

ALEX AKIRA NAKAMURA

Determinação da ocorrência de *Cryptosporidium galli* em amostras fecais de aves por meio da PCR em tempo real

São Paulo

2013

ALEX AKIRA NAKAMURA

Determinação da ocorrência de *Cryptosporidium galli* em amostras fecais de aves por meio da PCR em tempo real

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2755
FMVZ

Nakamura, Alex Akira
Determinação da ocorrência de *Cryptosporidium galli* em amostras fecais de aves por meio da PCR em tempo real / Alex Akira Nakamura. -- 2013.
130 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles.

1. PCR duplex em tempo real. 2. Diagnóstico. 3. *Cryptosporidium galli*.
4. *Cryptosporidium* genótipo III de aves. 5. Detecção molecular. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação da ocorrência de *Cryptosporidium galli* em amostras fecais de aves por meio da PCR em tempo real", não utilizando animais, protocolado sob o nº1614/2009, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/04/09.

We certify that the Research "Determination of the occurrence of *Cryptosporidium galli* in fecal samples of birds using real time PCR", protocol number 1614/2009, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/22/09.

São Paulo, 23 de abril de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NAKAMURA, Alex Akira

Título: Determinação da ocorrência de *Cryptosporidium galli* em amostras fecais de aves por meio da PCR em tempo real

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Aos meus queridos familiares

Pai, mãe e irmão,

Por, mais uma vez, incentivar e apoiar as minhas decisões.

A minha namorada Jussara Satori Yoshida

*Por todo apoio, incentivo, carinho, paciência, amor e
companheirismo em todas as horas.*

A todos os amigos

Pelo apoio e incentivo sempre.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP, pela oportunidade de realização desse doutorado.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Araçatuba – FMVA-UNESP, por contribuir e possibilitar a realização da parte prática do experimento, disponibilizando laboratórios, materiais, e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, mais uma vez por me orientar, pelo grande incentivo, apoio prestado sempre que solicitado, pela amizade e seus ensinamentos, compreensão, pelo voto de confiança depositado e pela paciência.

À Prof^a. Dr^a Solange Maria Gennari, pela orientação acadêmica, apoio, incentivo, ensinamentos e confiança, possibilitando a realização deste projeto de pesquisa.

Aos Professores Universidade de São Paulo, pela ajuda, conselhos e transmissão de conhecimentos.

Aos doutores Sérgio Aoki e Paulo Peitl Junior, da empresa DNAPTA Biotecnologia LTDA, por permitir a realização de experimentos de clonagem utilizados neste experimento, em especial às funcionárias Valéria, Priscila e Lilian, por toda ajuda prestada e ensinamentos passados.

Ao Hospital Veterinário da FMVA-UNESP campus de Araçatuba, e ao DEPAVE III, em especial às Médicas Veterinárias Vilma C. Geraldi, Adriana M. Joppert e Sílvia,

por permitir a coleta de amostras utilizadas, possibilitando assim a realização desse estudo.

Aos pós-graduandos do VPS: Sérgio, Patrícia, André, Thiago, Jonas, pela troca de conhecimentos e momentos de descontração.

Aos pós-graduandos da FMVA-UNESP de Araçatuba: Larissa, Caio, Deuvânia, Milena, Kathleen e Ana Carolina pelos bons momentos de trabalho e convivência.

As tias Maria Massako e Tereza Mitiko, pelos bons momentos compartilhados e convivência.

Aos amigos, Fabiana Soria, Maurício Kobayashi, Camila Homem, Jesualdo Filho, Michele Honaga, Philipp Paiva, Leandro Kanamaru, Silmara Sakamoto e Valéria Miura, por toda a ajuda e amizade, ensinamentos compartilhados, convivência, momentos de descontração e por sempre poder contar com o apoio de cada um.

Ao amigo doutorando Cristiano de Carvalho, por toda ajuda, amizade, troca de conhecimentos e, sobretudo por sempre poder contar com um amigo por perto.

Aos amigos e colegas de profissão, Rogério Arno, Rogério Perez, Rubens Xavier, pela amizade, apoio e consideração.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório Ornitopatologia da FMVA-UNESP: Bruno e Henrique, pelos bons momentos compartilhados.

Aos cunhados Bruno Milan e Vanessa Yoshida, pelo auxílio, incentivo e por toda a ajuda prestada.

À técnica de laboratório, Juliana Perosso pela amizade, paciência, ensinamentos, incentivo e pela disponibilidade sempre que solicitada.

