



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ADAMANTINA

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

PIBIC/CNPq/UNIFAI - 2017-2018

Projeto de Pesquisa - Edital 011/2017 – NPP/UNIFAI

THAYS MARONEZI DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM AMOSTRAS FECAIS DE ANIMAIS
DOMÉSTICOS DA REGIÃO NOROESTE PAULISTA**

ADAMANTINA – SP

JUNHO - 2017

THAYS MARONEZI DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM AMOSTRAS FECAIS DE ANIMAIS
DOMÉSTICOS DA REGIÃO NOROESTE PAULISTA**

Projeto de Pesquisa para o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Centro Universitário de Adamantina - PIBIC/CNPq/UNIFAI (2017-2018).

ORIENTADOR: PROF. Dr. HEITOR FLAVIO FERRARI

CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA

COLABORADORES: PROF^a. Me. REGINA EUFRÁSIA DO NASCIMENTO RUETE

PROF. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Área: Ciências Agrárias

Processo FAPESP número 15/26334-8

ADAMANTINA – SP

JUNHO - 2017

RESUMO

A criptosporidiose já foi descrita em várias espécies animais, incluindo mamíferos e aves domésticos e o homem. Várias espécies do parasita já foram classificadas nas diversas espécies animais e no homem e algumas podendo infectar ambos, sendo dessa forma considerada uma enfermidade de caráter zoonótico. Vários métodos de diagnóstico são utilizados para detecção do parasito, mas somente aqueles com base em biologia molecular são capazes de determinar a espécie de *Cryptosporidium*. Não há dados de ocorrência e prevalência da infecção por *Cryptosporidium* em animais e humanos na região de Adamantina e adjacências, dessa maneira o presente projeto tem como objetivo a identificação e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de animais domésticos da região noroeste paulista. Dessa forma, amostras fecais dos animais serão submetidas a uma concentração inicial com solução de Sheather, seguido de leitura com coloração negativa de verde malaquita em microscópio óptico. Amostras positivas serão submetidas a extração de DNA genômico, e posteriormente realizada a *nested* PCR, tendo como alvo a subunidade do gene 18S do rRNA. Após a amplificação dos fragmentos, será realizado o sequenciamento genômico e análise dos resultados com avaliação filogenética e estatística dos dados obtidos.

Palavras chaves: *Cryptosporidium* spp., diagnóstico, ocorrência, animais domésticos, caracterização molecular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2.OBJETIVOS.....	6
2.1 Geral.....	6
2.2Específicos.....	6
3. JUSTIFICATIVA.....	6
4.REVISÃO DE LITERATURA.....	7
5. METODOLOGIA.....	10
5.1 Amostras de fezes.....	10
5.2Purificação das Amostras Fecais.....	10
5.3 Extração de DNA genômico dos oocistos.....	11
5.4 <i>Nested</i> PCR para amplificação de fragmento do gene da subunidade 18S do RNA.....	11
5.5 <i>Nested</i> PCR para amplificação de fragmento do gene da glicoproteína gp60.....	12
5.6 Sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	12
5.7 Clonagem molecular.....	12
5.8 Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos e edição final.....	12
5.9 Análise estatística.....	13
6. VIABILIDADE DA EXECUÇÃO DA PESQUISA.....	13
7.CRONOGRAMA.....	14
8.RESULTADOS PARCIAS.....	14
9.REFERÊNCIAS.....	17

1. INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são patógenos de seres humanos e de muitas outras espécies de vertebrados. Completam seu ciclo biológico nos microvilos da superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis, peixes e anfíbios (XIAO; RYAN, 2006).

A infecção em mamíferos domésticos e humanos comumente é causada por uma espécie exclusiva do homem, *C. hominis* ou por *C. parvum*, caracterizando uma infecção zoonótica, com inúmeros casos descritos na literatura (PREISER et al., 2003).

No Brasil, algumas espécies com potencial zoonótico, como *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. parvum* e *C. ubiquitum*, foram identificadas em animais; e em humanos, já foi relatada infecção por *C. parvum*, *C. hominis* e por outras espécies adaptadas a hospedeiros animais, como *C. canis*, *C. felis* e *C. meleagridis* (MEIRELES, 2010) causando infecção em seres humanos, o que demonstra que animais domésticos e silvestres, sejam mamíferos ou aves, podem atuar como fontes de infecção deste parasito para o ser humano e outros animais, pela contaminação de fontes de água ou de alimentos (XIAO; FAYER, 2008).

