises filogenéticas utilizando três genes alvo (18S, HSP70 e Actina) identificou *C. galli* como uma espécie distinta (RYAN et al., 2003). A localização gástrica no hospedeiro e o tamanho de seu oocisto, considerado grande, sugerem que esta espécie está mais intimamente relacionada com as espécies gástricas de *Cryptosporidium* o que tem sido apoiada por análises moleculares. Observou-se através de análises no loci SSUrRNA que *C. galli* é mais estreitamente relacionado com o genótipo aviário IV e com outras espécies gástricas como *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium serpentis* e *Cryptosporidium andersoni* (RYAN, 2010).

2.6 Genótipos de *Cryptosporidium* parasitando aves

Em adição às três espécies de *Cryptosporidium* reconhecidas como válidas para aves, têm sido relatados 13 genótipos com “status” de espécies desconhecidas, sendo estes os genótipos Avian I-VI, o genótipo pato preto, o genótipo da galinhola (woodcock) da Euroasiática e genótipos de gansos I-V (RYAN, XIAO, 2014; ABE, MAKINO, 2010). Sendo que nenhum destes é considerado patogênico para humanos e parecem ser adaptados aos hospedeiros da classe das aves (FENG, 2010; RYAN; POWER, 2012). São considerados genótipos distintos, no entanto, no futuro poderão ser descritos como novas espécies, uma vez que mais informações sobre a sua biologia se tornarem disponíveis (RYAN, 2010).

Os genótipos Avian I-VI, foram identificados a partir de uma variedade de espécies de aves (MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006). As análises das sequências no “locus” do gene SSUrRNA indicam que, embora os genótipos Avian I e II sejam mais intimamente relacionados com *C. baileyi*, se comportam geneticamente distintos (99,4% e 97,6% de semelhança, respectivamente a *C. baileyi*) e exibindo 98,2% de semelhança entre si. No

“locus” do gene Actina, os genótipos Avian I e II apresentaram apenas 95,7% e 88,3% de semelhança, respectivamente, com *C. baileyi*.

O genótipo Avian I foi diagnosticado em canários (*Serinus canaria*) e pavão (*Pavo cristatus*) (NG et al, 2006; NAKAMURA et al, 2009). O genótipo Avian II foi descrito de avestruzes e em várias espécies de psitacídeos (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; SEVA et al., 2011; NGUYEN et al., 2013).

Wang et al. (2014) relataram a presença do genótipo Avian II em 0,78% (3/385) em amostras fecais de frangos na China. Quanto aos sítios de infecção, o genótipo Avian II foi relatado parasitando o epitélio da cloaca e, em menor extensão, o epitélio do reto e bursa de Fabrício de avestruzes (SANTOS et al., 2005).

Isolados do genótipo Avian III foram geneticamente mais estreitamente relacionados ao genótipo da galinhola Euro Asiáticos (98,8% e 98,5% de similaridade genética no locus do gene 18S e Actina, respectivamente). Aves parasitadas com os genótipos Avian I-III não apresentaram sinais clínicos, como diarreia, dispnéia, tosse ou espirro (RYAN, 2010). O genótipo Avian III tem sido relatado em várias espécies das ordens Psitaciformes e Passeriformes (NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; MAKINO et al., 2010; QI et al., 2011; GOMES et al., 2012; NAKAMURA et al., 2014).

O genótipo Avian IV foi identificado na ave *Zosterops japonicus* ("olho branco japonês") da República Tcheca, esta ave apresentou um quadro clínico de diarreia e anorexia. Na análise microscópica de amostras fecais, somente oocistos de *Cryptosporidium* foram observados, descartando outro agente etiológico causador da sintomatologia. Nas análises filogenéticas utilizando o 18S, este genótipo exibiu 97,9% de similaridades com *C. galli* (RYAN, 2010).

Cryptosporidium Avian V já foi assinalado em um papagaio da frente azul da Amazônia (*Amazona aestiva*) e descrito em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) no Japão, Brasil e China (ABE, MAKINO, 2010; NAKAMURA et al., 2014; QI et al., 2011), não sendo associada à doença clínica. Além do registro do genótipo de *Cryptosporidium* Avian V em aves, há um relato de sua ocorrência em répteis (*Iguana iguana*) (KIK et al., 2011). Por comparações filogenéticas do gene 18S em múltiplas amostras, o genótipo V está relacionado ao *C. baileyi* e ao genótipo Avian I, com uma similaridade maior ao genótipo Avian II (ABE; MAKINO, 2010).

Infecção renal associada à doença clínica urinária por *Cryptosporidium* foi atribuída ao genótipo Avian V em cacatua (*Lophochroa leadbeateri*) (CURTISS et al., 2015).

Recentemente, Chelladurai et al. (2016) analisaram amostras fecais positivas para oocistos de *Cryptosporidium* provenientes do pássaro preto da asa vermelha (*Agelaius phoeniceus*) na América do Norte. Para as análises moleculares foram utilizados três genes alvos (18S, Actina, HSP70), como resultado, a espécie gástrica *Cryptosporidium galli* estava presente e estes autores sugerem um novo genótipo intimamente relacionado às espécies gástricas, sendo denominado de *Cryptosporidium* genótipo Avian VI. Estes resultados contribuem para a compreensão da diversificação de *Cryptosporidium* em passeriformes, a maior ordem da classe das aves.

O genótipo da galinhola euro Asiática que só foi descrito apenas na galinhola euro-asiática (*Scolopax rusticola*) (NG et al., 2006), não possui muitas informações. Este genótipo está mais estreitamente relacionados ao genótipo Avian III e às espécies de *Cryptosporidium* gástricas (*C. serpentis*, *C. muris*, *C. andersoni*) (RYAN et al., 2003; NG et al., 2006). Todos os estágios endógenos de desenvolvimento, incluindo oocistos foram detectados somente no proventrículo (RYAN, 2010).

O genótipo do pato preto foi identificado em um pato preto (MORGAN et al., 2001) apresentando similaridades genéticas com os genótipos de ganso I e II nas análises

filogenéticas utilizando o gene alvo 18S, apresentando 96,9 e 97,5% de similaridade, respectivamente.

As análises microscópicas de secções do intestino delgado coradas pela hematoxilina e eosina indicaram ocorrência de uma infecção entérica com numerosos oocistos fixados à superfície apical dos enterócitos, mas informações clínicas sobre a ave infectada não foram disponibilizadas (MORGAN et al., 2001). O genótipo do pato foi posteriormente identificado em gansos do Canadá (*Branta canadensis*) (JELLISON et al., 2004; ZHOU et al., 2004). Este genótipo parece ter uma especificidade por hospedeiros da ordem dos Anseriformes.

Os genótipos do Ganso I-V, foram identificados em um estudo para a pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em gansos canadenses, onde as amostras de fezes foram coletadas em 13 locais em Ohio e Illinois (USA); após as caracterizações genéticas, estes foram nomeados de genótipos ganso I e II, além desses genótipos foi diagnosticado o genótipo do pato preto e as espécies *C. parvum* e *C. hominis* (ZHOU et al., 2004). Neste estudo, a análise filogenética da sequência do gene 18S revelou que os genótipos ganso I e II e o genótipo do pato preto estavam intimamente relacionados.

Em outro estudo, conduzido por Jellison et al. (2004), usando amostras fecais provenientes de gansos (*Branta canadensis*) do Canadá e dos Estados Unidos parasitados por *Cryptosporidium* sp., evidenciaram cinco genótipos do ganso (I-V). Assim como o genótipo do pato, estes parecem ter uma especificidade pelo hospedeiro da ordem dos Anseriformes.

2.7 Criptosporidiose em aves

A Criptosporidiose é considerada uma das principais infecções parasitárias que acometem a classe das aves. Quando comparado aos estudos em mamíferos, poucas são as pesquisas deste parasito em aves. Desde a primeira descrição do gênero *Cryptosporidium* em aves (TYZZER, 1929), a criptosporidiose tem sido diagnosticada em mais de 30 espécies desta classe em todo o mundo (Ryan, 2010).

Três formas clínicas da Criptosporidiose natural são relatadas em aves: respiratório, intestinal e renal (LINDSAY, BLAGBURN, 1990). Além destas, a forma da criptosporidiose do aparelho urinário em galinhas poedeiras adultas (TRAMPEL et al., 2000) doença ocular que foi diagnosticada em um surto de grave em corujas (MOLINA-LO'PEZ et al., 2010).

São reconhecidas como válidas, três espécies de *Cryptosporidium* infectando para a classe das aves, *C. meleagridis* (SLAVIN, 1955), *C. baileyi* (CURRENT et al., 1986) e *C. galli* (RYAN et al., 2003). Estas espécies infectam várias espécies de aves tanto domésticas quanto silvestres, sendo que cada uma apresenta locais de predileção de parasitismo associadas ou não a sintomatologia clínica. Além dessas espécies, 13 genótipos são relatados como possíveis agentes da criptosporidiose aviária (RYAN, 2010; CHELLADURAI et al. 2016).

2.7.1 Criptosporidiose por *Cryptosporidium meleagridis*

Cryptosporidium meleagridis tem ampla abrangência de hospedeiros e é classificada como a terceira espécie mais prevalente em humanos (NAKAMURA et al., 2009). Provavelmente, sua habilidade em infectar humanos e outros mamíferos é devido à sua relação filogenética próxima com *C. parvum* e *C. hominis*.

Além destas espécies citadas acima, também já foram identificados em aves *C. hominis*, *C. parvum*, *C. serpentis*, *C. muris* e *C. andersoni*. Alguns autores argumentam que estas espécies não infectam verdadeiramente as aves e são encontradas devido a uma ingestão acidental de oocistos (RYAN et al., 2014).

Cryptosporidium meleagridis geralmente apresenta como local de parasitismo intestinos delgado e grosso e bursa de Fabricius (RYAN 2010). A infecção com esta espécie está associada a enterite, diarreia e mortalidade (SLAVIN, 1955; PAGÈS-MANTÉ et al. 2007). Retardamento no crescimento, foi observado em frangos de corte infectados experimentalmente após duas semanas da infecção, mas o peso vivo final e mortalidade não foi observado (TUMOVÁ et al., 2002).

A sintomatologia clássica dessa espécie são as diarreias severas e em grandes quantidades, podendo levar ao quadro de desidratação e debilidade do animal e consequentemente o óbito (SANTÍN, 2013). Infecções assintomáticas também foram relatados em calopsitas (ABE, ISEKI 2004). A infecção de aves por *C. meleagridis*, geralmente é assintomática.

Nas infecções entéricas há um quadro característico de diarreias com frequência moderada à severa. Devido à grande perda de líquido do organismo ocorre desidratação, depressão, perda de peso e fraqueza. Bem como, alterações histopatológicas têm sido relatadas, atrofia e fusão das microvilosidades, hiperplasia e hipertrofia epitelial, hiperplasia das criptas intestinais, atrofia dos folículos da Bursa de Fabrício e moderado infiltrado celular na lâmina própria (O'DONOGHUE, 1995).

2.7.2 Criptosporidiose por *Cryptosporidium baileyi*

Cryptosporidium baileyi, tem sido associado principalmente a infecções respiratórias com elevada morbidade e mortalidade em aves de produção (LINDSAY, BLAGBURN, 1990; SRETER et al., 1995). As infecções com *C. baileyi* estão associadas a rinite, conjuntivite, sinusite, traqueíte, aerossaculite e sinais clínicos como dispnéia, tosse, espirros e depressão (LINDSAY, BLAGBURN, 1990). Bougiouklis et al., 2013, descreveram otite média associada com *C. baileyi* em um falcão (*Falco cherrug*), com histórico de dispnéia.

Os sinais clínicos são mais graves em de produção (*Gallus gallus*) do que em indivíduos adultos, assim como a elevada eliminação de oocistos (LINDSAY et al., 1988). Goodwin et al. (1996) observaram alta taxa de infecção *C. baileyi* (41%) associada à traqueíte e perda de peso corporal entre frangos de corte em ambiente comercial. Três falcões mestiços foram diagnosticados com *C. baileyi* (van ZEELAND et al., 2008), em um observou chiado laríngeo e ao exame oral revelou inchamento epiglotal, os outros dois falcões mostraram descarga nasal e espirros. Tentativas de tratar os três falcões, não obtiveram sucesso e eles vieram a óbito. Inoculação intra-traqueal experimental de perus com oocistos de *C. baileyi* causou sintomas clínicos de doença respiratória, mortes e aerossaculite (LINDSAY et al., 1987).

A infecção da bursa de Fabrício com *Cryptosporidium baileyi* foi diagnosticada em um grupo de aves jovens (*Mergus serrator*) em um zoológico da Alemanha, que morreram com um quadro anêmico (SCHULZE et al., 2012). Foram constatadas que as bursas estavam infectadas com *Cryptosporidium*, apresentando hiperplasia, degeneração, desprendimento das células epiteliais e leve bursite, lesões tipicamente observadas na criptosporidiose bursal em outras espécies aviárias. Os autores relataram que uma possível fonte de disseminação de oocistos, poderia ter sido outras espécies de aves jovens resistentes que conviveram juntos. Assim como também a introdução de *C. baileyi* através dos patos-reais adultos (*Anas platyrhynchos*), que foram utilizados para a incubação dos ovos de *Mergus serrator*, para aumentar a taxa de eclosão, na fase de reprodução natural.

As lesões histológicas causadas pela infecção por *C. baileyi* na bolsa de Fabrício pode inibir o desenvolvimento da imunidade humoral, causando retardo no desenvolvimento de mecanismos de defesa, tornando os frangos (*Gallus gallus*) vulneráveis a outros patógenos (SRÉTER, VARGA, 2000).

A criptosporidiose renal também está associada a *C. baileyi* (GARDINER, IMES 1984; RANDALL, 1986; NAKAMURA, ABE, 1988). Rins de aves infectadas foram relatados como pálidos e aumentados, e ocasionalmente cristais de urato foram vistos em túbulos de superfície (LINDSAY, BLAGBURN, 1990). A criptosporidiose renal foi experimentalmente induzida em frangos co-infectados com *C. baileyi* e o vírus da doença de Marek (ABBASSI et al., 1999).

Cryptosporidium baileyi também foi diagnosticado como agente responsável por um surto de doença ocular em 16 corujas em que duas delas tiveram de ser eutanasiadas, devido à gravidade da doença. Embora *C. baileyi* tenha sido isolado da parte superior trato respiratório das corujas, nenhuma delas mostrou sinais clínicos de doença respiratória (MOLINA-LÓPEZ, et al., 2010).

Por outro lado, nenhum sinal clínico aparente de doença foram relatados em diferentes espécies aviárias infectadas com *C. baileyi*, incluindo avestruzes da China (QI et al., 2011, WANG et al., 2011), e calopsita do Japão (ABE, ISEKI, 2004).

No entanto, existem relatórios de ocorrência simultânea de *Cryptosporidium* com outros agentes infecciosos (vírus da doença de Marek, da doença bursal infecciosa e da anemia da galinha) tornando a infecção por *Cryptosporidium* mais grave (LEVY et al., 1988; ABBASSI et al., 2000).

Sinais respiratórios, retardo do crescimento e mortalidade já foram demonstrados em frangos infectados com *C. baileyi* que já foram vacinados com o vírus da doença de Marek. No entanto, frangos infectados apenas com *C. baileyi*, os sinais clínicos não foram observados (ABBASSI et al., 2000). Abbassi et al. (2000), demonstraram um efeito sinérgico considerável em galinhas simultaneamente infectados experimentalmente com o vírus da doença de Marek com *C. baileyi*.

2.7.3 Criptosporidiose por *Cryptosporidium galli*

Cryptosporidium galli apresenta como local de parasitismo, o proventrículo mas pode também apresentar sintomatologia de diarreia e gerar alta mortalidade no plantel, geralmente esta espécie é diagnosticada em aves silvestres (BLAGBURN et al., 1990; RYAN et al., 2003).

Em infecções crônicas, com eliminação prolongada de oocistos tem sido relatadas em aves infectadas com *Cryptosporidium galli* (ANTUNES et al., 2008; da SILVA et al. 2010). Sendo que, da Silva et al. (2010) não observaram sinais clínicos na maioria das aves infectadas com *C. galli*, e em poucas aves, ocorreu apatia crônica e / ou perda de peso seguido de mortalidade. No entanto, o papel de *C. galli* não está claro, isto porque neste estudo as aves que vieram a óbito apresentaram septicemia por *Escherichia coli* ou enterite por *Isospora* spp.

2.7.4 Criptosporidiose em aves por *Cryptosporidium parvum*

Além das espécies que comumente infectam a classe das aves, já foi relatado infecção por *Cryptosporidium parvum* de grau leve a moderado associado a doença respiratória estabelecidas em galinhas (*Gallus gallus*) (TZIPORI et al., 1980). Um grave surto de *C. parvum* (ZYLAN et al., 2008) foi diagnosticado em maçaricos criados em cativeiro. As aves infectadas apresentaram um início súbito de diarreia, letargia e ingestão reduzida de ração e todas apresentaram sinais durante o surto, morrendo dentro de sete dias.

QUAH et al., 2011, ao analisarem amostras fecais de diferentes espécies de aves provenientes de um zoológico da Malásia, diagnosticaram *C. parvum*, sendo que os autores relatam que esta espécie não foi a causadora de infecção neste hospedeiro e que

possivelmente a ave teve o papel de transportadora mecânica; denotando risco significativo para a saúde pública.

GRACZYK et al., 1996, realizaram inoculação por via oral de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em patos (*Anas platyrhynchos*) e observaram que não houve a infecção neste animais, havendo a passagem intestinal de oocistos. Estes autores, relatam que aves aquáticas podem servir como vetores mecânicos contribuindo para contaminação das águas superficiais.