Aos secretários do VPS, Danival e Cristina, por toda atenção, disposição e auxílio prestados, até a conclusão dessa tese.

Aos demais funcionários e professores do VPS-FMVZ-USP, por toda a ajuda prestada.

A todos os demais funcionários e professores da FMVA-UNESP Campus Araçatuba, por todo auxílio prestado.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ/USP pela atenção e pela ajuda com as normas bibliográficas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de doutorado (processo nº 2009/51596-5) e pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto de pesquisa (processo nº 2009/51595-9).

E por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram e auxiliaram-me no desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

“Todo sacrifício é temporário, mas as vitórias são para sempre”

Roberto Shinyashiki

*“Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem concentração
e auto-sacrifício, esforço e dúvida”*

Max Beerbohm

RESUMO

NAKAMURA, A. A. **Determinação da ocorrência de *Cryptosporidium galli* em amostras fecais de aves por meio da PCR em tempo real.** [Determination of the occurrence of *Cryptosporidium galli* in fecal samples from birds by real-time PCR]. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A criptosporidiose já foi descrita em várias espécies animais, incluindo várias espécies de aves. É considerada uma das principais infecções por protozoários em aves das ordens Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes e Struthioniformes. Três espécies de *Cryptosporidium* infectam aves: *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium galli* e *Cryptosporidium meleagridis*, além de vários genótipos distintos geneticamente, como os genótipos I, II, III, IV e V de aves. *Cryptosporidium galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves estão relacionados com infecções crônicas no proventrículo, de forma semelhante à infecção por *Cryptosporidium serpentis*, em serpentes. 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*. O projeto teve como objetivo o desenvolvimento da PCR duplex em tempo real, tendo como alvo o gene da subunidade 18S do rRNA, por meio de ensaio *TaqMan*, para detecção de DNA de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, e avaliar os atributos diagnósticos da PCR duplex em tempo real quando comparada à *nested* PCR, utilizando 1027 amostras fecais de aves das ordens Passeriformes e Psittaciformes. A PCR duplex em tempo real apresentou positividade em 580/1027 (56,47%) para *C. galli*, enquanto que a *nested* PCR resultou em positividade para *Cryptosporidium* spp. em 104/1027 (10,13%) amostras. Para *Cryptosporidium* genótipo III de aves, houve positividade em 21/1027 (2,04%). A PCR duplex em tempo real resultou em alta especificidade analítica quando foram utilizadas amostras de DNA de outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium*. A única exceção foi a amplificação de DNA de *C. serpentis*, com a utilização de *primers* e sonda para detecção de *Cryptosporidium* genótipo III de aves, porém, com uma baixa eficiência de amplificação. Foram identificados novos hospedeiros aviários para ambas as espécies gástricas, assim como foi possível a identificação

de *C. baileyi* e, pela primeira vez no Brasil, de *Cryptosporidium* genótipo V de aves. Conclui-se que a PCR duplex em tempo real desenvolvida neste estudo é um recurso que apresenta rapidez e confiabilidade para diagnóstico de criptosporidiose gástrica em aves.

Palavras-chave: PCR duplex em tempo real. Diagnóstico. *Cryptosporidium galli*. *Cryptosporidium* genótipo III de aves. Detecção molecular.

ABSTRACT

NAKAMURA, A. A. **Determination of the occurrence of *Cryptosporidium galli* in fecal samples from birds by real-time PCR.** [Determinação da ocorrência de *Cryptosporidium galli* em amostras fecais de aves por meio da PCR em tempo real]. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Cryptosporidiosis has been described in several animal species, including many species of birds, and is considered a major protozoan infection of the orders Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes and Struthioniformes. Three species of *Cryptosporidium* are valid in birds: *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium meleagridis* and *Cryptosporidium galli*; beside these species, there are several genotypes genetically distinct, as avian genotypes I, II, III, IV and V. *Cryptosporidium galli* and *Cryptosporidium* avian genotype III are related to chronic infections in proventriculus, similar to *Cryptosporidium serpentis* infection in snakes. Several methods are used for cryptosporidiosis diagnosis, but only those based on molecular biology are able to determine the *Cryptosporidium* species and genotypes. The aim of this project was the development of a duplex real-time PCR targeting 18S subunit of rRNA gene, by TaqMan assay, to detect DNA of *C. galli* and *Cryptosporidium* avian genotype III, and to evaluate the diagnostic attributes of the duplex real-time PCR compared to nested PCR, using 1027 fecal samples from birds of the orders Passeriformes and Psittaciformes. The duplex real time PCR showed positivity in 580/1027 (56.47%) for *C. galli*, whereas nested PCR was positive for *Cryptosporidium* spp. in 104/1027 (10.13%) samples. For *Cryptosporidium* avian genotype III, there was positivity in 21/1027 (2.04%) samples. The duplex real time PCR resulted in high analytical specificity when tested using DNA samples from other *Cryptosporidium* species and genotypes. The only exception was the amplification of DNA from *C. serpentis* with primers and probe for the detection of *Cryptosporidium* avian genotype III, although with lower efficiency. New avian hosts were identified for both gastric species, as well as it was possible to identify *C. baileyi* and, for the first time in Brazil, *Cryptosporidium* avian genotype V. It was concluded that the duplex real time PCR