Apesar de não haver definição sobre a participação de aves na cadeia epidemiológica de infecções por *C. meleagridis* no homem, essa espécie é considerada como um importante patógeno humano, sendo responsável por vários relatos de infecção no homem (XIAO; FENG, 2008).

Não existe nenhum estudo mais abrangente na literatura sobre a epidemiologia da infecção pelo *Cryptosporidium* spp. em animais domésticos na região de Adamantina e adjacências. Esses animais, além de apresentarem morbidade e mortalidade na presença de criptosporidiose, podem servir como fonte de infecção de *Cryptosporidium* para o homem.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Determinar a ocorrência do *Cryptosporidium* spp nas amostras fecais de animais domésticos na região noroeste do estado de São Paulo.

2.2 Específicos

- Implementar as técnicas coproparasitológicas que auxiliarão na identificação do parasito nas amostras fecais.
- Realizar a caracterização molecular do parasito, por meio da *nested* PCR e sequenciamento para a confirmação dos diagnósticos microscópicos e classificar as espécies.
- Desenvolver e analisar a filogenia do parasito, utilizando desenho de árvores filogenéticas.
- Implementar e padronização das técnicas de clonagem, para a realização do sequenciamento do parasito, quando necessário.
- Analisar os fragmentos de DNA sequenciados.

3. JUSTIFICATIVA

- Por se tratar de uma zoonose, a criptosporidiose é uma enfermidade altamente infecciosa e facilmente transmitida através da água, alimentos, animal para homem, e do homem para homem.

- O aumento do número de cães, gatos e aves sendo criadas como *pets* por crianças e adultos imunodeficientes e idosos, os quais são mais susceptíveis à infecção por *Cryptosporidium* e pelo escassez de informações a respeito do papel das aves na epidemiologia da transmissão da criptosporidiose para o homem.

- Desenvolvimento do laboratório de parasitologia na UniFAI, para diagnóstico e pesquisa das principais parasitoses de humanos e animais domésticos, com implementação de técnicas moleculares para diagnóstico.

- Capacitação de alunos graduandos, com apresentação dos resultados em congressos e revistas científicas específicas da área.

- As atividades de pesquisa já contam com auxílio de instituição de fomento (FAPESP, número 15/26334-8), viabilizando todo o desenvolvimento da pesquisa.

- Projeto de pesquisa associados a teses de mestrado, doutorado e Pós-doutorado de docentes e alunos de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária de

Araçatuba – FMVA/UNESP, proporcionando aos alunos participantes do projeto qual é o funcionamento do ambiente de pesquisa na pós-graduação.

- O projeto em questão será o início do desenvolvimento de um grupo de pesquisa junto ao Cnpq que contará com a participação de docentes da UNIFAI e de outras instituições de ensino superior.

4. REVISÃO DE LITERATURA

Cryptosporidium spp. são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida e família Cryptosporidiidae (FAYER, 2008), que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (CURRENT et al., 1986; BARTA & THOMPSON, 2006; VALIGUROVÁ et al., 2008), causando doença clínica e subclínica (SANTIN, 2013). Atualmente, há descrição de 27 espécies do parasito, porém, ainda não há um consenso sobre quais são válidas (RYAN & HIJJAWI, 2015).

Cryptosporidium parvum é um importante agente etiológico de diarreia em ruminantes, principalmente bovinos nas primeiras semanas de vida, nos quais a gravidade e duração da diarreia podem conduzir à morte por desidratação (RAMIREZ et al., 2004; SANTÍN, 2012). A prevalência em bovinos com menos de três meses de idade é de até 100%, e a grande quantidade de oocistos presentes nas fezes representa um risco significativo de contaminação do meio ambiente e de transmissão para os seres humanos (BROOK et al., 2009).