Zylan et al., 2008, descreveram um surto de criptosporidiose em uma unidade de criação de espécies de aves (*Burhinus oedicnemus*) em Dubai, onde os animais apresentavam enterite catarral. Embora as investigações microbiológicas tenham revelado a infecção por *Salmonella infantis*, em achados histopatológicos demonstraram a presença de estágios endógenos de *Cryptosporidium* na superfície da mucosa intestinal. Após o diagnóstico molecular utilizando o gene alvo 18S, revelou *Cryptosporidium parvum* em amostras fecais.

Ng et al., 2006, ressaltaram que são necessários mais estudos para determinar a extensão da adaptação do hospedeiro para espécies de *Cryptosporidium* e suas implicações com relação à saúde pública.

2.7.5 Criptosporidiose ocasionada pelos genótipos aviários

Pouco se sabe sobre a criptosporidiose ocasionada pelos genótipos que parasitam aves. O genótipo de *Cryptosporidium* Avian III, foi isolado *Agapornis roseicollis* que apresentavam vômitos crônicos e perda de peso (MAKINO et al., 2010). Curtiss et al., 2015, relataram *Cryptosporidium* genótipo Avian V como o agente causador de doença renal e cloacal em uma calopsita (*Lophochroa leadbeateri*), ave apresentava letárgica e anoréxica, com sons respiratórios anormais e prolapso cloacal.

Não foram reportados sinais clínicos para genótipos Aviários I, II, IV e VI, assim como também nenhuma informação clínica está disponível para infecções com genótipo da galinhola da Eurasiática, genótipo de pato preto e genótipos do ganso I- IV (MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; RYAN, 2010; NAKAMURA et al., 2014; CHELLADURAI et al. 2016).

2.8 *Cryptosporidium* em aves de produção

Criptosporidiose em aves de produção desempenha um papel negativo para o hospedeiro e conseqüentemente para os produtores, gerando altas perdas econômicas. A criptosporidiose em aves é caracterizada por diferenças clínicas de acordo com os sítios de localização do parasitismo, podendo se desenvolver em consequência do estresse devido a várias causas, com a presença de doenças concomitantes e assim como também várias condições de imunodeficiência (SRÉTER, VARGA, 2000).

Na Argélia, Baroudi et al., 2013, pesquisaram *Cryptosporidium* em 23 granjas de criação de frangos e 16 de perus, ambas destinadas à produção de carne, totalizando 147 animais (90 galinhas e 57 perus). De cada criação em média foi analisado 4 aves que após morreram principalmente de diarreia. Fragmentos do íleo foi coletado para diagnóstico histopatológico acompanhado do diagnóstico molecular. Para frangos de corte, *C. meleagridis* foi diagnosticada em 51 (91%) amostras e *C. baileyi* 5 (9%). Já os perus, todos foram diagnosticados com *C. meleagridis*. Os autores relatam a importância de novos estudos sobre a extensão da contaminação ambiental por *C. meleagridis* em água potável no local do estudo, pois os resíduos de aves eram frequentemente utilizados como fertilizantes.

Infecção experimental com frangos (TUMOVÁ et al., 2002) com idades que variaram de 7, 14, 21, 28 e 31 dias, através da administração por via oral de oocistos de *C. baileyi* e *C. meleagridis*, os autores observaram que frangos adultos possuíam maior resistência a infecção, sendo capazes minimizar a sintomatologia, enquanto apresentaram um quadro anêmico com diarreia.

Pesquisa de *Cryptosporidium* em criação de faisões foram realizadas em um programa de melhoramento animal intensivo na República Tcheca (MÁCA, PAVLÁSEK, 2016), onde foram diagnosticadas as espécies: *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium meleagridis*. Durante o período do estudo *C. baileyi* foi mais frequentemente diagnosticado nas fezes das aves, com positivities variando de 11,1 a 100% (faisões de 4 a 16 semanas de idade), e oocistos de *C. meleagridis* foram detectados em idades de 6 a 15 semanas variando de 7,1 a 100% nas fezes durante as fases de criação. Sendo que *C. galli* foi diagnosticado somente em faisões de 36 semanas de idade.

Na China, província de Zhejiang, Wang et al, 2014, realizaram o primeiro relatório sobre a taxa de infecção de *Cryptosporidium* spp. em frangos de corte. Um total de 385 amostras fecais de sete regiões da província que possuíam criações de frangos. Das amostras investigadas 38 foram positivas para *Cryptosporidium* e que após a caracterização genotípica, foi identificado *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Cryptosporidium* Avian II. Estes autores sugerem que a criptosporidiose nestas aves do estudo é uma ameaça potencial para a saúde pública, bem como a economia da região.

GOMES et al. (2009) diagnosticaram oocistos de *Cryptosporidium* sp. em aves domésticas, patos (*Anas platyrhynchos*), pintos (*Gallus gallus*) e codornas (*Coturnix japonica*), provenientes de dois Mercados do Município do Rio De Janeiro. Estes autores associaram as altas taxas de infecção por *Cryptosporidium*, às más condições sanitárias encontradas nos ambientes estudados. Segundo CAUSAPÈ (2002) as medidas sanitárias apropriadas para a minimização da dispersão de oocistos, associados à higiene pessoal, resulta diminuição da incidência de criptosporidiose.

No Uruguai Casanova et al., 2015, pesquisaram *Cryptosporium* em quatro fazendas de criações de frango de corte, sendo que em todas alguns animais mostravam sinais respiratórios, sendo que, três animais de cada fazenda foram necropsiados. A avaliação microscópica de esfregaços de conteúdo intestinal de todas aves necropsiadas coradas pelo Kinyoun foram negativas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Entretanto, após histopatologia da bursa de Fabricius, foi demonstrado estágios endógenos de *Cryptosporidium* sp., demonstrando a infecção.

BEHZADI, 2009, observou no Sul do Iran uma fêmea de avestruz (*Struthio camelus*), de 2,5 meses de idade, apresentando prolapso cloacal com diarreias frequentes, tempo depois o animal veio a óbito. Na análise parasitológica utilizando técnica de Ziehl-Neelsen modificada e corando com Giemsa, apresentou oocistos de *Cryptosporidium*. O autor relata que a sintomatologia da doença não foi observada em nenhum dos avestruzes adultos.

Animais recém-nascidos a jovens possuem o sistema imunológico imaturo, portanto, com pouca eficácia, sendo mais susceptíveis à doença e suas possíveis complicações (TUMOVÁ, 2002). Pesquisas elucidam que *Cryptosporidium galli* é a espécie de *Cryptosporidium* mais prevalente em Passeriformes, infectando e adultas, causando distúrbios gastrointestinais crônicos, semelhantes aos que *Cryptosporidium serpentis* em cobras (SILVA, 2010; NAKAMURA, MEIRELES 2015).

2.9 Epidemiologia de *Cryptosporidium* spp.

Alguns fatores contribuem significativamente para o sucesso de *Cryptosporidium* como um parasito (RYAN et al., 2014): grande número de oocistos são eliminados para o

ambiente por hospedeiros infectados; os oocistos que são resistentes às adversidades ambientais podendo ser infectantes por muitos meses em clima temperado e condições úmidas; a infecção pode ser iniciada com um pequeno número de oocistos, teoricamente um único oocisto poderia causar infecção em um hospedeiro susceptível (OKHUYSSEN et al., 1999; CHAPPELL et al., 2006).

A falta de uma terapêutica para o tratamento humano e animal com criptosporidioses, também permitiu uma alta prevalência e ampla distribuição do parasito (RYAN et al., 2014). Embora centenas de fármacos tenham sido testados para a profilaxia e tratamento de criptosporidiose em animais e humanos (FAYER et al., 1997), um único fármaco foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, a Nitazoxanida (Alinia®), (No Brasil com o nome comercial de Anita®) e indicado para o tratamento da diarreia causada por *Giardia* e *Cryptosporidium* (No Brasil indicada para as diarreias ocasionadas por helmintos e uma série de microrganismos). Contudo, Alinia® não mostrou ser melhor do que o placebo para o tratamento da criptosporidiose em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (AIDS) ou pacientes com outras imunodeficiências (RYAN et al., 2014).

Espécies de *Cryptosporidium* de humanos e animais são onipresentes no ambiente e podem ser adquiridas através de várias rotas (ROBERTSON et al., 2014). A infecção por *Cryptosporidium* sp. ocorre através do oocisto pela rota fecal-oral que pode ser direta ou indiretamente. Para humanos; a transmissão pode ser de um indivíduo para outro, principalmente devido à falta de higiene pessoal ou entre os membros do agregado familiar, entre os frequentadores de creches, centros de saúde, ou de outras instituições; ou de animais a humanos, tais como trabalhadores agrícolas, proprietários de animais, veterinários e visitantes agrícolas. A maioria das transmissões indiretas ocorre através da ingestão de água contaminada ou águas de recreação, especialmente em piscinas (WHO, 2006).

Ingestão de alimentos contaminados pode ser uma fonte de transmissão, a partir de locais de produção onde as culturas podem ser contaminadas através da adubação orgânica por esterco, a partir da contaminação de água de irrigação, ou através das mãos de trabalhadores agrícolas (ROBERTSON et al., 2014).

Os alimentos podem ser contaminados por oocistos de *Cryptosporidium* sp. em qualquer ponto, durante a distribuição, preparação, manipulação do alimento, água de lavagem, superfícies de preparação, equipamentos ou utensílios de cozinha. Os alimentos primários implicados na transmissão são frutas e vegetais crus, leite não pasteurizado, carne crua e molho também foram documentados. Embora a transmissão também tenha sido relatada a partir de solo contaminado, praticamente nada se sabe da prevalência de infecções de “camping” ou atividade de jardinagem. Como a profilaxia e o tratamento terapêutico são opções limitadas na criptosporidiose, a prevenção e controle da infecção parecem ser a melhor conduta (RYAN et al., 2014).

Uma vez que os oocistos de *Cryptosporidium* sp. são basicamente indistinguíveis uns dos outros em termos de morfologia, métodos moleculares são essenciais para a identificação de espécies, genótipos e subtipos para que se possa identificar especificamente o organismo responsável por determinada infecção e a origem e rotas de transmissão tanto para humanos quanto para os animais (XIAO, FAYER, 2008).

A transmissão direta (contato com pessoas ou animais infectados havendo a ingestão dos oocistos) ou indireta (ingestão de água contaminada e de alimentos contaminados, inalação dos oocistos) é favorecida pela alta densidade populacional (CACCIÒ et al., 2005). Águas utilizadas em recreação também representam grande problema de saúde pública, em virtude do grande número de banhistas e da resistência de *Cryptosporidium parvum* aos desinfetantes utilizados, especialmente o cloro (CARPENTER et al., 1999).

O emprego de fezes de animais como adubo orgânico em culturas vegetais pode causar infecção direta pela formação de aerossóis ou contaminar águas superficiais e subterrâneas. A ingestão de água contaminada mostra-se a principal via de infecção humana (FAYER et al., 2000). Pelo menos 165 surtos epidêmicos foram registrados nos últimos anos por consumo de água contaminada com *C. parvum* (KARANIS et al., 2007).

Outros fatores relevantes a serem considerados em estudos epidemiológicos é a possibilidade da veiculação hídrica e que a forma infectante, o oocisto, apresenta alta resistência às adversidades ambientais. Oocistos podem ser viáveis na água do mar por 35 dias e em fezes cerca de 130 dias. Com congelamento a -22° C uma pequena proporção de oocistos ainda permanecem viáveis e capazes de resistir por aproximadamente 33 dias. A dessecação é o único fator que realmente afeta a manutenção da infectividade. Com 4 horas de dessecação 100% dos oocistos se tornam inviáveis (ROBERTSON et al., 1992; TAMBURRINI et al., 1999). A irradiação solar também representa um importante fator na inativação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (KING et al., 2008).

O protozoário possui distribuição mundial, encontrado tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Relatos evidenciam que o parasito está presente em 80 a 97% das águas superficiais e em 26 a 54% das águas tratadas (SMITH; ROSE, 1998; LUNA et al., 2002).

Nos EUA, entre 1990 e 2000 pelo menos dez surtos de criptosporidiose foram associados com água potável, tendo um aumento nos meses mais quentes do ano (AMIN, 2002). Em 2003 confirmaram-se 25 casos humanos de criptosporidiose em Surrey, no Canadá. Destes, 15 pessoas tinham nadado em piscina recreativa, em cuja água foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp.; nove casos foram diagnosticados como *C. parvum* (LOUIE et al., 2004).

Fatos históricos sobre surtos de criptosporidiose estão associados com fontes alimentares e contaminação da água. Como, nos Estados Unidos, San Antonio, no Texas, em 1984, ocorreu o primeiro surto de criptosporidiose. Em Julho, de 1986, houve um surto no de criptosporidiose relatado pelos laboratórios para o escritório de Epidemiologia do Novo México. Dos 24 paciente internados, cinco foram associados a contaminação de águas não tratadas e superfícies de contatos com águas (GALLAHER et al., 1989).

Em 1987 houve o segundo maior surto norte-americano em Georgia, com notificação da doença de aproximadamente 13.000 pessoas infectadas. No ano seguinte, em Ayrshire, no Reino Unido, ocorreu um dos maiores surtos de criptosporidiose, com a contaminação de um reservatório de água dejetos de bovinos utilizados como fertilizantes. Em abril de 1993, houve o grande surto, relatado na história da criptosporidiose, com 400.00 pessoas infectadas, nos EUA, em Milwaukee, Wisconsin. (HELLER, et al. 2004).

Pesquisas relataram que em climas temperados, em regiões mais frias há um pico de criptosporidiose associado a precipitação. Em regiões da África Oriental, a infecção coincidiu com o fim das estações da chuva. Consequentemente, um aumento de *Cryptosporidium* em águas superficiais e na agricultura (STEFFEN et al., 2015).

Tantos os determinantes sociais como os ecológicos estão envolvidos na incidência da criptosporidiose. Dentre estes fatores o saneamento básico, as condições básicas de higiene e as regiões com baixo recurso ou periféricas, influenciam no ciclo evolutivo da doença, ao modo que aumentam seu risco e a disseminação do patógeno. Segundo COCO (2009) em um estudo de revisão, países como Brasil, Uganda, Peru e Guiné há registro de diarreia com crianças menores de 2 anos de idade, sendo o principal agente etiológico *Cryptosporidium* spp.

2.10 Controle e Prevenção

A prevenção é considerada a melhor forma de reduzir impactos de uma determinada doença (MORENS et al., 2004), que pode ser mensurado pelo custo financeiro, mortalidade e morbidade, dentre outros fatores. Custos financeiros devem incluir prejuízos na saúde humana e animal, levando em conta a perda de produtividade animal, custos de tratamento em humanos e animais e convalescência em pacientes humanos. Mesmo que um país de baixa renda apresente alta incidência de uma doença, os custos para lidar com um surto costumam ser maiores em países de alta renda, devido a maiores encargos com despesas médicas e salários de funcionários de saúde (TORGERSON, MACPHERSON, 2011).

A falta de profilaxia e opções eficazes de tratamento em humanos e animais contribuiu para a disseminação do parasito. De acordo com a FAO (2015), há 795 milhões de pessoas com má nutrição no mundo, fator que contribui para a imunodeficiência.

Apesar do progresso na taxonomia e epidemiologia molecular de *Cryptosporidium*, ainda há muito a ser pesquisado. Estudos sobre a transmissão em humanos e animais são dificultados por falta de ferramentas adequadas para subtipagem de espécies de *Cryptosporidium* que sejam geneticamente distantes de *C. parvum* e *C. hominis*, ambas espécies mais comumente diagnosticadas em humanos. Estes estudos podem levar à maior compreensão dos fatores de virulência, infectividade aos humanos e especificidade de hospedeiros (RYAN et al., 2014). Estas informações devem ampliar a compreensão sobre a estrutura da espécie e transmissão de *Cryptosporidium* sp. em humanos e animais (PULESTON et al., 2014; RYAN et al., 2014), além de contribuir para o desenvolvimento de vacinas e novas terapias de controle (RYAN et al., 2014). Sem um método de diagnóstico prático, tratamento efetivo para pacientes imunocomprometidos e vacinação efetiva, as chances de reduzir o impacto da doença num futuro próximo são limitadas (SHIRLEY et al., 2012).

Neste contexto de falta de medicamentos eficazes e de medidas adequadas de profilaxia e disseminação da doença, a sanidade e educação sanitária surgem como medidas eficazes de controle da criptosporidiose humana (RYAN et al., 2014; PAINTER et al., 2015). Medidas de controle e prevenção incluem boas práticas de higiene como lavar bem as mãos antes de preparar alimentos, após utilizar o banheiro, trocar fraldas de crianças, auxiliar pessoas doentes com sinais de diarreia. Em relação às piscinas, rios ou lagos, recomenda-se não ingerir a água, não nadar quando apresentar sinais de diarreia e levar crianças ao banheiro a cada 60 minutos, utilizar sistemas de tratamento suplementares eficientes para piscinas; tratar e filtrar água potável para inativar ou remover o parasito e atenção ao viajante (YODER et al., 2012; PAINTER et al., 2015).

A difícil eliminação do oocisto no ambiente é condicionada pela inadequação dos métodos normalmente utilizados, pois o mesmo é resistente à cloração. Para inativá-lo por congelamento, são necessárias baixas temperaturas de pelo menos -20°C durante mais de oito horas. Portanto, o consumo de alimentos crus, tratados apenas com cloro ou congelamento pode propiciar a infecção. O aquecimento do alimento por micro-ondas durante 20 segundos inativa a maioria dos oocistos. O choque térmico também foi eficiente, mas autores argumentam que o aquecimento foi o responsável pela inativação (DUHAIN et al., 2012).

O uso de água potável e recreativa contaminada por *Cryptosporidium* tem implicações importantes na saúde humana. O primeiro surto de criptosporidiose humana hídrica relatado foi nos EUA em 1984 e desde então vários surtos envolvendo centenas de pessoas foram identificados em várias partes do mundo. Contudo, apenas poucos grandes surtos foram documentados, sendo o maior deles em 1993 em Milwaukee, Estados Unidos (MACKENZIE et al., 1994). Em 2012, um aumento de infecções por *Cryptosporidium*, principalmente *C. hominis*, foi relatada na Europa (WIDERSTRÖM et al., 2014).