developed in this study is a fast and reliable tool for diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds.

Keywords: Duplex real-time PCR. Diagnosis. *Cryptosporidium galli*. *Cryptosporidium* avian genotype III. Molecular detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	32
Figura 2 -	Diluição seriada de DNA plasmidial de <i>C. galli</i> utilizada para padronização da dPCR em tempo real.....	73
Figura 3 -	Diluição seriada de DNA plasmidial de <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves utilizada para padronização da dPCR em tempo real.....	73
Figura 4 -	Teste dos <i>primers</i> da dPCR em tempo real, com utilização do fluoróforo EvaGreen [®] , realizado em duplicata. <i>C. galli</i> : curvas de amplificação (A) e de dissociação (C), em gradiente de temperatura de 58°C, 59°C, 60°C e 61,2°C. <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves: curvas de amplificação (B) e de dissociação (D), em gradiente de temperatura de 58°C, 59°C, 60°C e 61,2°C. A melhor temperatura para os dois alvos (61,2°C) está evidenciada em vermelho.....	79
Figura 5 -	Teste de concentração de <i>primers</i> senso/anti-senso, utilizando a PCR em tempo real com combinação das concentrações de 100 nM, 300 nM e 600 nM de cada <i>primer</i> e concentração fixa de 250 nM de sonda, realizado em duplicata. Curva de amplificação de <i>C. galli</i> (A) e de <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves (B). A melhor concentração para os dois alvos (600 nM/600 nM) está evidenciada em vermelho.....	80
Figura 6 -	Teste de concentração de sondas MGB desenhadas para a dPCR em tempo real, realizada em duplicata. A) <i>C. galli</i> : 150 nM (amarelo), 250 nM (vermelho) e 350 nM (azul). B) <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves: 150 nM (amarelo), 250 nM (vermelho) e 350 nM (azul).....	81
Figura 7 -	Teste de concentração de MgCl ₂ para a PCR em tempo real, realizada em duplicata para <i>C. galli</i> (A) e <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves (B): 4,5 nM (amarelo), 5,5 nM (vermelho) e 6,5 nM (azul).....	82
Figura 8 -	Teste de adição de BSA na PCR em tempo real, realizado em duplicata, para <i>C. galli</i> (A) e <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves (B): ausência de BSA (azul), presença de BSA (vermelho).....	83