Cryptosporidium hominis é uma espécie adaptada ao hospedeiro humano, enquanto *C. parvum* tem muitos hospedeiros animais, incluindo o homem, e é particularmente comum em ruminantes (RAMIREZ et al., 2004). A criptosporidiose humana é causada predominantemente por *C. hominis* ou *C. parvum* (MORGAN et al., 1999; XIAO; RYAN, 2006; CACCIÒ; POZIO, 2006), embora haja descrição de infecção esporádica por outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* (CHALMERS; GILES, 2010).

Há três espécies de *Cryptosporidium* que causam enfermidades em aves. A primeira descoberta foi realizada por Slavin (1955) e denominada *Cryptosporidium meleagridis*. Current et al. (1986) descreveu a segunda, *Cryptosporidium baileyi*, e Pavlásek (1999) a terceira, *Cryptosporidium galli*. Foram descritos ainda os genótipos I, II, III, IV e V (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; ABE &

MAKINO, 2010) que, apesar de morfologicamente semelhantes a algumas espécies já classificadas, devido à ausência de dados relacionados às suas características biológicas ainda não foram classificadas como espécie (XIAO et al, 2002; FAYER, 2010) e os dados sobre sua especificidade por hospedeiros ainda são bastante escassos.

Surtos de criptosporidiose humana estão associados à ingestão de água destinada ao consumo ou de recreação, consumo de alimentos, contato direto ou indireto com fezes humanas, inclusive em creches, ou com fezes de animais, particularmente ruminantes (MACKENZIE et al, 1995; FAYER et al, 2000; KARANIS et al., 2007; LEITCH; HE, 2012). A criptosporidiose humana pode ser uma antroponose (*C. hominis* ou *C. parvum*) ou uma antropozoonose, com envolvimento principalmente de *C. parvum* (MORGAN et al., 1999; RAMIREZ et al., 2004). É classificada pela Organização Mundial de Saúde como uma enfermidade causada por um “patógeno referência” associado à qualidade da água (WHO, 2006).

A presença de *Cryptosporidium* em redes de esgoto e fontes de abastecimento de água tem originado surtos de criptosporidiose em populações humanas por todo o mundo (LEITCH; HE, 2012). O elevado número de oocistos liberados por hospedeiros infectados, o reduzido número de oocistos requerido para a infecção (menos de 10 oocistos), o tamanho dos oocistos (4 a 6µm), o fato dos oocistos serem resistentes ao cloro adicionado para tratamento de água e a baixa velocidade de sedimentação são fatores que contribuem para a ocorrência dos surtos de criptosporidiose de origem hídrica (PEETERS et al, 1989; KORICH et al, 1990; CARPENTER et al, 1999; DILLINGHAMA et al., 2002).

Em alguns países, a infecção em humanos por *C. meleagridis* pode apresentar frequência semelhante ou maior a infecção por *C. parvum* (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2003; CHALMERS & GILES, 2010). Estudos utilizando análise filogenética sugerem que há relação entre os isolados do homem e de aves (STENSVOLD et al., 2014; WANG et al. 2014), demonstrando que *C. meleagridis* possui importância em saúde pública. A experiência é um fator fundamental para diagnóstico de criptosporidiose, uma vez que os oocistos do gênero *Cryptosporidium* são pequenos, quando comparados a outros coccídios, não apresentam esporocistos, são difíceis de serem visualizados e são morfologicamente similares a esporos de fungos e leveduras (CASEMORE, 1991). Particularmente em amostras com poucos oocistos, é preciso cuidado para evitar resultados falso-positivos em amostras fecais examinadas pelos métodos de diagnóstico mais comuns, como a coloração de Kinyoun, coloração negativa

com verde malaquita ou por visualização em microscopia óptica após concentração com soluções saturadas de açúcar, sulfato de zinco ou cloreto de sódio.

Aves de estimação, incluindo psitacídeos, são frequentemente infectadas por *Cryptosporidium* spp. de origem gástrica (NAKAMURA; MEIRELES, 2015), com infecção crônica que pode estar associada a sinais clínicos (MAKINO et al., 2010; SILVA et al., 2010; NAKAMURA et al., 2014). Ambas espécies já foram descritas em Psittaciformes afetando proventrículo, sendo que *C. galli* em quatro continentes (RYAN et al., 2003a; NG et al., 2006; ANTUNES et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009; SEVÁ et al., 2011; QI et al., 2011; NAKAMURA et al., 2014) e, o genótipo III, em três continentes (ABE E MAKINO, 2010; NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; MAKINO et al., 2010; QI et al., 2011; GOMES et al., 2012; NAKAMURA et al., 2014; RAVICH et al., 2014).