O risco de surtos por veiculação hídrica pode ser minimizado ao aperfeiçoar o controle da qualidade de água e empregar várias barreiras que removam ou inativem todos ou a maior parte dos grupos de patógenos (WIDERSTRÖM et al., 2014). Em tratamento de água, recomenda-se a utilização de irradiação ultravioleta (COLLINET-ADLER & WARD, 2010; YODER et al., 2012), a ozonização (YODER et al., 2012) ou a utilização de filtros com poros menores que um micron (PAINTER et al., 2015). Autores relatam que a simples instalação de uma membrana de filtro adequada pode reduzir os índices de criptosporidiose de veiculação hídrica em 79% (HUNTER; THOMPSON, 2005).

A melhora do tratamento de água na Inglaterra e País de Gales, por exemplo, resultou em menor ocorrência de surtos de criptosporidiose relacionados à ingestão de água em anos recentes. Em contraste, surtos relacionados a piscinas, principalmente as públicas, continuam a ocorrer, com incidências maiores nas estações do ano em que a frequência em piscinas é maior. Surtos relacionados a outras interações com água também aumentaram (COETZEE et al., 2008).

Caso seja identificado um surto, o mais indicado é utilizar uma equipe multiprofissional de investigadores, microbiologistas, agentes de saúde ambiental e até a mídia local. É aconselhado alertar médicos e hospitais para monitorarem casos suspeitos. Membros da família ou contatos próximos ao doente, caso apresentem sintomas, devem ser orientados a buscarem assistência médica e submeterem amostras fecais para análise (COETZEE et al., 2008). Se o surto for relacionado à água potável, aconselha-se fervê-la antes de utilizá-la. Em um caso na Suécia, com 27.000 habitantes afetados, o agente pôde ser identificado na água durante mais de dois meses depois do surto, demonstrando que a utilização de barreiras microbianas inadequadas em tratamento de água podem acarretar sérias consequências para a saúde pública (WIDERSTRÖM et al., 2014).

Contudo, até o presente momento não existem drogas de efeito consistente para o tratamento e controle da criptosporidiose humana e animal, portanto, para minimizar o risco de infecções causadas por criptosporidiose aviária, é necessário adotar medidas rigorosas baseada em tratamento nutricional dos animais, como também, promover medidas sanitárias, frequente no ambiente com o intuito de prevenir a exposição dos animais e de humanos aos oocistos de *Cryptosporidium* (NAKAMURA, 2015, AMAR et al., 2007). Na criação de aves em ambientes rústicos, é necessário um ambiente que possui formas efetivas de eliminação dos dejetos, de modo que não entre em contato com água e alimentos que serão utilizados posteriormente, como também com outros animais de convívio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Laboratórios da Realização da Pesquisa

Os procedimentos laboratoriais foram realizados em três etapas. A primeira etapa, no laboratório de Protozoologia, situado no Departamento de Parasitologia animal, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, aonde foi feitos os procedimentos laboratoriais para o diagnóstico microscópico de *Cryptosporidium* spp.

Na segunda etapa, que compreendeu desde a extração de DNA, realização das técnicas moleculares, e purificação do DNA, foram realizados no laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental W. O. Neitz, pertencente ao mesmo departamento, Instituto e Universidade citados acima.

Já, para a realização do sequenciamento, DNA purificados foram encaminhados para o Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 Local e Procedimentos de Coleta das Amostras Fecais

As amostras fecais de patos doméstico da família Anatidae (*Cairina moschata*) foram colhidas em duas criações rústicas que foram denominadas de Área A e B. A primeira localizada no município de Seropédica (22° 44' 38" S 43° 42' 28" O) e a segunda no município de Paracambi (22° 36' 42.62" S 43° 42' 39.67" O). Destas duas áreas foi coletado um total de 118 amostras, sendo 60 amostras da área A e 58 da área B. Os animais da coleta eram aves jovens que não ultrapassavam 30 dias de vida. Na figura 3 encontra-se os mapas da localização dos municípios onde foram realizadas as coletas das amostras fecais dos patos.

Nas duas criações, assim que havia a eclosão dos ovos, os patos jovens permaneciam em gaiolas grandes aramadas dentro de galinheiros, eram alimentados com ração e água a vontade, nestas permaneciam até uma média de um mês de idade, para posteriormente serem soltos no ambiente de criação. Para a coleta das amostras fecais dos animais, cada ave jovem era transferido para gaiolas menores, estas apresentavam o fundo aramado. No fundo das mesmas foi colocado um plástico, desta forma as fezes eram retidas no plástico sem que houvesse o pisoteio das mesmas pelo animal e nem o contato com o solo.

3.3 Descrições das Criações

Nas duas áreas de criação de patos, o sistema era à solta, sendo que somente os filhotes eram mantidos em gaiolas com água e ração à vontade, já que são mais frágeis e podem ser predados. Após aproximadamente os 30 dias de idade, os patos eram soltos e andavam livremente à procura de alimentos no ambiente de criação. As aves quando soltas no ambiente, também, era administrado ração duas vezes por dia.

Nas duas criações, além de patos, havia outras aves de produção como galinhas e codornas, mas a ave predominante era o pato, além de cães e gatos, várias aves de vida livre, como rolinhas e pombos, que conviviam neste meio a procura de alimentos e água.

Em relação às condições higiênicas e sanitárias das instalações, por serem aves criadas à solta, fezes era uma constante, espalhadas por todo o ambiente de criação, não só dos patos, mais também de galinhas e aves de vida livre.

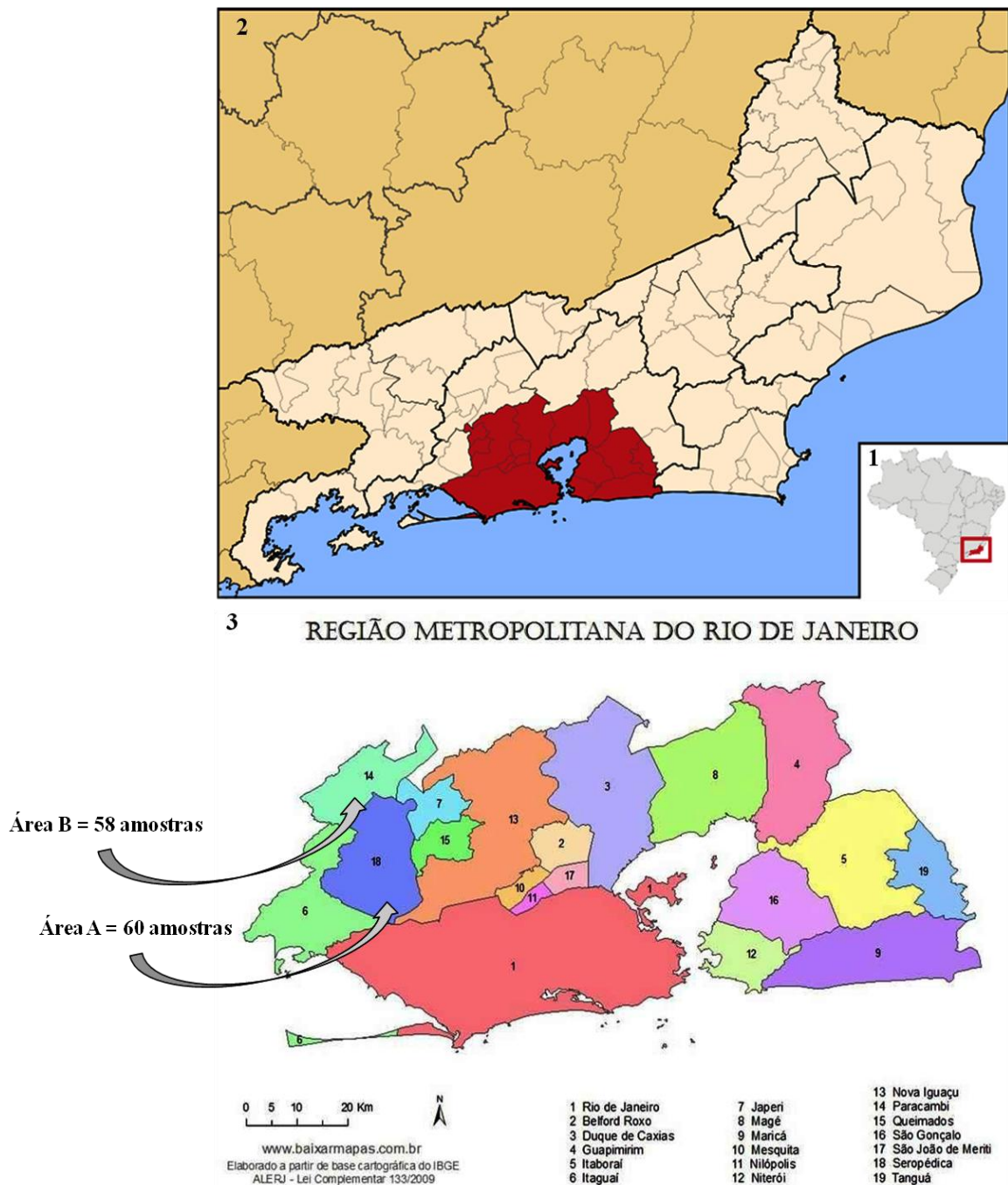


Figura 3. Imagens da localização de coleta das amostras fecais provenientes de patos (*Cairina moschata*): 1- Mapa do Brasil com a localização do estado do Rio de Janeiro, assinalando a região metropolitana do Rio de Janeiro; 2- Região Metropolitana do Rio de Janeiro com os seus municípios (<http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-regiao-metropolitana-do-rio-de-janeiro/>); 3 - Município do Rio de Janeiro subdividido em municípios (<http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-regiao-metropolitana-do-rio-de-janeiro/>), assinalando as áreas de coletas (Áreas A, B), com os respectivos números totais de amostras.

A retirada das fezes do plástico era realizada com o auxílio de uma espátula descartável. Após a coleta, as fezes eram transferidas para recipientes estéreis com solução fisiológica, identificadas e acondicionadas em isopor com gelo e encaminhadas para análise.

A criação do local A, além dos patos usava galinhas (*Gallus gallus*) para a incubação dos ovos para aumentar a taxa de eclosão na fase de reprodução natural. O local B empregava a incubação natural utilizando os patos, além de uma incubadora de ovos improvisada que o proprietário colocava quando tinha um número considerável de ovos de patos para serem chocados. Ambas as criações eram de subsistência, para venda de aves vivas, abatidas e ovos. Na figura 4, encontram-se imagens das duas criações.

3.4 Processamento das Amostras Fecais e Diagnóstico Microscópico

No laboratório, as amostras foram catalogadas, processadas e diagnosticadas por meio da microscopia óptica quanto à presença de *Cryptosporidium* spp. utilizando a técnica de flutuação em solução saturada de açúcar (SHEATHER, 1923), com modificações que seguem abaixo.

As amostras foram identificadas, homogeneizadas com água destilada e filtradas com o auxílio de um tamis plástico descartável revestido com gaze para a retirada de resíduos grosseiros. Após a filtragem a solução foi distribuída em dois tubos cônicos de 15mL e centrifugada durante 10 minutos a 402,4xg. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado restando apenas o sedimento.

Um tubo de cada amostra foi homogeneizado novamente com solução saturada de açúcar (densidade específica de 1,30g/mL) ao passo que o outro tubo foi armazenado sob-refrigeração a uma temperatura aproximada de 4°C. Após a homogeneização com a solução saturada de açúcar, o material passou por uma nova centrifugação durante 5 minutos a 402,4xg.

Posteriormente, na segunda centrifugação, os tubos referentes a cada amostra, foram completados com solução saturada de açúcar até formar um menisco na superfície. Estes foram cobertos com uma lamínula de vidro e após um período de cinco minutos, a lamínula foi retirada da superfície do tubo e colocada sobre uma lâmina de vidro para a realização do diagnóstico microscópico. As amostras foram consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. pela observação de oocistos na microscopia óptica de campo claro e contraste de fase.

Nas amostras diagnosticadas positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., o sedimento fecal acondicionado no tubo de 15mL foi preservado sob-refrigeração, para posterior extração de DNA e as análises subsequentes.

3.5 Extração de DNA

Para a extração de DNA de *Cryptosporidium* sp. foi utilizado o kit comercial da Qiagen ('QIAamp DNA Stool Mini Kit') (COKLIN et al., 2009; DAS et al., 2011), seguindo as recomendações especificadas pelo fabricante, com pequenas modificações. Sendo esta, referentes aos dois períodos de incubação do material onde as amostras foram submetidas a uma temperatura de 95°C, com uma incubação mais longa de 10 minutos, utilizando um agitador com controle de temperatura, a uma rotação de 800rpm para auxiliar na homogeneização das amostras. Ao final da extração, as amostras foram eluídas em 100µL de tampão AE (fornecido pelo fabricante) ao invés de 200µL como sugeria o manual de instruções (FAYER et al., 2010).



Figura 4. Imagens gerais das criações rústicas de patos onde foram analisadas amostras fecais de animais jovens. A e B, imagens da Área A, localizada no município de Seropédica; C e D imagens da Área B, localizada no município de Paracambi.

3.6 Reação de PCR e Nested-PCR Para o Gene Alvo 18S

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene alvo 18S, foi realizada em duas etapas. Na primeira reação, utilizando os ‘primers’ 18SF: 5’- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3’ (‘forward’) e 18SR: 5’- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3’ (‘reverse’), obtendo-se amplicons com aproximadamente 1.325pb (XIAO et al., 1999; FAYER et al., 2010).

Para a segunda etapa, Nested-PCR, utilizando os ‘primers’ 18SNF: 5’- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3’ (‘forward’) e 18SNR: 5’- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3’ (‘reverse’), obtendo-se amplicons entre 826 a 864pb, dependendo da espécie de *Cryptosporidium* e/ou genótipos diagnosticados (XIAO et al., 1999; FAYER et al., 2010).

Como controle positivo para *Cryptosporidium* foi utilizado uma amostra de bezerro, tendo como número de acesso no GenBank - DQ885333, espécie *C. parvum*. Já, para o controle negativo, foi utilizado uma amostra de pato negativo no diagnóstico microscópico.

Na realização das reações da PCR, utilizou 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,2μM de cada ‘primer’ (18SF e 18SR – Invitrogen), Tampão Taq 1X (Invitrogen), 200μM de cada

desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1,0U ‘Platinum Taq Polymerase’ (Invitrogen), 2µL de DNA da amostra e água ultrapura (‘Nuclease-free water’ – Promega) até completar o volume final de 25µL.

Para a reação da Nested-PCR aplicou as mesmas condições da PCR, exceto pela diminuição da concentração de MgCl₂ que passou a ser 2mM e a utilização de 0,2µM do ‘primer’ 18SNF e 0,2µM do ‘primer’ 18SNR, utilizando 1µL de DNA da amostra obtida da PCR e água ultrapura (‘Nuclease-free water’ – Promega) até completar o volume final de 25µL.

As condições da termociclagem realizadas nas reações da PCR e Nested tiveram como ponto de partida a temperatura de 94°C por três minutos (‘hot start’), seguida de um total de 35 ciclos onde ocorreu a desnaturação do DNA a 94°C por 45 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos nas temperaturas de 58°C (PCR primária) e 59°C (PCR secundária) por 45 segundos e a extensão da cadeia de DNA dos produtos formados a 72°C por um minuto. Ao final dos 35 ciclos efetuou uma etapa de extensão a 72°C por sete minutos.

Após a execução de todos os ciclos, 10µL do material foi visualizado através da eletroforese em gel de agarose a 2 % (100V por 60 minutos), corado com brometo de etídio (5µg/mL). O tampão de amostra utilizado foi ‘loading buffer’ 6X – tipo III (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e o marcador usado como peso molecular foi ‘1Kb Plus DNA Ladder’ (Invitrogen). Os géis de agarose foram posteriormente observados sob luz ultravioleta, analisados e fotografados.

3.7 Purificação, Quantificação de DNA e Sequenciamento

Todas as amostras que amplificaram DNA, obtidas através da reação da Nested-PCR, foram posteriormente purificadas utilizando ExoSAP-IT® (USB Corporação; Cleveland, OH), seguindo as recomendações do fabricante e em seguida foram sequenciadas com os iniciadores da Nested-PCR. O ExoSAP-IT® pode ser usado para limpar produtos de PCR variando de 100bp até mais de 20kb. É composto por enzimas Exonuclease I (*Exo I*) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) que foram adicionadas a um microtubo 2,5µL de cada mais 12,5µL do produto obtido da Nested-PCR.

Após centrifugação, os microtubos foram para o termociclador, inicialmente para incubação em 37°C durante 15 minutos seguido de inativação das enzimas ExoSAP-IT a 80°C durante 15 minutos. Assim obtendo-se a purificação do DNA.

Os microtubos contendo um volume total de 17,5µL de amostra foram retirados do termociclador e 4 µL do material foi visualizado através da eletroforese em gel de agarose a 2% (100V por 60 minutos), corado com brometo de etídio (5µg/mL). O tampão de amostra utilizado foi ‘loading buffer’ 6X – tipo III (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e o marcador usado como peso molecular foi "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen). Os géis de agarose foram posteriormente observados sob luz ultravioleta, analisados e fotografados, para posteriormente serem quantificados.

Para o envio das amostras para o sequenciamento (plataforma da USP), além da purificação, foi realizada a quantificação de DNA de cada amostra, para tal foi feito um novo gel de agarose a 2%, sendo que desta vez usando um marcador de peso molecular denominado Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A quantificação de DNA de cada amostra foi feita através da visualização das bandas no gel, comparando com as bandas do marcador, observando a equivalência entre elas, em termos de intensidade e dividir a quantidade em nanogramas da banda por 4, porque foi aplicado 4uL no gel de cada amostra. O ideal, para o envio de amostras para a Plataforma da USP, é que as amostras fiquem com aproximadamente 20ng/uL, para a obtenção de uma sequências de boa qualidade. Caso seja acima de 20ng/uL é recomendado diluições e o inverso concentração.