Figura 9 -	Padronização da PCR duplex em tempo real, reação realizada em triplicata. A) amplificação em tempo real das diluições contendo 10^7 a 10^1 cópias de fragmento clonado do gene da subunidade 18S do rRNA de <i>C. galli</i> (FAM) e <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves (VIC). B) curva de regressão padrão das diluições: E = eficiência de amplificação; R^2 = coeficiente de determinação; Slope = valor referente à inclinação e posição da curva.....	84
Figura 10 -	Amplificação das amostras fecais por meio da dPCR em tempo real, com total de 40 ciclos. Em azul, amplificação de <i>C. galli</i> ; em vermelho, amplificação de <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves. (1) curvas de amplificação dos controles positivos. Notar amplificação da maioria das amostras em $Ct \geq 35$, não sendo possível a formação da fase <i>plateau</i>	85
Figura 11 -	Amplificação das amostras fecais por meio da dPCR em tempo real, com total de 50 ciclos. Em azul, amplificação de <i>C. galli</i> ; em vermelho, amplificação de <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves. (1) curvas de amplificação dos controles positivos. Notar a formação da fase <i>plateau</i> , nas amostras com $Ct \geq 35$, na reação com 50 ciclos.....	86
Figura 12 -	Curva de amplificação da dPCR em tempo real para <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves; amostras avaliadas em duplicata: curva de amplificação para a espécie alvo (controle positivo) em azul; curva de amplificação com ciclo de <i>threshold</i> de valor elevado e sem a formação de curva típica de amplificação em amostra de DNA de <i>C. serpentis</i> em vermelho; controle negativo em verde.....	87
Figura 13 -	Eletróforese em gel de poliacrilamida a 10%, corados com GelRed. MP= Marcador de peso molecular; 1 a 4 = amostras de campo avaliadas com dPCR em tempo real, positivas para <i>C. galli</i> , com amplificação de bandas de aproximadamente 134 pb; 5 a 7 = amostras de campo avaliadas com dPCR em tempo real, positivas para <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves, com amplificação de bandas de aproximadamente 138 pb.....	88
Figura 14 -	Eletróforese em gel de agarose 3% corado com GelRed. M= Marcador de peso molecular; 1 a 8 = amostras de positivas pela dPCR em tempo real e submetidas à clonagem molecular: bandas de aproximadamente 252 a 256 pb (vetor + inserto); 9 = amostra positiva pela dPCR em tempo real e submetida à clonagem molecular: banda de aproximadamente 118pb (vetor sem o inserto).....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> atualmente descritas.....	28
Quadro 2 -	<i>Primers</i> e sonda utilizados na dPCR em tempo real para detecção de sequência do gene da subunidade 18S de <i>C. galli</i> e <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves.....	66
Quadro 3 -	Alinhamento dos <i>primers</i> e sondas específicos para o gene da subunidade 18S do rRNA de <i>Cryptosporidium galli</i> e <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves*, com sequências de espécies que infectam aves com frequência ¹ ou raramente ² , e com sequências de <i>Cryptosporidium</i> geneticamente mais relacionadas aos dois alvos ³	69
Quadro 4 -	Concentrações de <i>primers</i> senso/anti-senso utilizados para padronização da reação.....	70
Quadro 5 -	Espécies de aves submetidas à colheita de fezes.....	76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Amostras fecais de aves positivas pela *nested* PCR para *Cryptosporidium* spp. ou pela PCR duplex em tempo real para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, e identificação molecular da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*..... 92
- Tabela 2 - Resultados do sequenciamento dos fragmentos clonados, resultantes da PCR duplex em tempo real para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, e identificação molecular da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*..... 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático
et al	e colaboradores
g	grama
<i>g</i>	gravidade terrestre
HE	hematoxilina e eosina
HSP	heat shock protein – proteína do choque térmico
mg	miligrama
μ L	microlitro
mL	mililitro
μ m	micrômetro
mM	milimolar
μ M	micromolar
μ g	microgramas
nM	nanomolar
<i>n</i> PCR	<i>nested</i> -PCR
dPCR em tempo real	PCR duplex em tempo real
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PVP	polivinilpirrolidona

RFLP	restriction fragment length polymorphism – “polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição”
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	ácido ribonucléico ribossômico
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sódio
TE	tampão Tris-EDTA
U	unidade
v/v	volume a volume
X	vezes
18S rRNA	gene da subunidade 18S do gene do rRNA
<i>primer</i>	oligonucleotídeo iniciadores

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
-	menos
° C	graus Celsius
+	mais
~	aproximadamente
®	marca registrada
≥	maior ou igual
□	menor
=	igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	24
1.1	Histórico de <i>Cryptosporidium</i> e da Criptosporidiose.....	24
1.2	Agente etiológico.....	26
1.2.1	Ciclo Biológico.....	29
1.2.2	Especificidade por Hospedeiros.....	32
1.3	Ocorrência em aves.....	35
1.3.1	Ocorrência em aves no Brasil.....	37
1.4	Infecção em Galinha Doméstica.....	38
1.5	Infecção em Perus.....	41
1.6	Infecção em Codornas.....	42
1.7	Infecção em Avestruzes.....	43
1.8	Infecção em Aves Selvagens.....	44
1.8.1	Anseriformes.....	44
1.8.2	Passeriformes.....	45
1.8.3	Psittaciformes.....	46
1.8.4	Galliformes.....	46
1.8.5	Falconiformes.....	47
1.8.6	Charadriiformes.....	47
1.9	Criptosporidiose Aviária em Saúde Pública.....	48
1.10	Diagnóstico.....	50
1.10.1	Visualização de Oocistos e Outros Estágios Evolutivos por Métodos de Concentração e/ou Coloração.....	51
1.10.2	Métodos Imunológicos e Moleculares.....	53
1.11	Justificativa para o desenvolvimento do projeto.....	55
2	OBJETIVOS.....	57
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.1	Aspectos éticos.....	58
3.2	Amostras de Fezes.....	58
3.3	Concentração e purificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i>.....	59
3.4	Extração de DNA genômico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	59