Apesar dos oocistos de algumas espécies apresentarem morfologia e morfometria distintas, a análise microscópica não define a espécie, pelo fato de apresentarem pequena variação morfológica e morfométrica e, em muitos casos, serem idênticos entre diferentes espécies ou genótipos (RYAN, 2010). As técnicas imunológicas como ELISA de captura e imunofluorescência indireta apresentam maior sensibilidade que as técnicas de coloração, no entanto, os antígenos apresentam reatividade cruzada entre diferentes espécies de *Cryptosporidium*, não sendo possível o diagnóstico espécie-específico (JEX et al., 2008).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* é realizada por meio da PCR seguida da RFLP ou de sequenciamento dos fragmentos amplificados. O gene mais utilizado para determinação da espécie ou genótipo é o 18S rRNA (RYAN et al., 2014). O gene da glicoproteína de 60 kD (GP60) é utilizado para subtipagem em estudos de epidemiologia molecular (STENSVOLD et al., 2014; WANG et al., 2014). Há também a possibilidade de diagnóstico espécie-específico utilizando técnicas de biologia molecular.

5. METODOLOGIA

5.1 – Amostras de fezes

As amostras fecais serão provenientes de propriedades rurais, canis, gatis, *pet shops* e criadores, selecionadas aleatoriamente por conveniência, localizadas na região noroeste do Estado de São Paulo-SP. A informação sobre a idade dos animais será computada em um questionário epidemiológico que será proposto. Não há dados publicados em literatura sobre a ocorrência de criptosporidiose em animais na região, sendo importantes os registros por se tratar de uma zoonose importante, principalmente acometendo os imunossuprimidos.

Não será possível determinar a prevalência de criptosporidiose, pois as amostras deste experimento não serão representativas de toda a população das cidades do noroeste paulista, uma vez que a amostragem será feita por conveniência, numa oportunidade única de obtenção de amostras desses animais. Para estimativa da porcentagem de animais infectados em relação à população total, o cálculo do número de amostras será realizado utilizando o software WinEpiscope (THRUSFIELD et al., 2001), considerando-se distribuição normal de ocorrência, erro absoluto de 5%, nível de significância (α) de 5% e prevalência de 50%.

As amostras serão colhidas em microtubos de 2 mL, de acordo com a quantidade disponível. Cada amostra será colhida com espátula de madeira descartável (uma para cada amostra), sem conservantes, e armazenada a 4° C contendo solução de cloreto de sódio 0,9% em quantidade suficiente para prevenção da desidratação das amostras.

5.2 Purificação das Amostras Fecais

A purificação das amostras será feita individualmente. Inicialmente, elas serão fragmentadas e homogeneizadas com auxílio de um palito, dentro do próprio microtubo. Com uso de uma pipeta Pasteur de plástico, será adicionada a solução de Sheather modificada (g= 2,05) preparada com PBS e Tween 20 0,1%, em quantidade suficiente para facilitar a diluição da amostra. Utilizando outra pipeta Pasteur de plástico, o conteúdo de cada tubo será homogeneizado e a metade do conteúdo será transferida para outro microtubo, a fim de que a purificação de cada amostra ocorra em dois tubos simultaneamente. Cada tubo será então preenchido com solução de Sheather modificada até que atinjam o volume de 1,9 ml e, posteriormente, o conteúdo será homogeneizado em vortex. Os microtubos serão centrifugados a 800 g por cinco minutos. Enquanto ocorre a centrifugação, dois novos microtubos de 2 ml para cada amostra serão