3.8 Alinhamento das Sequências e Análises Filogenéticas

A análise dos cromatogramas e edição das sequências foram realizadas utilizando-se o programa Bioedit versão 7.1 (HALL, 1999). O alinhamento das sequências foi feito através do algoritmo software ClustalW (LARKIN et al., 2007).

Na plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) realizou uma busca de sequências obtidas através do sequenciamento dos espécimes utilizando o gene 18S para determinar suas identidades e possíveis homologias com espécies previamente depositadas no 'GenBank'.

As sequências do presente estudo foram depositadas no GenBank, utilizando-se a plataforma BankIt, disponibilizado pelo banco de dados. As sequências registradas no 'GenBank' utilizadas como parâmetro de comparação com as sequências consenso obtidas no presente estudo estão descritas no quadro 1.

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o 'software' MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A árvore consenso pelo método 'Neighbor-Joining', utilizando-se o algoritmo Kimura 2, para o gene alvo, 18S com o teste de "bootstrap" com 1000 réplicas. Durante a construção da árvore consenso através do método 'Neighbor-Joining' foi efetuada a deleção completa dos 'gaps'.

Quadro 1. Sequências utilizadas para o gene alvo 18S, registradas no ‘GenBank’, e que foram comparadas com as obtidas no estudo para a construção da árvore filogenética.

ESPÉCIES e GENÓTIPOS	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA NO GenBank	AUTOR	LOCAL	HOSPEDEIRO ORIGINÁRIO
Avian genotype I	GQ227479	Nakamura et al., 2009	Brasil	Canário (<i>Serinus canaria</i>)
Avian genotype II	DQ002931	Meirelles et al., 2006	Brasil	Avestruz (<i>Struthio camelus</i>)
Avian genotype III	AB471641	Makino et al., 2010	Japão	“Passaro do amor” <i>Agapornis roseicollis</i>
	FJ205700	Feng et al., 2009	China	Amostra ambiental (águas residuais)
	GQ227480	Sevá et al., 2009	Brasil	“Passaro do amor” <i>Agapornis roseicollis</i>
	GU074384	Gomes et al., 2012	Brasil	Calafate <i>Padda oryzivora</i>
	HM116385	Qi et al., 2011	China	black-billed magpie (<i>Pica pica</i>)
	KF994570	Prystajecy et al., 2014	Canadá	Amostra ambiental (águas superficiais)
Avian genotype V	HM116381	Qi, et al., 2011	China	Calopsita (<i>Nymphicus hollandicus</i>)
Duck genotype	AY504514	Zhou et al., 2004	USA	Ganso do Canadá (<i>Branta canadensis</i>)
Goose genotype I	AY120912	Xiao et al., 2002	USA	Ganso do Canadá (<i>Branta canadensis</i>)
Goose genotype II	AY504515	Zhou, et al., 2004	USA	Ganso do Canadá (<i>Branta canadensis</i>)
<i>C. andersoni</i>	AB089285	Koyama et al., 2005	Japão	Bovinos (<i>Bos taurus</i>)
<i>C. baileyi</i>	EU814429	Wang et al., 2010	China	Patos (<i>Anas platyrhynchos</i>)
	GU377276	Wang et al., 2011	China	Avestruz (<i>Struthio camelus</i>)
	HM116378	Qi et al., 2011	China	Mandarim (<i>Taeniopygia guttata</i>)
	HM116380	Qi et al., 2011	China	black-billed magpie (<i>Pica pica</i>)
	JX548296	Wang et al., 2014	China	Galinhas (<i>Gallus gallus</i>)
<i>C. canis</i>	AF112576	Xiao et al., 1999	USA	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)
<i>C. felis</i>	AF112575	Xiao et al., 1999	USA	Gato (<i>Felis catus domesticus</i>)
<i>C. galli</i>	EU543270	Antunes et al., 2008	Brasil	Lesser seed-finches (<i>Oryzoborus angolensis</i>)
	GU734646	Silva et al., 2010	Basil	Rusty-collared seedeater (<i>Sporophila collaris</i>)
	GU734647	Silva et al., 2010	Brasil	Azulão (<i>Cyanocorpsa brissonii</i>)
	HM116387	Qi, et al., 2011	China	Silver-eared Liocichla (<i>Leiothrix argentauris</i>)
	HM116388	Qi, et al., 2011	China	Bombycilla garrulus (Syn. Bohemian Waxwing)
<i>C. hominis</i>	KP314259	Liu, et al., 2015	China	Macaco esquilo (<i>Saimiri sciureus</i>)

Quadro 1. Sequências utilizadas para o gene alvo 18S, registradas no ‘GenBank’, e que foram comparadas com as obtidas no estudo para a construção da árvore filogenética (Continuação).

ESPÉCIES e GENÓTIPOS	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUENCIA NO GenBank	AUTOR	LOCAL	HOSPEDEIRO ORIGINÁRIO
<i>C. meleagridis</i>	AF180339	Wang et al., 2010	China	Pombo (<i>Columba livia</i>)
	KP730310	Vermeulen et al., 2015	Austrália	Cangurus (<i>Petrogale penicillata</i>)
	JQ217141	Wang et al., 2012	China	Codornas (<i>Coturnix coturnix japonica</i>)
	JX548298	Wang et al., 2014	China	Pintos (<i>Gallus gallus</i>)
	EU814439	Morgan et al., 2000	Austrália	Periquito de colar (<i>Psittacula krameri</i>)
<i>C. muris</i>	AY642591	Hikosaka, Naka, 2005	Japão	Rato de campo japonês (<i>Apodemus speciosus</i>)
<i>C. parvum</i>	L25642	Kilani, Wenman, 1994	Canadá	Bovino (<i>Bos taurus</i>)
<i>C. suis</i>	AF108861	Morgan et al., 1999	Austrália	Suíno (<i>Sus scrofa</i>)
<i>C. serpentis</i>	AF151376	Kimbell et al., 1999	USA	Cobra do milho (<i>Elaphe guttata guttata</i>)

4. RESULTADOS

4.1 Diagnóstico Microscópico de *Cryptosporidium* spp.

Do total de 118 amostras fecais analisadas, sendo 60 amostras da área A e 58 da área B; somente os animais da área A, 20 amostras apresentaram positividade para a presença de oocistos no exame parasitológico de fezes 20/118 (16,95%), utilizando a técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar.

Neste trabalho, nas amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. foram observadas quantidades de oocistos variáveis por campo microscópico (5 até 30) por amostras analisadas. Na figura 4, encontra-se a imagem dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., diagnosticados neste trabalho através da observação microscópica.

No exame parasitológico de fezes utilizando a técnica de centrifugação e flutuação com solução saturada de açúcar, diagnosticou, somente, oocisto de *Cryptosporidium* spp. e raramente (quatro amostras), outro oocisto de coccídeo (Figura 5). Cabe ressaltar que devido à idade das aves (até 30 dias de idade), mesmo que estas estivessem parasitadas pela maioria dos helmintos característicos desse hospedeiro, possivelmente não estariam eliminando formas infectantes nas fezes devido ao período pré-patente incompleto.

Os patos que apresentaram positividade para *Cryptosporidium* em exame parasitológico de fezes, na criação deste estudo, não apresentavam sintomatologia clínica no ato da coleta das amostras fecais. Segundo informações do proprietário, as aves da criação independente da espécie eram vacinadas, mas não foi mencionado quais tipos de vacinas e/ou a cobertura vacinal equivalente.

4.2 Diagnóstico Molecular

Para o diagnóstico molecular, foram selecionadas 10 amostras de patos positivas na microscopia, que apresentavam mais de 20 oocistos de *Cryptosporidium* spp. por campo microscópico, destas realizou, então, a extração de DNA.

Após o processo da Nested-PCR foram observados amplicons com aproximadamente 830 pb (Figura 6), confirmando que a região do gene alvo 18S foi amplificada para *Cryptosporidium* spp.

4.3 Análise das Sequências e Filogenia

Todas as amostras quantificadas apresentaram concentrações próximas a 20ng/μl e portanto foram enviadas à plataforma de sequenciamento da USP sem a necessidade de diluições e concentrações. Após o sequenciamento todos os cromatogramas de acordo com cada amostra, apresentaram sequências de boa qualidade. Na tabela 1, encontram-se o tamanho das sequências obtidas após análise da qualidade dos cromatogramas.

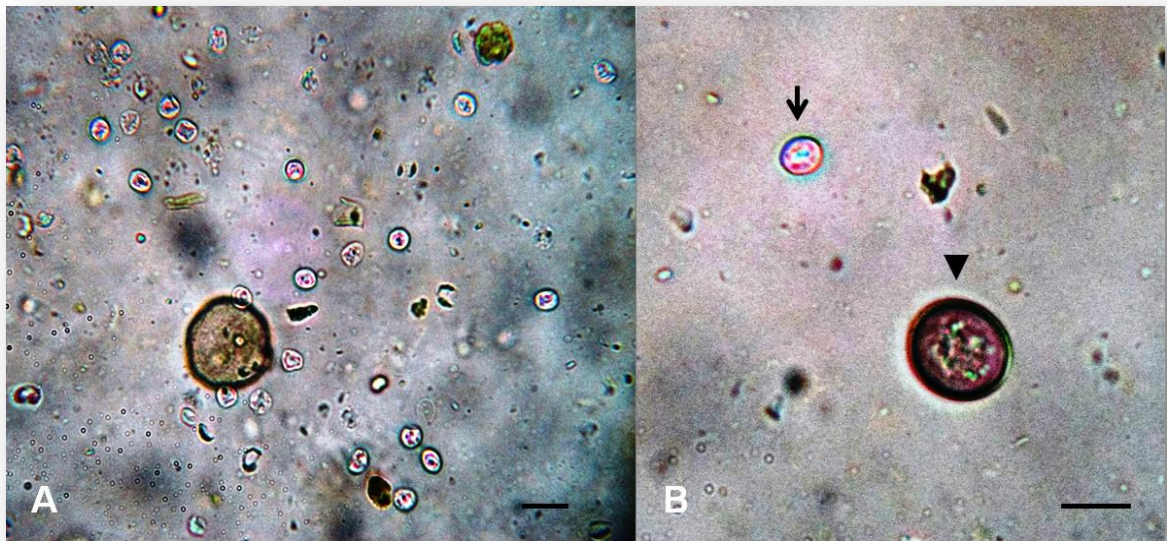


Figura 5. (A) Oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados na microscopia óptica após a utilização da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar, provenientes de amostras fecais de pato doméstico (*Cairina moschata*) de uma criação rústica, localizado no município de Seropédica, Rio de Janeiro. (B) comparação entre um oocisto de coccídeo (▼) e um oocisto de *Cryptosporidium* spp. (↓) (— = 10 µm).

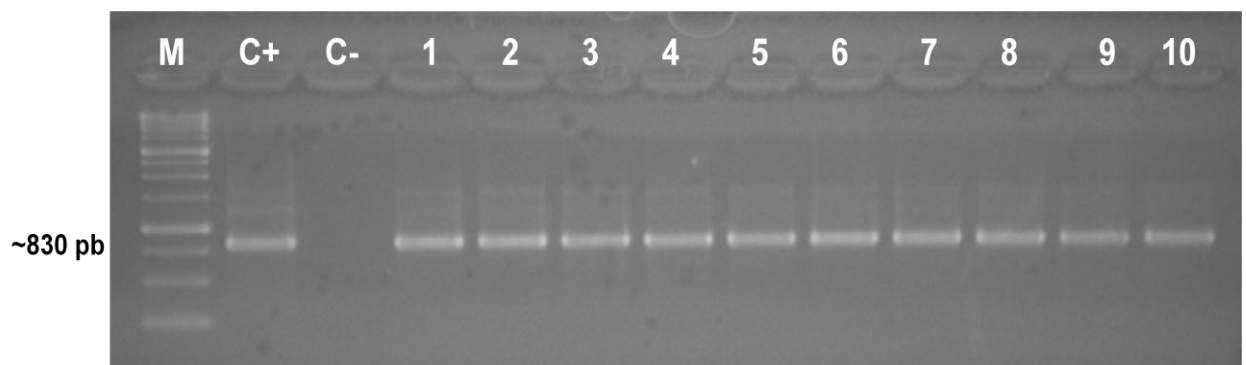


Figura 6. Amplificação pela Nested-PCR do gene alvo 18S. Eletroforese em gel de agarose a 2 % contendo as amostras de *Cryptosporidium* spp. provenientes de pato doméstico (*Cairina moschata*). M = marcador de peso molecular, C+ = controle positivo bovino (*C. parvum*) e C- = controle negativo (amostra de pato negativa no exame microscópico), 1 a 10 amostras de patos positivas.

Tabela 1. Tamanho das sequências obtidas de *Cryptosporidium* após análise dos cromatogramas das amostras de pato doméstico (*Cairina moschata*), referente à área A de acordo com aquelas amostras que apresentaram amplificação de DNA.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA	TAMANHO DO FRAGMENTO
P1	TCB3 (F) e TCB4 (R)	732pb
P2	TCB5 (F) e TCB6 (R)	721pb
P3	TCB 7 (F) e TCB8 (R)	722pb
P4	TCB9 (F) e TCB10 (R)	732pb
P5	TCB11 (F) e TCB12 (R)	732pb
P6	TCB13 (F) e TCB14 (R)	721pb
P7	TCB1 (F) e TCB2 (R)	721pb
P8	TCB3 (F) e TCB4 (R)	724pb
P9	TCB5 (F) e TCB6 (R)	732pb
P10	TCB7 (F) e TCB8 (R)	723pb

Os fragmentos das sequências obtidas dos isolados de *Cryptosporidium* das amostras dos patos comparando-se com as sequências obtidas depositadas no GenBank, apresentaram de identidade de 100% e cobertura da sequência de 99% de similaridades com as sequências de *Cryptosporidium baileyi* (Tabela 2). Nesta tabela, foram inseridas as 10 primeiras sequências que haviam trabalhos publicados.

As sequências obtidas neste estudo foram alinhadas (Figura 7) e observou-se que as 10 amostras de patos apresentaram pouquíssimas diferenças em comparação com a sequência completa do gene alvo 18S da espécie *Cryptosporidium baileyi* depositado no GenBank (número de acesso: AY954882), sendo que o fragmento de 721pb analisado corresponde a posição nucleotídica de 203-923. Neste estudo, as sequências P2 e P5, tiveram no início um nucleotídeo diferente (A para G); P1, P3, P4, P6, P8, P9 e P10 no início da sequência tiveram "R"; P7 teve somente a modificação que ocorreu em 429pb e que todas as outras amostras tiveram (G para A) e P9 em 327pb teve "Y". Em alguns casos especiais, outras letras além de A, T, C e G estão presentes numa sequência. Estas letras representam ambiguidade. De todas as moléculas experimentadas, há mais de um tipo de nucleotídeo naquela posição. Os códigos

da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) são assim discriminados: <https://iupac.org/>. Essas pequenas variações poderiam ser devido a variações intraespecíficas que podem ocorrer dentro de um isolado. Desta forma, R= G A (purina); Y= T C (pirimidina). Portanto, foram depositadas no Genbank, as sequências P1= KY710765, P2= KY710766 e P7= KY710767.

No estudo da posição taxonômica dos isolados obtidos de patos, a espécie *Cryptosporidium baileyi* (Figura 7), se agrupa com a topologia da árvore filogenética obtida pelo Neighbor Joining, onde se observa a formação de dois clades, um correspondente a espécies intestinais e outro gástricas. *Cryptosporidium baileyi* se agrupa no clade das espécies intestinais, ficando em um ramo diferente das espécies que infectam somente o intestino, esta localização possivelmente se deve a variabilidade de sítios de localização de infecção que ocorre com esta espécie.

Tabela 2. Sequências obtidas do GenBank de *Cryptosporidium baileyi* utilizadas como comparação com as sequências obtidas neste estudo, com as suas respectivas identidades.