3.5	<i>Nested-PCR</i> para amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico (gene 18S rRNA).....	60
3.6	Sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	61
3.7	Clonagem molecular.....	62
3.7.1	Bactérias competentes.....	62
3.7.2	Ligação do inserto no vetor.....	63
3.7.3	Plaqueamento em meio sólido e cultivo em meio líquido.....	63
3.7.4	Análise dos clones recombinantes.....	64
3.7.5	Purificação do DNA plasmidial.....	64
3.7.6	Sequenciamento dos fragmentos clonados.....	65
3.8	Padronização da dPCR em tempo real para <i>C. galli</i> e <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves.....	65
3.8.1	Desenho de <i>primers</i> e sonda <i>Taqman</i> para a dPCR em tempo real.....	66
3.8.2	Teste dos Reagentes para a dPCR em tempo real.....	67
3.8.2.1	<i>Avaliação dos primers</i>	67
3.8.2.2	<i>Teste de concentração de primers, sonda, cloreto de magnésio (MgCl₂) e adição de albumina sérica bovina não acetilada (BSA)</i>	68
3.8.3	Curva de regressão padrão.....	71
3.8.3.1	<i>Diluições seriadas a partir de DNA plasmidial</i>	71
3.8.4	Teste de especificidade analítica da dPCR em tempo real.....	74
3.9	Clonagem molecular dos fragmentos da dPCR em tempo real.....	74
3.9.1	Sequenciamento dos fragmentos clonados da dPCR em tempo real.....	75
4	RESULTADOS.....	76
5	DISCUSSÃO.....	98
6	CONCLUSÕES.....	105
	REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Histórico de *Cryptosporidium* e da Criptosporidiose

O primeiro relato de infecção por *Cryptosporidium* foi feito por Ernest Edward Tyzzer em 1907, que encontrou o protozoário em glândulas gástricas de camundongos de laboratório, descreveu estágios extracelulares de desenvolvimento assexuados, sexuados e esporogonia, além da eliminação de oocistos nas fezes, sugerindo assim a denominação de *Cryptosporidium muris*.

Em 1910, Tyzzer detalhou a descrição desse protozoário e o classificou como *Cryptosporidium muris*, sugerindo ainda a ocorrência de autoinfecção decorrente de esporozoítos que sofreram maturação no epitélio gástrico.

Dando continuidade à sua pesquisa, Tyzzer (1912) encontrou outro protozoário semelhante a *C. muris*, em intestino delgado de camundongos. Por meio de infecções experimentais com *C. muris* e com o isolado do intestino, conseguiu estabelecer infecções isoladas no estômago com *C. muris* e no intestino com essa nova espécie, que foi denominada *Cryptosporidium parvum*.

Somente em 1929, houve o primeiro relato de criptosporidiose em aves. Tyzzer (1929) encontrou, em epitélio cecal de galinhas, todos os estágios de desenvolvimento de *Cryptosporidium*. Nesse estudo, o autor descreveu o parasito como uma variedade biológica de uma única espécie, uma vez que ele era morfológicamente idêntico a *C. parvum*.

Slavin (1955) descreveu uma nova espécie de *Cryptosporidium* causando mortalidade em perus jovens que apresentavam infecção em intestino delgado, com quadro clínico de diarreia. Ao analisar raspados de mucosa intestinal, corados pelo método de Mac Neal, o autor descreveu a morfologia de estágios endógenos do parasito e o classificou como

Cryptosporidium meleagridis.

Somente após quase duas décadas da descrição feita por Slavin (1955), é que a criptosporidiose foi diagnosticada novamente em aves, dessa vez em gansos domésticos (*Anser anser*) (PROCTOR; KEMP, 1974) e em bursa de Fabricius de frangos (FLETCHER; MUNNELL; PAGE, 1975).

A enfermidade somente veio despertar interesse médico e veterinário na década de 70, após o primeiro relato de infecção em bovinos (PANCIERA; THOMASSEN; GARNER, 1971) e em humanos (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976), quando deixou de ser considerada como uma infecção supostamente rara e oportunista, para ser reconhecida como uma importante causa de infecções intestinais e respiratórias, em mamíferos e aves (GOODWIN, 1989; SRÉTER; VARGA, 2000; ASHBOLT, 2004; XIAO et al., 2004).