identificados e preenchidos com 1.500 µL de PBS/ Tween 20 0,1%. Após retirar as amostras da centrífuga, 400 µL do sobrenadante serão aspirados de cada uma com uso de uma micropipeta e esta quantidade será transferida para seu respectivo microtubo, previamente preenchido com PBS/ Tween 20 0,1%. A solução resultante será homogeneizada por inversão e posteriormente centrifugada a 10.000 g durante três minutos. Após essa etapa, haverá a formação de um *pellet* que deverá ser cuidadosamente preservado ao se descartar o sobrenadante desta etapa, com uso de uma micropipeta. O tubo deverá ser novamente preenchido até 1,9 ml, com solução de PBS/Tween 20 0,01% em cada amostra, com centrifugação a 10.000g, por três minutos. O sobrenadante será descartado com uso de uma micropipeta, preservando-se cerca de 100 µL da solução e o sedimento. Em um dos dois microtubos de cada amostra deverão ser adicionados 100 µL de formol a 10%, de maneira que a solução final fique com concentração de formol a 5%, enquanto que o outro tubo será congelado a -20°C.

No sedimento resultante do processo de purificação que contém formol será pesquisada a presença de oocistos de *Cryptosporidium* através de técnica de coloração negativa com verde malaquita (ELLIOT et al., 1999). As amostras que foram congeladas serão submetidas à extração de DNA e amplificação por *n*PCR e PCR em tempo real (itens 3.3, 3.4 e 3.8).

5.3 Extração de DNA genômico dos oocistos

Uma alíquota contendo aproximadamente 100 mg do sedimento resultante da purificação das amostras fecais armazenadas a -20°C, será submetida à extração de DNA com utilização do QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen), conforme orientações do fabricante.

5.4 Nested PCR para amplificação de fragmento do gene da subunidade 18S do rRNA

A *nested* PCR será utilizada para amplificação de um fragmento de ~587pb do gene da subunidade 18S do rRNA de *Cryptosporidium* spp. (RYAN et al., 2003b). Como controle positivo e controle negativo da reação serão utilizados, respectivamente, DNA genômico de *C. serpentis* e água ultrapura.

Os fragmentos amplificados serão submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed® (Biotium) e visualizados em transiluminador UV.

5.5 Nested PCR para amplificação de fragmento do gene da glicoproteína gp60

Em amostras identificadas como *C. parvum* ou *C. hominis* pela *nPCR/S* para o gene 18S rRNA, a determinação do subtipo será realizada pela *nPCR* para amplificação de um fragmento de ~900 pb do gene da glicoproteína gp60 (STENSVOLD et al., 2014). Como controle positivo e controle negativo da reação serão utilizados, respectivamente, DNA genômico de *C. parvum* e água ultrapura.

5.6 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Os fragmentos resultantes das duas *nPCR* (18S rRNA e gp60) serão submetidos à purificação utilizando-se o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) e, posteriormente, sequenciados utilizando-se o ABI Prism® DyeTerminator 3.1, em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento serão realizadas em duplicata e nas duas direções, utilizando-se os *primers* das reações secundárias.

5.7 Clonagem molecular

Caso não seja possível a identificação da espécie ou genótipo, por sequenciamento, do fragmento amplificado pela *nPCR*, em função de pequena quantidade de DNA amplificado ou devido à presença de infecções mistas por diversas espécies ou genótipos de *Cryptosporidium*, será realizada a clonagem molecular do fragmento amplificado, utilizando o *CloneJET PCR Cloning Kit* (ThermoScientific®) em *Escherichia coli* JM 107 (ThermoScientific®), de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. A purificação do DNA plasmidial será realizada utilizando o *GenElute®HP Five-Minute PlasmidMiniprep Kit* (Sigma-Aldrich®).

5.8 Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos e edição final

Após determinação das sequências de nucleotídeos dos fragmentos amplificados por *nPCR*, elas serão alinhadas com o auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no GenBank.

5.9 Análise estatística

Será efetuada análise estatística descritiva com o cálculo de porcentagem. O índice de concordância entre a microscopia e a *n*PCR será determinado pelo coeficiente Kappa, com intervalo de confiança de 95% (COHEN, 1960).

6. VIABILIDADE DA EXECUÇÃO DA PESQUISA

O projeto possui financiamento vigente de recursos materiais da FAPESP em andamento, auxílio pesquisa processo FAPESP número 15/26334-8, sob responsabilidade do professor adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles, colaborador do projeto. O desenvolvimento será acompanhado tanto pelo orientador como pelo coorientador do aluno candidato a bolsa, assim como pelos colaboradores, no período proposto.