SEQUÊNCIA (Acesso /origem)	IDENTIDADE	QUERY COVER (Cobertura da sequencia)	REFERÊNCIA	LOCAL
KY012352 Ganso africano (<i>Anser cygnoides</i>)	100%	99%	Cunha, et al., 2017	Brasil
KF994570 <i>Cryptosporidium</i> sp. (águas superficiais)	100%	99%	Prystajecy et al., 2014	Canadá
JX548294 Galinhas (<i>Gallus gallus</i>)	100%	99%	Wang et al., 2014	China
GQ426096 Falcão (<i>Falco cherrug</i>)	100%	99%	Bougiouklis et al., 2013	USA
HM002495 Galinhas (<i>Gallus gallus</i>)	100%	99%	Wang et al., 2010	China
GU377276 Avestruzes (<i>Struthio camelus</i>)	100%	99%	Wang et al., 2011	China
GQ227474 urubu de cabeça preta (<i>Coragyps atratus</i>)	100%	99%	Nakamura et al., 2009	Brasil
GQ227475 Canário da terra (<i>Sicalis flaveola</i>)	100%	99%	Nakamura et al., 2009	Brasil
JQ217142 Codorna (<i>Coturnix coturnix</i>)	100%	99%	Wang, et al., 2012	China
AF262324 Amostras ambientais (água)	100%	99%	Xiao et al., 2000	USA

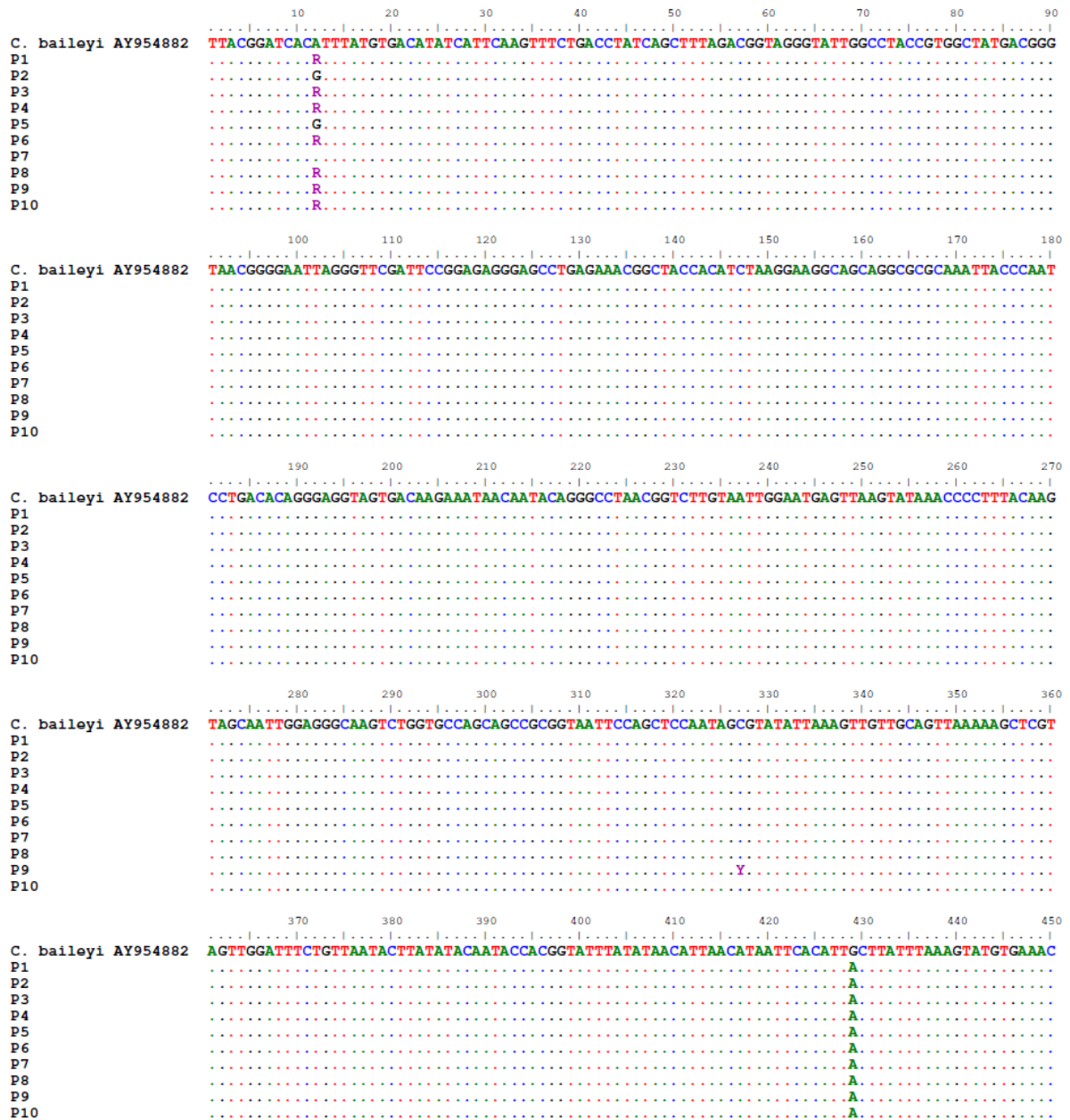


Figura 7. Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes das 10 amostras de pato doméstico (*Cairina moschata*), evidenciando os nucleotídeos idênticos por (.), tamanho da sequência utilizada para comparação: 721pb.

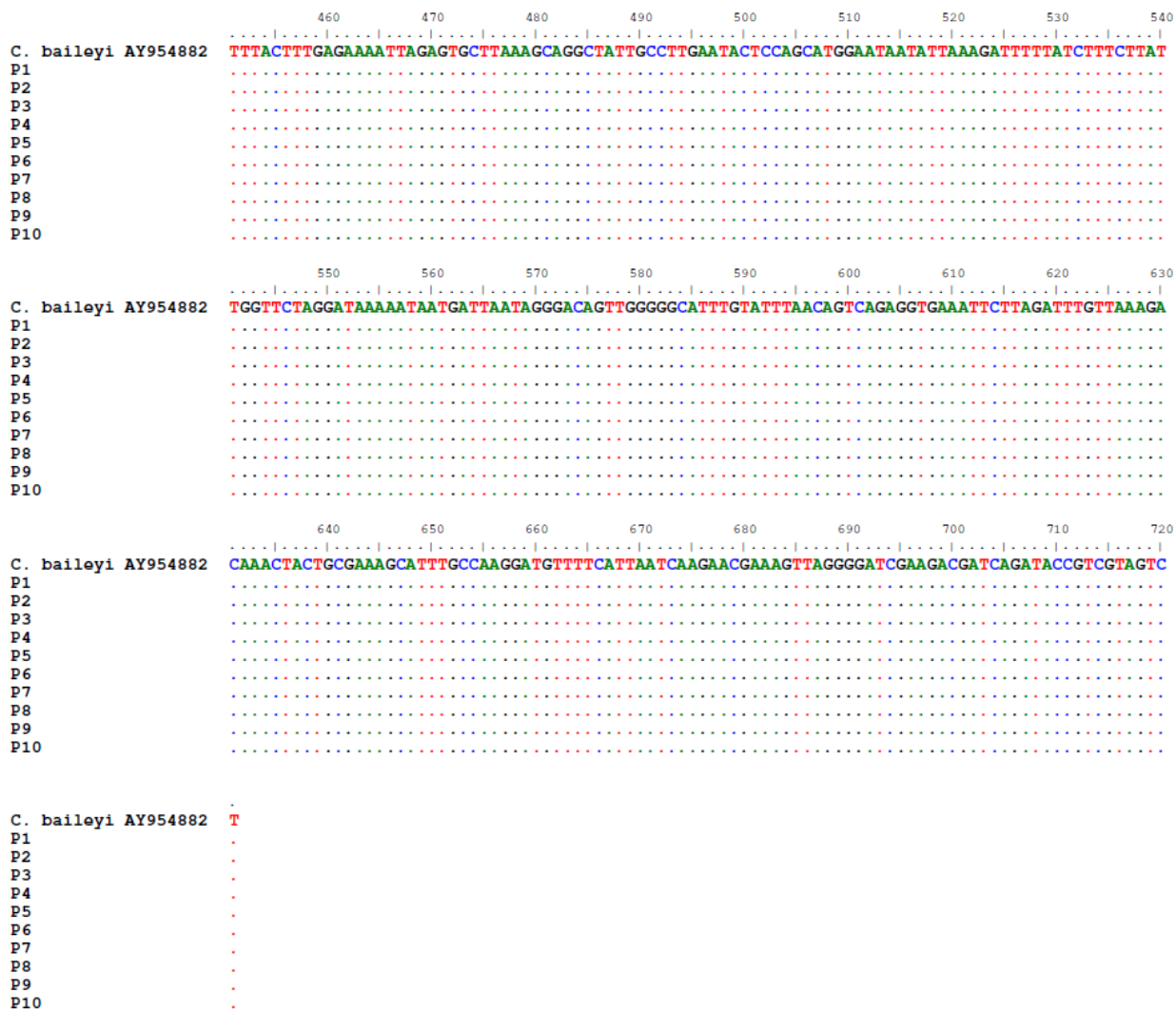


Figura 7. Alinhamento das seqüências obtidas neste estudo provenientes das 10 amostras de pato doméstico (*Cairina moschata*), evidenciando os nucleótidos idênticos por (.), tamanho da seqüência utilizada para comparação: 721pb (continuação).

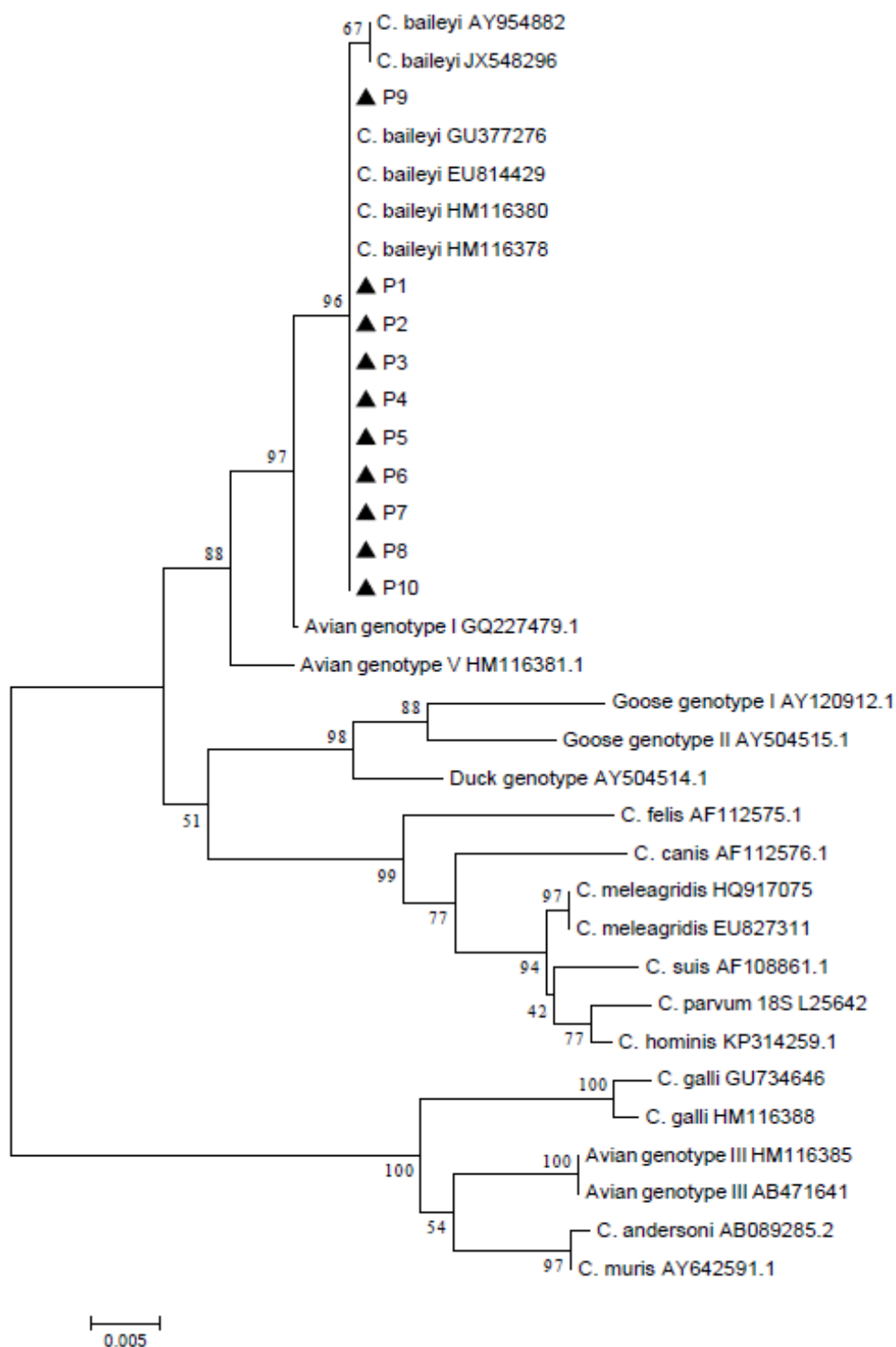


Figura 8. Relação genética entre os isolados de *Cryptosporidium* spp. baseada no sequenciamento total do gene 18 S (tamanho do fragmento analisado: 710pb), inferida pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo kimura-2 parâmetros com análise de bootstrap com 1000 réplicas. As sequências obtidas do GenBank estão indicadas por seus números de acessos. ▲ = isolados obtidos neste estudo de pato doméstico (*Cairina moschata*), da área A.

5. DISCUSSÃO

Várias metodologias têm sido aplicadas para detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de determinados hospedeiros, mas as dificuldades de discriminar entre oocistos e outras estruturas similares, somente com um bom treinamento. Os oocistos de *Cryptosporidium*, apresentam-se com parede lisa, incolor, de forma esférica a subsférica, com quatro esporozoítas alongados no seu citoplasma e um corpo residual (SMITH, 2007). A Criptosporidiose é caracterizada como problema emergente para a indústria avícola mundial é considerada uma das principais infecções parasitárias que acometem a classe das aves. O gênero *Cryptosporidium* tem sido registrado em mais de 30 diferentes espécies de aves no mundo distribuídas nas ordens: Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes e Struthiniformes (SRÉTER; VARGA, 2000; NAKAMURA, MEIRELES, 2015). As infecções por *Cryptosporidium* têm um amplo espectro de sinais clínicos que podem variar de assintomático a infecções graves podendo levar o hospedeiro ao óbito (SANTÍN, 2013). Três formas clínicas clássicas da criptosporidiose natural são relatadas em aves: respiratório, intestinal e renal (LINDSAY, BLAGBURN, 1990), além da criptosporidiose do aparelho urinário (TRAMPEL et al., 2000) e a ocular (MOLINA-LOPEZ et al., 2010).

Alguns estudos têm sido conduzidos para a elucidação dos possíveis fatores de risco para a infecção por *Cryptosporidium* spp., estes sendo voltados principalmente para ruminantes domésticos (NORDEEN et al., 2001; CAUSAPÉ et al., 2002; HOAR et al., 2001), com destaque para fatores como idade do hospedeiro e tipos de manejo, porém para aves poucos são os trabalhos desenvolvidos em relação à associação de fatores de risco para possíveis infecções por *Cryptosporidium* spp.

Um determinante de risco epidemiológico que possui evidências em alguns estudos é a idade das aves para aquisição de *Cryptosporidium* spp., já que esse é um patógeno oportunista e, assim, animais mais jovens se apresentaram com uma maior susceptibilidade à infecção (TUMOVÁ et al., 2002). Acredita-se que animais recém-nascidos a jovens possuem o sistema imunológico imaturo, portanto, com pouca eficácia, sendo mais susceptíveis à doença e suas possíveis complicações (TUMOVÁ et al., 2002).

Tumová et al., 2002, verificaram em estudos de infecção experimental em frangos de corte, que animais mais velhos demonstraram maior resistência à *Cryptosporidium* spp., pelo fato de terem apresentado um maior período pré-patente, ou seja, maior resistência à exposição ao agente etiológico, e um período patente menor; sendo que animais adultos são capazes de minimizar a sintomatologia, enquanto aves jovens apresentaram um quadro anêmico com diarreia.

Neste estudo, conduzido com patos, com idade até 30 dias, não foi observado nenhum sinal ou sintoma no momento da coleta que pudessem estar associados à infecção das aves por *Cryptosporidium* spp. Todas as amostras fecais encontravam-se dentro dos padrões de normalidade, este padrão estando de acordo com as características da espécie estudada, somando-se a sua dieta alimentar. Também não houve histórico de mortes de aves do plantel, informações estas, ditas pelo proprietário. Ressalta-se que a literatura enfoca a rusticidade de patos comparando-se com outras aves de produção, com relação à susceptibilidade a várias doenças, mas não há relato com relação à infecção por *Cryptosporidium* spp.

A eliminação de oocistos de *Cryptosporidium*, pelo hospedeiro, é intermitente em indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Desta maneira, várias amostras de fezes devem ser analisadas antes de ser emitido um diagnóstico final (CURRENT; GARCIA, 1991). Porém, neste trabalho, foram realizadas coletas únicas de amostras nas duas criações de patos e também pelo fato da eliminação de oocistos ser intermitente, possivelmente alguns denotaram

falsos negativos. Enfatizando que o número de coletas por indivíduo é de extrema relevância para a obtenção de um resultado satisfatório através de exames microscópicos. Quanto maior o número de amostras por indivíduo, maiores as chances de se obter positividade no diagnóstico microscópico para *Cryptosporidium*, principalmente em ambientes onde há a infecção (FAYER; XIAO, 2008).

Neste estudo, sugere-se que possivelmente outras espécies de aves de produção como galinhas (*Gallus gallus*), gansos (*Anser anser domesticus*) que eram criados em conjunto com patos, poderiam estar infectados e através da contaminação ambiental infectar os patos. Entretanto, não se deve descartar também a questão das aves de vida livre, principalmente da ordem Columbiformes, como as rolinhas e os pombos, estas aves comumente estavam neste ambiente de criação à procura de água e alimentos. Se infectadas, ao defecarem neste local, o que era comum, poderiam disseminar oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente de criação, podendo promover a infecção para as aves de produção.

Aves de vida livre como possíveis disseminadoras de oocistos de *Cryptosporidium*, gerando contaminação ambiental, já foram mencionadas por Fernandez, et al. (2015) que diagnosticaram *C. meleagridis* em rola comum ou rola brava (*Streptopelia turtur*). Estes autores sugerem que esta ave poderia disseminar este enteropatógeno para outros hospedeiros da classe das aves, assim como também para humanos, já que a espécie diagnosticada por estes autores, apresentava potencial zoonótico. Qi et al. (2011), na China pesquisaram *Cryptosporidium* spp. em 32 espécies de aves em Pet Shops, na ordem Columbiformes foi diagnosticado *C. meleagridis* em pombos (*Columba lívia*) e em rola (*Streptopelia turtur*). Além disso, os pombos (*Columba Lívia*) interagem com aves silvestres, domésticas e diversos mamíferos, incluindo humanos, facilitando a dispersão de oocistos de *Cryptosporidium* spp., caso estejam infectados (GRACZYK et al., 2008).

Os fatores de risco para a infecção estão intimamente relacionados à facilidade de dispersão ambiental dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. Oocistos são eliminados para o meio ambiente através de material fecal de hospedeiros infectados, permanecendo infecciosos durante meses, dependendo das condições ambientais (HONG et al., 2014).

O solo representa um importante veículo para disseminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. contaminado por efluentes além de fezes de animais (KOKEN et al., 2013; ZILBERMAN et al., 2009). Oocistos tornam-se dispersos pela poeira do ar durante as estações mais secas com baixo índice pluviométrico (DOYLE et al., 2012). Hong et al. (2014) realizaram um estudo na Coréia do Sul, para avaliar a extensão da contaminação por *Cryptosporidium* spp. no solo e em vegetais. Através da coleta de amostras de solo de diferentes regiões da península coreana, e de verduras e frutas além de batatas e cenouras, obtiveram positividade para oocistos em 32,4% de amostras do solo analisadas. Nas áreas rurais, provavelmente a principal fonte de dispersão de oocistos para o solo e água, são as fezes de animais de produção e companhia, nestes principalmente cães e gatos (HONG et al., 2014; KOOMPAPONG et al., 2014).

Outra sugestão da possível infecção por *Cryptosporidium* nas aves deste estudo, poderia ser aplicado a questão da água do ambiente de criação, sabe-se que *Cryptosporidium* é de veiculação hídrica que infectam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, inclusive humanos (FAYER; XIAO, 2008). A cloração da água representa um benefício indiscutível à saúde humana, uma vez que o cloro é um desinfetante comum capaz de destruir e/ou inativar a maioria dos microrganismos patogênicos transmitidos pela água (SANTOS, 2011). Porém, os processos convencionais de tratamento da água não são totalmente eficientes para certos parasitos, como os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* (ROSE; HUFFMAN, 2002), que possuem oocistos e cistos, respectivamente, resistentes aos processos de cloração e ao aumento de temperatura, permanecendo viáveis por muito tempo no ambiente.

Na literatura, há relatos da presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas subterrâneas e em águas superficiais, incluindo lagos, mares e rios, bem como em água tratada (JUÁREZ-FIGUEROA et al., 2003; SHORTT et al., 2006; SUNDERLAND et al., 2007; PLUTZER et al., 2008; AZMAN et al., 2009).

Feng et al. (2009), analisaram amostras de águas residuais provenientes de áreas domésticas, coletadas de quatro estações de tratamento em Xangai, China. Para o diagnóstico, foram utilizadas técnicas moleculares usando enzimas de restrição - RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfism) e os genes alvo 18S e o da glicoproteína 60 kDa (GP60). Estes autores relataram a presença de *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. bailey*, *C. suis*, genótipo do rato, genótipo Avian III e um novo genótipo, não compatível com nenhuma sequência depositada no Genbank. Essas espécies e genótipos diagnosticados foram de encontro aos hábitos alimentares da população, onde se abatiam animais de produção, assim como também roedores e várias espécies de aves, além de fezes humanas que eram depositadas nestes ambientes. Este trabalho, também enfatiza a contaminação ambiental, favorecendo a infecção por *Cryptosporidium* a vários hospedeiros susceptíveis.

Como as bacias hidrográficas são vulneráveis à contaminação por várias espécies de *Cryptosporidium*, tanto aquelas de caráter zoonótico e não zoonótico, provenientes de animais domésticos e silvestres, faz-se necessário uma detecção correta e sensível de oocistos de *Cryptosporidium* em águas identificando espécies e/ou genótipo para uma avaliação do risco de transmissão de águas de nascente (Li et al., 2015).

Nos dois locais de coleta das amostras fecais deste estudo, os animais adultos tinham acesso à água para beberem disponibilizadas em vários depósitos rústicos. Como também, existiam depósitos de água para os animais nadarem. No local A eram tanques de alvenaria como depósito de água, já no local B havia uma escavação no solo formando um lago. Já para os animais jovens, nas gaiolas eram disponibilizada recipientes contendo água. Independentes da faixa etária, nos depósitos de água, sejam aqueles destinados para ingestão ou aqueles para os animais nadarem, havia contaminação fecal. Nos depósitos de águas, não havia limpeza, eram sempre acrescentada água ao volume existente. Nos dois ambientes de criação, a presença de fezes no solo era uma constante, estas pertencentes a espécies de aves de produção assim como também aves de vida livre, além de cães e gatos, e possivelmente roedores sinantrópicos.

Fatores relacionados à higiene estão entre os principais fatores de risco para a infecção por *Cryptosporidium* spp. (JOACHIN, 2004). Portanto, podemos associar que limpezas periódicas de gaiolas e bebedouros diminuem a infecção por *Cryptosporidium*, consequentemente, diminuindo o tempo de exposição a possíveis oocistos disseminados em ambientes. Como os animais são principais fontes de eliminação de oocistos para o ambiente, a diminuição da contaminação ambiental promovida por limpeza da área, reduz o risco da infecção por *Cryptosporidium* sp. (CAUSAPÉ et al., 2002). Ng et al. (2006) verificaram que baixas taxas de infecção em aves estão relacionadas ao manejo eficiente encontrado nos aviários, como por exemplo, as medidas de higiene e a salubridade das criações. Entretanto, no presente estudo as condições higiênicas sanitárias observadas não foram de boa qualidade, devido ao grande acúmulo de fezes presentes nestes ambientes de criação, não havia limpeza periódica nas instalações, alimentação era inadequada e não havia assistência veterinária.

Garber et al. (1994) relataram que a aglomeração de animais pode constituir um risco a ocorrência de doenças infecciosas, pois o intenso contato entre eles facilitaria a infecção. Este fato, não foi observado nas instalações das criações deste estudo. Nas duas criações as aves eram soltas e as áreas utilizadas eram amplas, onde todos os animais independentes da idade conviviam em um mesmo ambiente, com a exceção de aves recém-nascidas que eram acondicionadas em gaiolas por serem mais sensíveis e também para não serem predadas.

Possíveis fontes de infecção na criação do local A, poderia ser o uso de galinhas (*Gallus gallus*) para a incubação dos ovos das patas, para aumentar a taxa de eclosão na fase de reprodução natural, desta forma após a eclosão dos ovos os filhotes que eram mantidos em gaiolas junto com as galinhas adultas, poderiam desta forma se infectarem, se estas estivessem infectadas. Este fato, já foi mencionado por Schulze et al., 2012, em que os autores relatam que a infecção de *Cryptosporidium baileyi* em um grupo de aves jovens (*Mergus serrator*) em um zoológico da Alemanha, poderia ter sido possivelmente através do convívio de outras espécies de aves jovens resistentes que conviveram juntos, assim como, também a introdução de *C. baileyi* através dos patos-reais adultos (*Anas platyrhynchos*), que foram utilizados para a incubação dos ovos de *Mergus serrator* para aumentar a taxa de eclosão, na fase de reprodução natural.

5.2 Diagnóstico Molecular

Após a realização da PCR primária de DNA, seguida da Nested-PCR foram observados amplicons com aproximadamente 830 pb, confirmando que a região do gene alvo 18S foi amplificada para *Cryptosporidium* spp. (XIAO et al., 2000). Estes dados comprovam que a PCR secundária é necessária para aumentar a sensibilidade, já que uma segunda amplificação aumenta a quantidade de DNA em pelo menos o dobro, e também por utilizar um par de primers específicos aumenta a sensibilidade da técnica da PCR (MORGAN, THOMPSON, 1998). Este resultado, confirma que houve amplificação do gene alvo 18S para *Cryptosporidium* sp. (XIAO et al., 2000).

Inibidores, principalmente compostos orgânicos, presentes em amostras complexas, tais como fezes e solos, podem diminuir a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes (WARD e WANG, 2001). A falha na ruptura dos oocistos durante a extração pode impedir a liberação do DNA para a análise, a adsorção do DNA por compostos presentes nas amostras e a presença de inibidores da PCR são problemas a serem superados pelos métodos de extração (SCORZA et al., 2003).

Neste estudo, os resultados das amostras selecionadas positivas diagnosticadas pela microscopia, foram compatíveis com resultados da Nested PCR e amplicons de todas as amostras selecionadas amplificaram na Nested- PCR.

Após as análises das sequências, neste estudo foi diagnosticada a espécie *Cryptosporidium baileyi*, esta tem sido relatada em várias ordens da classe das Aves, incluindo domésticas e silvestres (Anseriformes, Cathartiformes, Charadriiformes, Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Passeriformes, Piciformes, Psittaciformes, Strigiformes, Struthioniformes) (MORGAN et al., 2001; RYAN et al., 2003, CHVALA et al., 2006; NG et al., 2006; HUBER et al., 2007; Van ZEELAND et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009; MOLINA-LÓPEZ et al., 2010; SEVÁ et al., 2011; QI et al., 2011; WANG et al., 2011; COLDWELL et al., 2012; SCHULZE et al., 2012; WANG et al., 2012; BAROUDI et al., 2013; BOUGIOUKLIS et al., 2013; NAKAMURA et al., 2014; QI et al., 2014; WANG et al., 2014; LI et al., 2015; MÁCA, PAVLÁSEK, 2015).

As análises filogenéticas de *Cryptosporidium* spp., suportam a estrutura genética geral do gênero, com as espécies gástricas e as intestinais, formando grupos monofiléticos distintos, o que está de acordo com as características biológicas e especificidade de cada hospedeiro. No estudo da posição taxonômica dos isolados obtidos neste estudo, podemos observar que *Cryptosporidium baileyi* se agrupa no clade das espécies intestinais, ficando em um ramo diferente das espécies que apresentam sítios de localização somente no intestino.

A formação dos dois grupos principais, de espécies de *Cryptosporidium* gástricos e intestinais, parece ter ocorrido antes do surgimento de peixes e répteis, uma vez que em ambos os grupos de hospedeiros ocorrem nos dois tipos de grupos (XIAO et al., 2004).

Hospedeiros geneticamente relacionados muitas vezes albergam espécies semelhantes de *Cryptosporidium*, sugerindo a coevolução entre hospedeiro e parasito (XIAO et al., 2004 b). A formação das espécies do gênero *Cryptosporidium* aparentemente é o resultado da adaptação do parasito a diferentes hospedeiros, porém diferentes espécies de *Cryptosporidium* podem parasitar um mesmo hospedeiro, como ocorrem em *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. muris*, sugerindo que outros fatores podem levar à especiação (TANRIVERDI; WIDMER, 2006).

Em aves conforme já foi descrito por Santín (2013), a criptosporidiose se apresenta de três principais formas: respiratória, intestinal e renal, com manifestações clínicas ou subclínicas. Sendo que a espécie *Cryptosporidium baileyi*, tem sido associada principalmente a infecções respiratórias em aves de produção (LINDSAY, BLAGBURN, 1990; SRE'TER et al., 1995), atingindo também ouvido médio e mucosa da conjuntiva de aves silvestres, como corujas (*Otus scops*), andorinhas (*Petrochelidon pyrrhonota*), falcões (*Falco cherrug* e *Falco rusticolus*) e perdizes vermelho (*Lagopus lagopus scoticus*) (VAN ZEELAND et al., 2008; MOLINA-LOPEZ et al., 2010; COLDWELL et al., 2012; LEY et al., 2012; BOUGIOUKLIS et al., 2013; BAINES et al., 2014); bursa de Fabrício (SCHULZE et al., 2012; SRÉTER, VARGA, 2000) e rins (GARDINER, IMES 1984; RANDALL, 1986; NAKAMURA, ABE, 1988; LINDSAY, BLAGBURN, 1990; ABBASSI et al., 1999).

Infecções por *Cryptosporidium* foram detectadas em associação com doença clínica em aves domésticas, como galinhas (*Gallus gallus domesticus*) (BLAGBURN et al., 1991); gansos (*Anser anser*) (CHVALA et al., 2006); perus (*Meleagris gallopavo*) (GLISSON et al., 1984); patos (MASON, 1986); codornas (*Coturnix coturnix*), patos-reais (*Anas platyrhynchos*) (O'DONOGHUE et al., 1987); pavão (*Pavo cristatus*) (MASON; HARTLEY, 1980; O'DONOGHUE et al., 1987) e faisões (*Phasianus colchicus*) (RANDALL, 1986; O'DONOGHUE et al., 1987). Gomes et al., 2009, diagnosticaram infecção natural de *Cryptosporidium* spp., em aves domésticas (patos, pintos e codornas) comercializadas em mercados. Dentre as aves estudadas, a infecção em patos apresentou um maior patente, com altas concentrações de oocistos nas fezes, comparando a pintos e codornas, sendo que patos foram considerados como um possível importante disseminador de oocistos no ambiente.

Perdas econômicas estão relacionadas a criptosporidiose em aves domésticas, sendo estas associadas a diminuição do ganho de peso e produção de ovos (SRÉTER; VARGA, 2000; WANG et al., 2014).

Neste estudo, nenhuma das aves diagnosticadas positivas para a espécie *Cryptosporidium baileyi* apresentaram sinais clínicos da doença e o proprietário da criação não soube informar se as aves tinham queda na produtividade.

A transmissão cruzada natural de *C. baileyi* já foi documentada especialmente entre galinhas e perus, e algumas espécies de codornas e patos. Esta probabilidade de transmissão ocorre quando estas aves são criadas e mantidas em conjunto (LINDSEY et al., 1986; HAMIDINEJAT et al., 2014).

Na criação deste estudo (Local A), apesar de não ter sido realizado uma abordagem da infecção por *Cryptosporidium* em outras espécies de aves que eram criadas junto com os patos, esta possibilidade não deve ser descartada como uma forma de transmissão cruzada para os patos.

A infecção por via oral com oocistos de *Cryptosporidium baileyi* geralmente é subclínica, embora possa haver redução do ganho de peso de forma transitória (BLAGBURN et al., 1987; LEVY et al., 1988; MEIRELES et al., 1999). Após a infecção por via oral ou intratraqueal, *C. baileyi* coloniza a bursa de Fabricius, que apresenta ligeira hiperemia na mucosa, podendo reduzir a capacidade imunológica da ave acometida (SCOTT, 2004). Afetando principalmente a resposta humoral contra a doença de Marek (ABBASSI et al., 2000), a doença de Gumboro (LEVY et al., 1988), infecções por reovírus (GUY et al., 1988),

a doença de Newcastle (RHEE et al., 1998; ELADL et al., 2014), bronquite infecciosa (RHEE et al., 1998) e gripe aviária (HAO et al., 2008; ELADL et al., 2014).

A infecção por *C. baileyi*, desempenha um papel importante na patogênese de doenças respiratórias na produção de frangos de corte (*Gallus gallus*) e perdas de animais podem ser inesperadas. Ocorrendo duas manifestações diferentes deste tipo de patologia, um com envolvimento respiratório superior, que incluiu sinusite ("cabeça inchada"), e outro com envolvimento respiratório inferior que incluiu colonização dos sacos de traqueia, brônquios e pulmões, nesta última forma, ocorrendo uma maior as taxas de mortalidade. Os sinais e lesões graves são relatados e incluem exsudado mucoide excessivo nos sacos conjuntivais ou nasais, dos seios nasais e traqueia, hiperemia, seios edematosos, pulmões de coloração cinza vermelho manchado, sacos de ar nebuloso, atrofia da bursa de Fabrício, fígado alterado, baço inflamado, e emagrecimento (SRÉTER; VARGA, 2000; RYAN 2010). Nas infecções de localização no trato respiratório há possibilidades de associação com outros agentes etiológicos como já foi demonstrado em frangos (*Gallus gallus*), tais como *Escherichia coli* e o vírus da bronquite infecciosa, resultando em altos índices de mortalidade (BLAGBURN et al., 1987; GOODWIN, 1989; BLAGBURN et al., 1991; MEIRELES et al., 1999). A associação de *C. baileyi* com outros agentes infecciosos pode resultar em redução do ganho de peso entre as galinhas com índices elevados de mortalidade. Entre os agentes que podem apresentar sinergismo com *C. baileyi* são: vírus da doença de Marek (ABBASSI et al., 2000), vírus da anemia infecciosa das aves (HORNOK et al., 1998), o vírus da doença de Gumboro (LEVY et al., 1988) e reovirus (GUY et al., 1988).

Hamidinejat et al. (2014) no Irã entre 2012 e 2013 estudaram 1000 frangos (*Gallus gallus domesticus*), obtendo 1000 amostras fecais e 1000 amostras de traqueia. Estes autores obtiveram cinco amostras positivas para cada grupo (0,5% em cada), sendo que três amostras foram positivas simultaneamente nas fezes e na traqueia. Nenhuma ave apresentava distúrbios respiratórios e/ou gastrointestinais. *Cryptosporidium* spp. pode afetar o epitélio muco ciliar dos órgãos respiratórios reduzindo a imunidade inata e com isso facilitando situações que favoreçam a infecção por vírus (NILI; ASASI, 2002; HAMIDINEJAT et al., 2014).

Na China entre 2006 e 2007, Wang et al. (2012) realizaram uma análise com fezes de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) criadas em cativeiro para pesquisa de *Cryptosporidium*. Foram utilizadas 1818 amostras fecais, e 239 foram positivas (13,1 %), 237 foram caracterizadas como *C. baileyi*, as outras duas amostras foram identificadas como *C. meleagridis*. Em outro estudo realizado por Wang et al. (2014) com 385 amostras de frangos (*Gallus gallus*), 38 amostras foram positivas para o gênero *Cryptosporidium* sendo que 33 eram *C. baileyi*, duas *C. meleagridis* e três para o genótipo *Cryptosporidium* Avian II. Este estudo alertou sobre os riscos que este patógeno pode levar a economia local, pelo fato deste parasitismo diminuir a taxa de crescimento em frangos de corte (*Gallus gallus*) e diminuir a produção de ovos de galinhas poedeiras.

A importância da determinação dos vários aspectos da criptosporidiose como uma doença aviária é inegável. A criptosporidiose em aves de produção ainda merece ser mais estudado, possivelmente por ser uma doença subclínica ou por não apresentar uma clínica sugestiva, muitas vezes é uma patologia negligenciada, mas que gera perdas econômicas.

Além disso, não há diagnóstico de rotina para esta finalidade em criações industriais e em criações rústicas, é inexistente. Essas criações rústicas e de subsistência são comuns no Brasil e não existem registros ou conhecimento das condições higiênico sanitárias onde essas aves são criadas. Os patos são ditos como uma ave de grande rusticidade, conseqüentemente mais resistentes a várias doenças que acometem outras aves de produção, mas com relação às criptosporidioses, inexistem registros.