7. CRONOGRAMA

Atividades (Etapas)	AGO/ 17	SET /17	OUT/ 17	NOV/ 17	DEZ /17	JAN /18	FEV /18	MAR/ 18	ABR /18	MAI /18	JUN /18	JUL /18
Coleta das amostras	X	X	X	X								
Processamento das amostras	X	X	X	X	X	X	X					
Análise Estatística dos Resultados						X	X	X				
Redação da Pesquisa									X	X	X	
Relatório Final										X	X	X

8. RESULTADOS PARCIAIS

Os resultados parciais obtidos até o atual momento, com o projeto (processo número 800358/2016-3) ainda em andamento, foram: a colheita de 174 amostras (110 amostras de aves e 64 de cães), as quais foram submetidas a concentração inicial com as técnicas de Centrifugo-flutuação em solução de Sheather e pela técnica de Água-Éter. Após a concentração foi realizada a leitura microscópica por meio da coloração negativa verde de malaquita das amostras de aves (*Nymphicus hollandicus*, *Serinus canaria* e *Melopsittacus undulatus*). Foram lidas 110 amostras de aves, onde 22

amostras (20%) apresentaram resultados positivos para *Cryptosporidium spp* e 88 (80%) dessas amostras apresentaram-se negativas para o mesmo. Tabela 1. Gráfico 1.

Verifica-se a presença do protozoário *Cryptosporidium spp* visualizado em uma das amostras de aves, positiva pra tal parasita.

A próxima etapa será a realização da leitura microscópica das amostras fecais de cães, que totalizam 64 amostras, através da mesma técnica utilizada para com as amostras de aves, a coloração negativa com verde de malaquita.

Após realizado todo processo de microscopia iniciará a última etapa onde serão realizadas as identificações moleculares das amostras consideradas positivas de ambas espécies.

Amostras	Positivas	Negativas	Total
Aves	22 (20%)	88 (80%)	110
Cães	Zero	Zero	64

Tabela 1. Número de amostras positivas e negativas obtidas por meio da leitura das amostras em microscopia.