Mais estudos devem ser conduzidos para elucidação de fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp., em aves de produção já que os estudos existentes

englobam informações parciais sobre perdas econômicas, clínica, patologia e alguns aspectos epidemiológicos. A importância de *Cryptosporidium* em aves de produção tem sido focada na espécie que apresenta importância para a saúde pública (*Cryptosporidium meleagridis*) e não naquela que apresenta a importância em saúde em aves de produção (*Cryptosporidium baileyi*).

6. CONCLUSÕES

- Foi possível diagnosticar a infecção natural por *Cryptosporidium* spp. pela observação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. mediante diagnóstico microscópico em amostras fecais de patos domésticos (*Cairina moschata*) de uma criação rústica
- Após a utilização de técnicas moleculares em amostras positivas pela microscopia, utilizando como gene alvo o 18S, foi identificada a espécie *Cryptosporidium baileyi*.
- Este é o primeiro registro de *Cryptosporidium baileyi* em patos da espécie *Cairina moschata* no Rio de Janeiro, Brasil. Apesar de ser uma espécie não zoonótica, adquire a sua importância em hospedeiros na classe das aves.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABASSI H.; WYERS, M.; CABARETE, J.; NACIRI, M. Rapid detection and quantification of *Cryptosporidium baileyi* oocysts in feces and organs of chickens using a microscopic slide flotation method. *Parasitology Research*, v. 86, p. 179-187, 2000.

ABASSI, H.; COUDER, T. F.; DAMBRINE, G.; CHÉREL, Y.; NACIRI, M. M. Effect of *Cryptosporidium baileyi* in specific pathogen free chickens vaccinated (CVI988/ Rispens) and challenged with HPRS-16 strain of Marek's. *Avian Pathology*, v. 29, n.6, p. 623-634, 2010.

ABBASSI, H.; COURDERT, F.; CHEREL, Y.; DAMBRINE, G.; BRUGERE-PICOUX, J.; NACIRI, M. Renal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) in specific-pathogen-free chickens experimentally coinfecting with Marek's disease virus. *Avian Diseases*, v. 43, p.738–744, 1999.

ABE, N.; MAKINO, I. Multilocus genotypic analysis of isolates from cockatiels, Japan. *Cryptosporidium*, *Parasitology Research*, v.106, n.6, p.1491-1497, 2010.

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, n. 6, p. 523–526, 2004.

AMAR, C. F.; EAST, C. L.; GRAY, J.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MACLURE, E. A.; MCLAUCHLIN, J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 fecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). *European journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v.26, n. 5, p.311-323, 2007.

AMIN, O. M. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 6, p. 799-803, 2002.

ANGUS, K. W. Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 76, n. 1, p. 62-70, 1983.

ANTUNES, R. G.; SIMÕES, D. C.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Natural 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, n.4, p. 702-705, 2008.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – status and future needs. *Trends in Parasitology*, v.21 n.8, 2005.

ARROWOOD, M.J. Diagnosis. In: Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Boca Raton*, p. 43–64.1997.

AVICULTURA INDUSTRIAL. Industrialização de patos e marrecos. 2005. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/industrializacao-de-patosm-arrecos/20051206-112105-1545>. Acesso em: 7 dez. 2016.

BAROUDI, D.; KHELEF, D.; GOUCEM, R.; ADAMU, K. 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.

BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C. A. The development and performance of a simple, sensitive method form the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces, *Journal of Hygiene*, v.93, n.2, p. 317-23, 1984.

BEHZAD, I. M. A.; RAZAVI, S. M.; YAZDANPOOR; GANDOMANI, T. A. M; AMADON, M. J. Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in Ostriches (*Struthio Camelus*) in Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, v.12, n 1, p. 55-61, 2009.

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

BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; HOERR, F. J.; ATLAS, A. L.; TOIVIOKINNUCAN, M. *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Steganoplura bella* Passeriformes, Estrildidae). *Avian Diseases*, v. 34, n.1, 1027–1030, 1990.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Criptosporidiose: uma revisão sobre a sua implicação na conservação dos mamíferos aquáticos. *Biota Neotropica*, v.7, n.3, p. 091-096, 2007.

BOUGIOUKLIS, P. A.; WEISSENBOCK, H.; WELLS, A.; MILLER, W. A.; PALMIERI, C.; SHIVAPRASAD, H. L. Otitis Media Associated with *Cryptosporidium baileyi* in a Saker Falcon (*Falco cherrug*). *Journal Comparative Pathology*, v.148, n. 4, p. 419-423, 2013.

BOUZID, M.; HUNTER, P. R.; CHALMERS, R. M.; TYLERA, K. M. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, v.26, n.1, p. 115-134, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde; Secretária de Vigilância em Saúde Epidemiologia e Serviços de Saúde. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil*, v.13, n.2 p. 79-92. 2004.

CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitology*, v. 21, p. 430–437, 2005.

CARDOSO, 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, n.3, p. 119-124, 2005.

- CARPENTER, C.; FAYER, R.; TROUT, J.; BEACH, M. J. Chlorine Disinfection of Recreational Water for *Cryptosporidium parvum*. *Emergency Infectology Disiese*, v.5, n.4, p. 579–584, 1999.
- CASANAVA, S.; VERDES, J. M.; OKADA, K. *Cryptosporidium* spp. in bursa of Fabricius of broiler chickens from Uruguay. *Cryptosporidium* spp. em bursa de Fabrícus de frangos de corte no Uruguai, *Ciências Rural*, v. 45, n. 1, 2015.
- CASEMORE, D. P. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiology Infectology*, v.104, n. 1, p. 1-28, 1990.
- CAUSAPÉ, A. C.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; DEL, C. E.; LÓPEZ-BERNAD, F. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in Lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, v. 104, n. 4, p. 287–29, 2002.
- CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitology*, v. 124, n. 1, p. 138–146, 2009.
- CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; LANGER-CURRY, R.; WINDER, G. ; AKIYOSHI, D. E.; TANRIVERDI, S.; TZIPORI, S. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n.8, p. 851–857, 2006.
- CHAVALA, S.; FRAGNER, K.; HACKL, R.; HESS, M.; WEISSENB, H. *Cryptosporidium* Infection in Domestic Geese (*Anseranser f. domestica*) Detected by In-situ Hybridization. *Science Direct*. v. 134, p. 211-218, 2006.
- CHECKLEY, W.; WHITE, C.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M. J.; CHALMERS, R. M.; CHEN, X. M., et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics and vaccine targets for cryptosporidiosis. *Lancet Infectology Disiese*, v.15, n. 10, p. 85–94, 2014.
- CHELLADURAI, J. J.; CLARK, M. E.; KVÁC, M.; HOLUBOVÁ, N.; KHAN, E.; STANGER, B. L. S. ; GIDDINGS, C. W. ; MCEVOY, J. *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium avian* genotype VI in North American red-winged black birds (*Agelaius phoeniceus*). *Parasitology Research*, v. 115, n.2, p.1901–1906, 2016.
- CLODE, P. L.; KOH, W.; THOMPSON, R. C. A. Opinion Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? *Trends in Parasitology*, v.31, n. 12, p. 614-624. 2015.
- COCO, V. F. D.; CÓRDOBA, M. A.; BASUALDO, J. A. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista Argentina de Microbiologí*, v.41, n.3, p. 185-196, 2009.
- COETZEE, N.; EDEGHERE, O.; ORENDI, J. M.; CHALMERS, R.; MORGAN, L. A swimming pool-associated outbreak of cryptosporidiosis in Straffordshire, England. *Eurosurveillance*, v. 14, n. 1, p.1–3, 2008.
- COLLINET-ADLER, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis environmental, therapeutic, and preventive challenges. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 29, n.8, p. 927–935, 2010.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi*, n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chickens. *Journal of Protozoology*, v.33, n.2, p.289, 1986.

CURRENT, W.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 4, n. 3, p. 325–358, 1991.

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 Zoo Wildl Med*, v. 46, n. 4, p. 934–937, 2015.

DONNA, E. A.; DILO, J.; PEARS, C.; CHAPMAN, S.; TUMWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of Human Origin Passaged through Different Host Species. *American Society for Microbiology*, v. 71, n. 4, p.1828- 1832, 2003.

DUHAIN, G. L. M. C.; MINNAAR. A. ; BUYS, E. M. Effect of chlorine, blanching, freezing, and microwave heating on *Cryptosporidium parvum* viability inoculated on green peppers. *Journal of Food Protection*, v.75, n.5, p 936-941, 2012.

EGYED, Z.; SRÉTER, T.; SZÉLL, Z.; BESZTERI, B.; DOBOS-KOVÁCS, M.; MÁRIALIGETI, K.; CORNELISSEN, A.W.C.A.; VARGA, I. Polyphasic typing of *Cryptosporidium baileyi*: a suggested model for characterization of cryptosporidia. *Journal Parasitology*, v. 88, n. 2, p. 237–243, 2002.

ELWIN, K.; HADFIELD, S. J. ; ROBINSON, G. ; CROUCH, N. D. ; CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *International Journal for Parasitology*, v. 42, n.7, p. 675-682, 2012.

FALL, A.; THOMPSON, R. C.; HOBBS, R. P.; RYAN, U. M. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *Journal of Parasitology*, v. 89, n. 2, p. 399–402, 2003.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. *Microbiological Risk Assessment Series*, v. 23, p.302.

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

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, v.30, n. 2, p.1305-1322, 2000.

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. C. A. The general biology of *Cryptosporidium*. In *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, FAYER. Press, Boca Raton, p.1-60, 1997.

FAYER, R.; XIAO, L.; *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2. ed. Boca Raton, 2007.

FENG, Y.; ALDERISIO, K. A.; YANG, W.; BLANCERO, L. A.; KUHNE, W. G.; NADARESKI, C. A.; REID, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 6475–6483, 2007.

FENG, Y.; *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 128–137, 2010.

FENG, Y.; DEAREN, T.; CAMA, V.; XIAO, L. 90-Kilodalton Heat Shock Protein, Hsp90, as a Target for Genotyping *Cryptosporidium* spp. Known To Infect Humans. *Eukaryotic Cell*, v.8, n. 4, p. 478–482. 2009.

FERGUSON, C.; DEERE, D.; SINCLAIR, M.; CHALMERS, R.M.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; XIAO, L.; RYAN, U.; GASSER, R.; EL-OSTA, Y.A.; STEVENS, M. Meeting report: application of genotyping methods to assess risks from *Cryptosporidium* in watersheds. *Environmental Health Perspectives*, v.114, n.3, p. 430–434, 2006.

FIGUEROLA, J.; GREEN, A. J. A comparative study of egg mass and clutch size in the Anseriformes. *Journal Ornithology*, Sevilla, n. 147, p. 57-68, 2006.

GALLAHER, M. M.; HERNDON, J. L.; NIMS, L. J.; STRELING, C. R.; GRABOWSKI, D. J.; HULL, H. J. F. Cryptosporidiosis and surface water. *American Journal of Public Health*, v.79, n.1, p. 39-42, 1989.

GALVAN, A.L.; A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. *Science Total Environmental*, p. 468–469, 2014.

GARCIA, L. S., SHIMIZU, R.Y.; Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *Journal Clinical Microbiology*, v. 38, p.1267–1268, 2000.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 1526–1529, 1997.

GARDINER, C. H.; IMES JR. 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.

GASSER, R.B. Molecular tools — advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology*, v, 136, p. 69–89, 2006.

GOMES, R.S.; BOMFIM, T.C.B.; HUBER, F. Infecção natural por *Cryptosporidium* sp. em aves domésticas comercializadas em mercados municipais do Estado do Rio de Janeiro. *Ciência Rural Santa Maria*, v.39, n.7, p.2128-2134, 2009.

GOODWIN, M. A.; WALTMAN, W. D. Transmission of *Eimeria* viruses, and bacteria to chicks. Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. *Journal Applied Poultry Research*, v. 5, n. 1, p. 51–55, 1996.

- GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; FAYER, R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts other than *Cryptosporidium parvum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 53, p. 274-279, 1996.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symp.*, v.41, p.95-98, 1999.
- HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.M.; BEVILACQUA, P.D.; BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M., et al. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v.13, n. 2, p.79-92, 2004.
- HENRIKSEN, S. A, POHLENZ, J. F. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand*, v. 22, p.594-596, 1981.
- HOLUBOVÁ, N; SAK, B.; HORCICKOVÁ, M.; HLASKOVÁ, L.; KVETONOVA, D.; MENCHACA, S.; MCEVOY, J.; KVEC, M. *Cryptosporidium avium*. *Parasitology Research*, v. 115, p.2243, 2016.
- HUBER, F.; da SILVA, S.; 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.165-174, 2007.
- HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C. A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p. 1181–1190. 2005.
- IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DE RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Instrução Normativa n.141, 9 de dezembro, 2006. *Diário Oficial da União, Brasília, 20 de dezembro de 2006*.
- JELLISON K.L.; DISTEL, D. L.; HEMOND, H. F.; SCHAUER, D. . 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. *Applied Environmental Microbiology*, v. 70, n. 1, p. 452-458, 2004.
- JIANG, J.; ALDERISIO, K.A.; XIAO, L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied. Environmental Microbiology*, v. 71, p 4446–4454, 2005.
- JOHNSTON, S. P.; BALLARD, M. M.; BEACH, M. J.; CAUSER, L, WILKINS, P. P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal Clinical Microbiology*, v. 41 n. 2, p. 623-6226, 2003.
- KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health*, v. 5, p.1–38, 2007.

- KIK, M. J. L.; VAN- ASTEN, A. J. A. M.; LENSTRA, J.A.; KIRPENSTEIJN, J. Cloaca prolapse and cystitis in green iguana (*Iguana iguana*) caused by a novel *Cryptosporidium* species. *Veterinary Parasitology*, v. 175, n. 2, p.165-167, 2011.
- KING, B. J.; HOEFEL, D.; DAMINATO, D.P.; FANOK, S.; MONIS, P. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *Journal Applied Microbiology*, v. 104, n. 5, p.1311-1323, 2007.
- KIMURA, A.; SUZUKI, Y.; MATSUI, T. Identification of the *Cryptosporidium* isolate from chickens in by sequence analyses. *Journal of Veterinary Medical Science*. v.66, p. 879–881, 2004.
- KOOMPAPONG, K.,; SUKTHANA, Y. Seasonal variation and potential sources of *Cryptosporidium* contamination in surface waters of Chao Phraya River and Bang Pu Nature Reserve pier, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 43, n.4, p. 832–840, 2012.
- KVAC, M.; KESTRANOVA, M.; PINKOVA, M.; KVETONOVA, D.; KALINOVA, J.; WAGNEROVA, P.; et al. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*, v.191, n. 3 p. 218–227, 2013.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P., et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, v. 23, p. 2947–2948, 2007.
- LAXER, M. A.; TIMBLIN, B. K.; PATEL R. J. DNA sequencing for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45 (6), 688-694, 1991.
- LEVY, M. G.; LEY, D. H.; BARNES, H. J.; GERING, T. M.; CORBETT, W. T. Experimental cryptosporidiosis and infectious bursal disease virus infection of specific pathogen-free chickens. *Avian diseases*, v. 32, n. 4, p. 803-811.1988.
- LI, J. ; LIN, X. ; ZHANG, L. ; QI, N. ; LIAO, S. ; MINNA, L.V. ; et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in Guangdong Province, Southern China. *Parasitology Research*, v. 114, n.6, p.2237, 2015.
- LI, N.; XIAO, L. ALDERISIO, K.; ELWIN, K.; CEBELINSKI, E.; CHALMERS, R.; et al. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases*, v. 20, n. 2, p. 217–224, 2014.
- 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*, 49, 1412–4, 1988.
- LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; ENERST, J. A. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in chickens. *Journal for Parasitology*, v.73, n.1, p. 242-244, 1987.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B.L.; HOERR, F.J. Small intestinal cryptosporidiosis in cockatiels associated with *Cryptosporidium baileyi*-like oocysts. *Avian Disese*, v.34, n. 3, p.791-793, 1990.

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; SUNDERMANN, C. A.; HOERR, F. J.; ERNEST, J. A. Experimental *Cryptosporidium* infection in chickens. *American Journal of Veterinary Research*, v. 47, p. 876–879, 1986.

LIU, H.; SJHEN, Y.; YIN, J.; JIANG, Y.; XU, Y.; PAN, W.; et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China. *BMC Infectious Diseases*, v.14, p 1471- 2334, 2014.

LOUIE, K.; GUSTAFSON, L.; FYFE, M.; GILL, I.; MACDOUGALL, L.; TOM, L.; WONG, Q.; ISAAC-RENTON, J (2004). An outbreak of *Cryptosporidium parvum* in a Surrey pool with detection in pool water sampling. *Canada Communicable Disease Report*. V.30, p 61-66, 2004.

LUNA, S. ; REYES, L.; CHINCOILA, M.; CATARINELLA,G, *et al.*, 2002. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en aguas superficiales en Costa Rica. *Parasitologia Latinoamericana*, v. 57, p. 63-65, 2002.

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

MÁCA, O.; PAVLÁSEK, I. First finding of spontaneous infections with *Cryptosporidium baileyi* and *C. meleagridis* in the red-legged partridge *Alectoris rufa* from an aviary in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, v. 209, n 3- 4, p. 164-168. 2015.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M.S. BLAIR, K.A.; et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, v.31, n. 3, p.161–167, 1995.

MAHMOUDI, M.R.; KAZEMI, B.; MOHAMMADIHA, A.; MIRZAEI, A.; KARANIS, P. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts by IFA, PCR and LAMP in surface water from Rasht, Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.107, n.8, p. 511-517, 2013.

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 Disease*, v.54, n.3, p. 1102-1107. 2010.

MEIRELES, M.V.; SOARES, M.M.; GENNARI, S.M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *Journal Parasitology*, v. 92, n.3, p. 623-626. 2007.

MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, v.70, n.6, p.1156-60, 1976.

MEULEN, C. J.; DIKKEN, G. Criação de patos nas regiões tropicais. Agrodok 33. Wageningen: *Fundação Agromisa*, p. 96, 2003.

MOLINA-LÓPEZ, R. A.; RAMIS, A.; MARTÍN-VAZQUEZ, S.; GÓMEZ-COUSO, H.; ARES- MAZÁS, E.; CACCÍO, S.M.; LEIVA, M.; DARWICH, L. *Cryptosporidium baileyi* infection associated with an outbreak of ocular and respiratory disease in otus owls (*Otus scopsin*) a rehabilitation center. *Avian Pathology*, v.39, n. 3, p. 171-176. 2010.

MORENS, D.M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. Review article the challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, v. 430, p. 242-249, 2004.

MORGAN, U. M.; MONIS, P .T.; XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.; O'DONOGHUE, P.; GASSER, R.B.; MURRAY, A.; FAYER, R.; BLAGBURN, B. L.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. A. Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *International Journal Parasitology*, v. 31, n.3, p. 289-296, 2001.

MORGAN, U. N.; THOMPSON, R. C. A. PCR detection of *Cryptosporidium*, the way forward? *Parasitology Today*, v. 14, n 2, p. 241-245, 1988.

MULLER, J.; HEMPHILL, A. In vitro culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *International Journal for Parasitolog*, v.43, n. 2, p. 115-124, 2012.

NA, L.; NEUMANM, N. F.; RUECKER, N.; ALDERISIO, K. A.; STURBAUNG, G. D.; VILLEGAS, E. N; CHALMERS, R.; MONIS, P.; FENG, Y.; XIAO, L. Development and Evaluation of Three Real-Time PCR Assays for Genotyping and Source Tracking *Cryptosporidium spp.* in Water. *Applied Environmental Microbiology*, v.81, n.7, p.5845-5854 2015.

NAKAMURA, A, A.; HOMEN, C. G.; SILVA A. M. J.; MEIRELES, M. V. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. *Veterinary Parasitology*, v.205, n. 2, p. 7-13, 2014.

NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. *Braz. J. Veterinary Parasitology*, v.24 n.3, p.253-267, 2015.

NAKAMURA, A.; SIMÕES, D. C.; ATUNES, R. G.; 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.

NAKAMURA, K.; ABE, F. Respiratory (especially pulmonary) and urinary infections of *Cryptosporidium* in layer chickens. *Avian Pathology*, v.17, n.3, p. 703-711, 1988.

NANNINI, E. C.; OKHUYSEN, P. C. HIV1 and the gut in the era of highly active antiretroviral therapy. *Current Gastroenterology Reports*, v. 4, n 5, p.392- 398, 2002.

NEWMAN, R. D.; WUHIB, T.; LIMA, A. M ; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in Northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 49, p. 270-275, 1993.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from Avian Hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n 12, p. 7548–7553. 2006.

NG, J.S.Y.; RYAN, U.; TRENGOVE, R. D.; MAKER, G. L. Development of an untargeted metabolomics method for the analysis of human faecal samples using *Cryptosporidium*-infected samples. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 185, n. 2, p. 145-150, 2012.

NGUYEN, S .T. ; FUKUDA, Y.; TADA, C.; SATO, R.; HUYNH, V. V.; NGUYEN, D. T.; NAKAI,. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in pigs in central Vietnam. *Parasitology Research*, v. 112, n.1, p.187–192, 2013.

NICHOLS, R. A.; CONELLY, L.; SULLIVAN, C. B.; SMITH, H. V. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring period. *Applied Environmental Microbiology*, v. 76, n. 17, p.:5977–5986, 2010.

NIME F. A.; BUREK J. D.;PAGE D. L.; YARDLET J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology Reports*, v.70, n.4, p. 592-598, 1976.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. *International Journal for Parasitology*, v. 25. n. 2, p. 139-195, 1995.

OIE (Officie International des Epizooties). Cryptosporidiosis Chapter. IN: *Terrestrial Manual*. 1192-1211, 2008.

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 Infectious Disiese*, v. 180, p.1275–1281, 1999.

OMS Organização Mundial da Saúde *Cryptosporidium*: Guidelines for Drinking Water Quality. WHO, 2006. http://www.who.int/water_sanitation_health/publication/2011/dwq-guidelines/en/index.html. Acesso em: 26 out. 2016.

PAGÈS-MANTÉ, A.; PAGÈS-BOSCH, M.; MAIÓ-MASFERRER, N.; GÓMES-COUSO, H.; ARES-MAZÁS, E. An outbreak of disease associated with cryptosporidia on a red-legged partridge (*Alectoris rufa*) game farm. *Avian Pathology*, v. 36, n. 4, p. 275-278, 2007.

PAINTER, J. E.; HLAVSA, M. C.; COLLIER, S. A.; XIAO, L.; YODER, J. S. Cryptosporidiosis Surveillance — United States, *Surveillance Summaries*, v. 64, p. 1-14, 2015.

PANCIERA R. J.; THOMASSEN, R. W.; GARNER, F. M. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, v. 8, p.479-484, 1971.

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

PAVLÁSEK, I. Findings of Cryptosporidia in the stomach of chickens and of exotic and wild birds. *Veterinarstvi (Czech Republic)*, v. 51, p. 103–108, 2001.

PAVLÁSEK, I. The black-headed gull (*Larus ridibundus* L.) a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Veterinarni Medicina*, v.38, n.10, p. 629–638, 1993.

PEREIRA, C. R. A.; FERREIRA, A. P.; KOIFMAN, R. J. Detecção de *Cryptosporidium parvum* em alfaces frescas para consumo cru. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. *Gaia Scientia*. v.8 p.31-36; 2008.

PETRY, F. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, n.5, p. 586–601, 2004.

POHJOLA, S. S. ; OKSANEN, H. ; NEUVONEN, E.; et al. Certain enteropathogens in calves of finish dairy herds with recurrent out breaks of diarrhea. *Prev Vet Med, Amsterdam*, v.3, n.6, p.547-558, 1986.

PULESTON, R.L.; MALLAGHAN, C.M.; MODHA, D. E.; HUNTER, P. R.; et al. The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium cuniculus* (formerly rabbit genotype), following a water quality incident. *Journal of Water Health*, v. 12, n. 1, p. 41–50, 2014.

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, n. 4, p. 336–340, 2011.

QUAH, J. X.; AMBUS, S.; LIM, Y. A. L.; MAHDY, M. A. K.; et al. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* from avian hosts. *Parasitology*, v. 138, n. 5, p. 573-577, 2011.

QUINTERO-BETANCOURT, W. E.; PEELE, E. R.; ROSE, J. B. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *Journal of Microbiological Methods*, v. 49, n 3, p. 209-224. 2002.

RAMIREZ, N.E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, v. 6, n. 8, p. 773-785, 2004.

RANDALL, C. J. Conjunctivitis in pheasants associated with cryptosporidial infection. *Veterinary Record*, v.118, n.8, p. 211. 1886.

RASKOVÁ, V. ; KVETONOVÁ, D.; SAK, B. et al. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *Journal Clinical. Microbiology*, 51, p.360-362, 2013.

ROBERTSON, L.; CAMPBELL, A. T.; SMITH, H. V.A.N.; et al. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n. 3 p.494-3.500, 2007.

ROBERTSON, L. J.; CASAERT, S.; VALDEZ-NAVA, Y.; EHSAN, M. A.; CLAEREBOU, E. Drying of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts to slides abrogates use of vital dyes for viability staining. *Journal of Microbiological Methods*, v. 96, p. 68-69, 2014.

ROBERTSON, L. BJÖRKMAN, C.; AXÉN, C.; FAYER, R. Cryptosporidiosis in farmed animals. In *Cryptosporidium: Parasite and Disease* (ed. Caccio, S. M. and Widmer, G.), Springer-Verlag, Wien, pp. 149–235, 2014.

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

RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I. M.; et al. A redescription of *Cryptosporidium gallis* PAVLASEK, 1999 (Apicomplexa: CRYPTOSPORIDIIDAE) from birds. *Journal Parasitology*, v. 89, n.4, p. 809-8013, 2003.

RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A. A.; PAVLÁSEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied Environmental Microbiology*, v. 69, n. 7, p. 4302-4307, 2003.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, 2014.

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

RYAN, U.; POWER, M. *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology*, v. 139, n. 13, p. 1673-1688, 2012.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I.M., MONIS, P., LAL, A. A. FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa Cryptosporidiidae) from birds. *American Society of Parasitologists*, v. 89, n.4, p. 809–813, 2003.

SANTÍN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand veterinary journal*, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2013.

SANTOS, M. M. A. B.; PEIRÓ, J.R.; MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: Clinical, Morphological and Molecular Studies. *Revista Brasileira de Ciências Avícolas*, v. 7, n.2, p.113 – 117, 2005.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v. 36, p. 266-275, 1923.

SCHULZE, C.; KÄMMERLING, J.; KUTZER, P.; ENGELHARDT, A.; RICHTER, B. *Cryptosporidium baileyi*-infection in Red-breasted Merganser (*Mergus serrator*) ducklings from a zoological garden. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift, Berlin*, v. 125, n. 9-10, p. 428-431, 2012.

SCORZA, A. V.; BREWER, M. M.; LAPPIN, M. R. Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Cryptosporidium* spp. in Cat Feces. *Journal of Parasitology*, v. 89, n. 2, p. 423-426, 2003.

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.
- SHIRLEY, D. A. T.; MOONAH, S. N.; KOTLOFF, K. L. Burden of disease from Cryptosporidiosis. *Current Opinion in Infectious Disease*, v.25, n.5, p. 555-563, 2012.
- SILVA, D.; HOMEN, C. G.; NAKAMURA, A.; TEIXEIRA, W. T. S. H. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. *Parasitology Research*, v.107, n. 2 p.271–277, 2010.
- SLAPETA, 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 and therapeutics*, v. 65, n. 20, p. 262-266, 1955.
- SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, v. 149, n. 2, p. 29–40, 2007.
- SMITH, H. V.; GRIMASON, A.M. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, v. 2, p. 695-756, 2003.
- SMITH, J. L. *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. *Journal of Food Protection*, v. 56, n.5, p.451- 461, 1993.
- SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today* v. 14, p. 14-22.
- SPANO, F.; CRISANTI, A. *Cryptosporidium parvum*: the secrets of the small genome. *International Journal of Parasitology Parkville*, v. 30, p. 553-565, 2000.
- SRÉTER, T. S; KOVACS, G.; SILVA, A. J.; PIENIAZEK, N. J; SZÉLL, Z.; KOVÁCS, M. D.; MARIALIGETI, K.; VARGA, I. Morphologic, Host Specificity, and Molecular Characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* Isolate. *Applied and environmental microbiology*, v.66, n.2, p. 735-738, 2000.
- SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds – A review. *Veterinary Parasitology*, v.87, n. 4, p.261-279, 2000.
- SRÉTER, T.; VARGA, I.; BÉKESI, L. Effects of bursectomy and thymectomy on the development of resistance to *Cryptosporidium baileyi* in chickens. *Parasitology Research*, v.82, n. 2, p.174-177, 1996.
- SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *Journal Parasitology*, v. 88, p.388–394, 2002.
- SULAIMAN, I. M.; MORGAN, U M.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A.A.; XIAO, L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, n.6, p. 2385–2391, 2000.

TAMBURRINI, A.; POZIO, E. Long term survival of *Cryptosporidium* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Journal. Parasitology*, v. 29, p. 711-715, 1999.

TANAKURA, K.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n.10, p. 2731–2739, 2011.

THOMPSON, R. C. A. ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 40, p. 315–323. 2016.

TORGERSON, P. R.; MACPHERSON, C. N. L. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses. *Veterinary Parasitology*, v. 182, n.1, p. 79-95. 2011.

TRAMPEL, D. W.; PEPPER, T. M.; BLAGBURN, B.L. Urinary Tract Cryptosporidiosis in Commercial Laying Hens. *Avian Diseases*, v. 44, n.2, p. 479-484, 2000.

TUMOVÁ, E.; SKRIVAN, M.; MAROUNEK, M.; PAVLASEK, I.; LEDVINKA, Z. Performance and oocyst shedding in broiler Chickens orally Infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Avian Diseases*, v. 43, p. 203-207. 2002.

TYZZER, E. E. Coccidiosis in gallinaceous birds. *American Journal of Hygiene*, v.10, n. 2, p.269-383, 1929.

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

TZIPORI, S.; ANGUS, K. W.; CAMPBELL, I. GRAY, E.W. *Cryptosporidium* evidence for a single-species genus. *Infectology and Immunity*, v. 30, n. 3, p. 884-886, 1980.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, v.4, V. 10, p.1047-1058, 2002.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 1047-1058, 2004.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology, London*, v. 24, n.4, p. 184-189, 2008.

VAN DYKE, M.I.; ONG, C. S.; PRYSYAJECKY, N. A.; et al. Identifying host sources, human health risk and indicators of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural activities. *Journal of Water and Health*, v. 10, n.2, p.311–323, 2012.

VAN ZEELAN, Y. R. A.; SCHOEMAKER, N. J.; KIK, M. J. L.; VAN DER GIESSEN, J. W. B.; et al. Upper respiratory tract infection caused by *Cryptosporidium baileyi* in three mixed-bred falcons (*Falco rusticolus x Falco cherrug*). *Avian Disiese*, v. 52, n. 2 p.357-363, 2008.

VIEIRA, J. F. *Animais domésticos: origem, manejo, sanidade, alimentação e importância econômica*. Clube dos autores, p.208, 2012.

WALDRON, L. B.; DIMESKI, B.; BEGGS, P. J. Beggs. Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Applied Environmental Microbiology*, v. 77, p. 7757–7765, 2011.

WANG, L. ; XUE, X. ; LI, J. ; et al. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. *Parasite; Les Ulis*, v. 21, p.36, 2014.

WANG, R.; JIAN, F. ; SUN, Y. HU, Q. ; et al. Large-scale survey of *Cryptosporidium* spp. in chickens and Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Henan, China: prevalence and molecular characterization. *Avian Pathology*, v.39, n. 6, p. 447-451, 2010.

WANG, R.; QI, M.; JINGJING, Z., NING, C. ZHANG, L.; XIAO, L.; ZHAO, J. Prevalence of *Cryptosporidium baileyi* in ostriches (*Struthio camelus*) in Zhengzhou, China. *Veterinary Parasitology*, v.175, n. 2, p. 151-154, 2011.

WANG, R.; QI, M.; JINGJING, Z.; SUN, D.; et al. Prevalence of *Cryptosporidium baileyi* in ostriches (*Struthio camelus*) in Zhengzhou, China. *Veterinary Parasitology*, v.175, n.2, p. 151-154, 2011.

WANG, R.; WANG, F.; ZHAO, J.; QI, M.; NING, C.; ZHANG, L.; XIAO, L. Zhang, L. *Cryptosporidium* spp. in quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Henan, China: Molecular characterization and public health significance. *Journal Veterinary Parasitology*, v.187, n. 3-4, p. 534-537, 2012.

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* from frozen feces for PCR. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 41, n. 2, p.37-42, 2001.

WIDERSTRÖM, M.; SCHONNING, C.; LILJA, M.; et al. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerging infectious*, v 20, p. 581-589, 2014.

WIDMER, G.; SULLIVAN, S. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunology*, v. 34, p.61-71, 2012.

XIAO L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology*. v. 124, n. 1, p. 80–89, 2010.

XIAO, L. SULAIMAN, I.; FAYER, R.; LAL, A. A. Species and Strain-specific Typing of *Cryptosporidium* Parasites in Clinical and Environmental Samples. *Memórias. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 93, n. 5, p. 687-692, 1998.

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

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied Environmental Microbiology*, v. 65, n. 4, p.1578–1583, 1999.

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.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, n.1, p72-97, 2004.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic Cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v.52, n. 3, p. 309-326, 2008.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; et al. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal Parasitology*, v. 32, p.1773-1785, 2002.

XIAO, S.; AN, W.; CHEN, Z.; ZHANG, D.; YU, J.; YANG, M. The burden of drinking water-associated cryptosporidiosis in China: the large contribution of the immunodeficient population identified by quantitative microbial risk assessment. *Water Research*, v. 46, n. 13, p. 4272–4280, 2012.

YANG, R.; JACOBSON, C. ; GARDNER, G. ; et al. Longitudinal prevalence, oocyst shedding and molecular characterization of *Cryptosporidium* species in sheep across four states in Australia. *Veterinary Parasitology*, v. 200, n.2, p.50–58, 2014.

YANG, W.; CHEN, P.; VILLEGAS, E. N.; LANDY, R. B.; KANETSKY, C.; CAMA, V.; BROWN, M. H. *Cryptosporidium* source tracking in the Potomac River watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 21, p. 6495-6504, 2008.

YODER, J. S.; WALLACE, R. M.; COLLIER, S. A. et al. Cryptosporidiosis surveillance - United States, 2009-2010. *Surveill. Summ.* v.61, p.1-12, 2012.

ZAHEDI, A.; PAPANINI, A.; JIAN, F.; ROBERTSON, I.; RYAN, U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology Parasites and Wildlife*. v. 5, n. 1, p.88-109, 2016.

ZHOU, L.; KASSA, H.; TISCHLER, M. XIAO, L. Host-Adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada Geese (*Branta canadensis*). *American Society for Microbiology*, v.70, n.7, p. 4211-4215, 2004.

ZIEGLER, P. E.; WADE, S. E.; SCHAAF, S. L.; et al. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, v. 43, n. 2, p.586–596, 2007.

ZYLAN, K.; BAILEN, T.; SMITH, H. V.; et al. An outbreak of cryptosporidiosis in a collection of Stone curlews (*Burhinus oedicanus*) in Dubai. *Avian Pathology*, v.37, n. 5, p. 521-526, 2008.