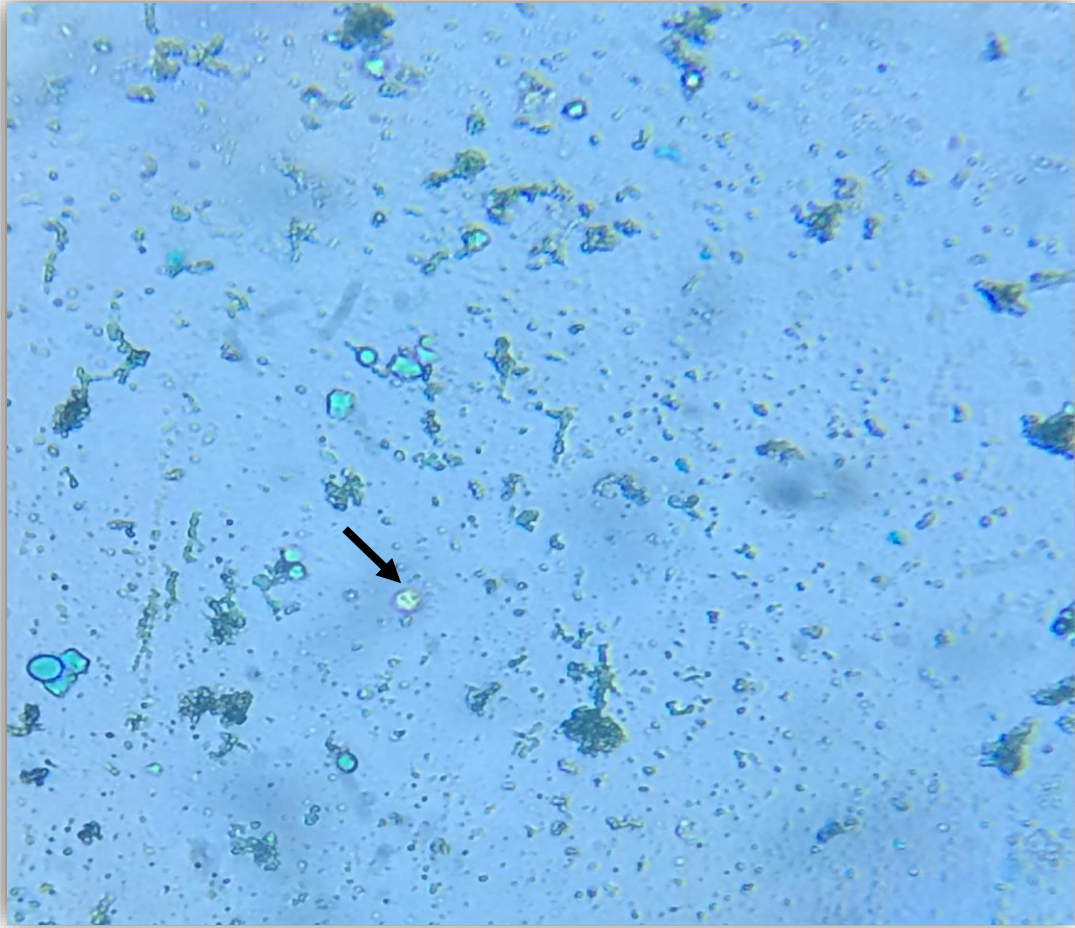


Figura 1. Observa-se a presença de oocisto de *Cryptosporidium* spp. (seta) pela técnica de coloração negativa de verde malaquita. Nota-se o oocisto brilhante contra um fundo corado de verde.

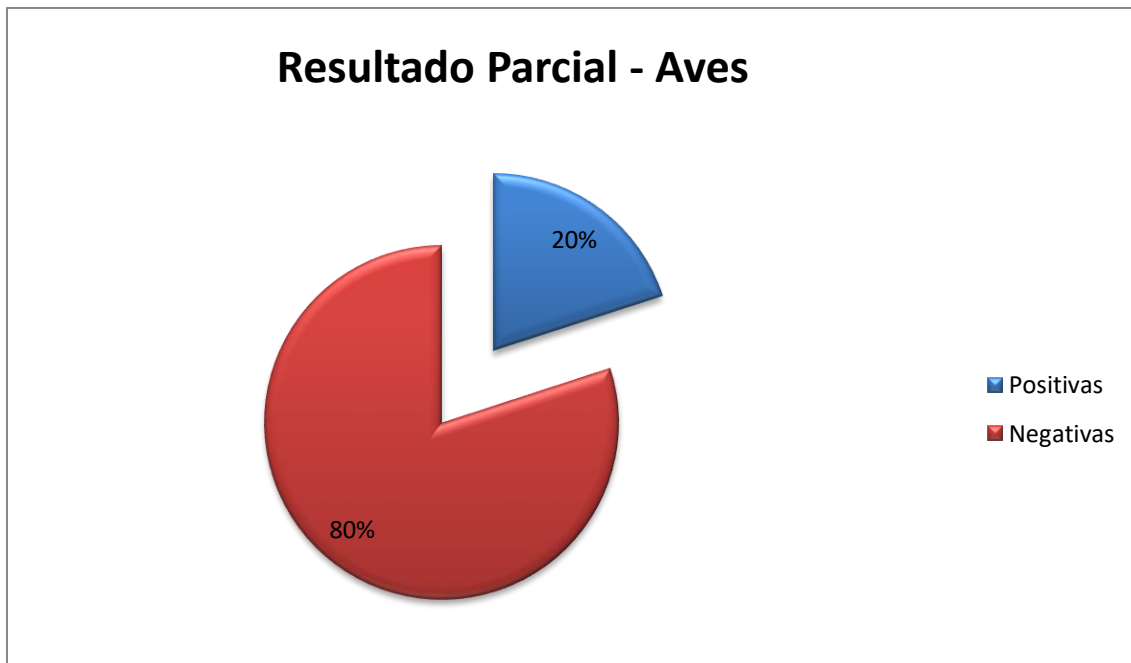


Gráfico 1. Porcentagens de amostras negativas e positivas de aves submetidas ao exame microscópico, com coloração negativa verde de malaquita.

9. REFERÊNCIAS

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

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(4), p. 702-705, 2008.

BARTA, J.R.; THOMPSON, A.R.C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends Parasitology**, v. 22(10), p. 463-468, 2006.

BROOK, E.J.; HART, A.C.; FRENCH, N P.; CHRISTLEY, R.M. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 378-382, 2009.

CACCIÒ, S. M.; POZIO, E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 4, p. 429-443, 2006.

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

CARPENTER, C.; FAYER, R.; TROUT, J.; BEACH, M. J. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 579–584, 1999.

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

CHALMERS, R.M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK – challenges for control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 487-497, 2010.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, v.20, p. 27-46, 1960.

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

DILLINGHAMA, R. A.; LIMAB, A. A.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. Microbes and Infection, v. 4, p. 1059-66, 2002.

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

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

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

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

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

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

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. V. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water Health**, v. 5, p. 1-38, 2007.

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

LEITCH, G.J.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. **Journal of Biomedical Research**, v. 25, p. 1-16, 2012.

MACKENZIE, W. R.; SCHELL, W. L.; BLAIR, K. A.; ADDISS, D. G.; PETERSON, D. E.; HOXIE, N. J.; KAZMIERCZAK, J. J.; DAVIS, J. P. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. **Clinical Infectious Disease**, v. 21, p. 57-62, 1995.

MAKINO, I.; ABE, N.; REAVILL, D.R. *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). **Avian Diseases**; v. 54(3), p. 1102-1107, 2010.

MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 197-204, 2010.

MEIRELES, M.V.; SOARES, M.R.; SANTOS, M.M.A.B.; GENNARI, S.M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostrich (*Struthio camelus*). **Journal of Parasitology**, v. 92(3), p. 623-626, 2006.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; WEBER, R.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. Which genotypes/ species of *Cryptosporidium* are humans susceptible to? **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 42S-43S, 1999.

NAKAMURA, A.A.; HOMEM, 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, p. 7-13, 2014.

NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, p. 253-267, 2015.

NAKAMURA, A.A.; SIMÕES, D.C.; ANTUNES, 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(1-2), p. 47-51, 2009.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72(12), p. 7548-7553, 2006.

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

PEETERS, J. E.; MAZAS, E. A.; MASSCHELEIN, W. J.; VILLACORTA MARTIEZ DE MATURANA, I.; DEBACKER, E. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1519-1522, 1989.

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

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

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, p. 1-13, 2004.

RAVICH, M.L.; REAVILL, D.R.; HESS, L.; CHILDRESS, A.L.; WELLEHAN Jr, J.F.X. Gastrointestinal cryptosporidiosis in captive psittacine birds in the United States: A case review. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 28(4), p. 297-303, 2014.

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

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

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, M.; MONIS, P.; LAL, A.A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporididae) from birds. **J. Parasitol.**, v. 89, p. 809-813, 2003a.
RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A.A.; PAVLASEK, I. Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech Republic. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69 (7), p. 4302-4307, 2003b.

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

SANTOS, M.M.A.B.; PEIRÓ, JR.; MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: clinical, morphological and molecular studies. **Braz. J. Poult. Sci.**, v. 7(2), p. 113-117, 2005.

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

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

SILVA, D.C.; HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; TEIXEIRA, W.F.; PERRI, S.H.; MEIRELES, M.V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. **Parasitology Research.**, v. 107, 271-277, 2010.

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

STENSVOLD, C.R.; BESER, J.; AXEN, C.; LEBBAD, M. High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52 (7), p. 2311-2319, 2014.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Researchs*, v. 24, p. 4876-4882, 1997.
THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I.; NOORDHUIZEN, J.P.; FRANKENA, K. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. **Veterinary Record**, v. 148, p.567-572, 2001.

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

WANG, Y.; YANG, W.; CAMA, V.; WANG, L.; CABRERA, L.; ORTEGA, Y.; BERN, C.; FENG, Y.; GILMAN, R.; XIAO, L. Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: evidence for cross-species transmission. **International Journal of Parasitology**, v. 44 (8), p. 515-521, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for Drinking Water Quality** [electronic resource] : incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations. – 3rd ed. 2006. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf. acesso em 20 mar 2013.

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, p. 72-97, 2004.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 309-323, 2008.

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

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHEKLEY, W. ; CABRERA, L.; GILMAN, A.A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183(3), p. 492-497, 2001.

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