Nos meados da década de 80, Current, Upton e Haynes (1986) classificaram uma nova espécie de *Cryptosporidium* parasitando frangos, descreveram seu ciclo biológico e a classificaram como *Cryptosporidium baileyi*.

Pavlásek (1999) descreveu e classificou uma nova espécie de *Cryptosporidium* parasitando o proventrículo de frangos, nomeando-a *Cryptosporidium galli*. Posteriormente, Ryan et al. (2003) redescobriram *C. galli*, presente em proventrículo de passeriformes.

A criptosporidiose constitui-se em uma das principais infecções por protozoários em aves, manifestando-se como enfermidade respiratória ou digestiva, em dezenas de espécies pertencentes a várias Ordens, como Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes e Struthioniformes, e já foi relatada em vários continentes (GOODWIN, 1989; SRÉTER; VARGA, 2000; RYAN, 2010).

1.2 Agente Etiológico

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 (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988; CAREY; LEE; TREVORS, 2004; XIAO; RYAN, 2006; SMITH et al., 2007).

Cryptosporidium spp. possui similaridade com outros coccídios que infectam mamíferos e aves, tais como *Toxoplasma gondii*, *Hamondia*, *Eimeria* e *Isospora*. São organismos protistas pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Cryptosporidiidae, contendo um único gênero, o *Cryptosporidium* (SRÉTER; VARGA, 2000; FAYER; SANTÍN; TROUT, 2008). No entanto, alguns autores discordam dessa classificação taxonômica, sugerindo que, após análises filogenéticas, que o gênero *Cryptosporidium* estaria mais próximo da Classe Gregarinia do que da Classe Coccidia (CARRENO; MARTIN; BARTA, 1999; BARTA; THOMPSON, 2006 e KUO; WARES; KISSINGER, 2008), fundamentando-se na existência de estágios extracelulares, no ciclo biológico de *Cryptosporidium andersoni*, em sua multiplicação em meio de cultura livre de células (HIJJAWI et al., 2002; 2004; ROSALES; PERÉZ CORDÓN; SÁNCHEZ, 2005) e na reatividade cruzada de anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium*, com esporocistos do gênero *Monocystis*, em reação de imunofluorescência direta (BULL et al., 1998).

Todas as espécies conhecidas são monoxênicas e possuem características próprias que distinguem esse gênero de outros coccídios, como oocistos sem esporocistos e com quatro esporozoítos, ocorrência de autoinfecção (excistação de oocistos de parede fina) e presença de um vacúolo parasitóforo (localização intracelular, porém extracitoplasmática) na célula hospedeira (WARD; WANG, 2001).

A classificação das espécies do gênero *Cryptosporidium* é constantemente atualizada com o uso de métodos moleculares que, conjuntamente com estudos morfológicos, biológicos ou de especificidade por hospedeiros auxiliam na validação das espécies descritas (XIAO; CAMA, 2006). No entanto, ainda não há documentação clara e definitiva sobre quantas e quais espécies de *Cryptosporidium* infectam anfíbios, aves, mamíferos, peixes e répteis. Alguns autores sugerem a existência de 24 espécies (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; XIAO et al. 2004; SMITH et al. 2007; XIAO; FAYER, 2008; FAYER; SANTÍN, 2009; RYAN, 2010) (Quadro 1).

Cryptosporidium pode ainda ser classificado como genótipos adaptados a diversos hospedeiros. Esses genótipos, apesar de morfologicamente semelhantes a algumas espécies já classificadas, diferem delas em sua composição genética. Devido à ausência de dados relacionados às diversas características biológicas desses isolados, ainda não foi possível sua classificação em nível de espécie (XIAO et al., 2002).

Segundo Smith et al. (2007), Xiao e Fayer (2008) e Xiao e Feng (2008), pode haver mais de 33 novos genótipos, mas ainda sem classificação em nível de espécie. Como exemplo, em mamíferos há os genótipos urso, cervídeo, camundongo e suíno e, em aves, o genótipo I (NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009, MEIRELES, 2010), genótipo II (NG et al., 2006; NAKAMURA et al. 2009, MEIRELES, 2010; SEVÁ et al., 2011; NGUYEN et al., 2013), genótipo III (NG et al., 2006; NAKAMURA et al. 2009, MEIRELES, 2010, QI et al., 2011), genótipo IV (NG et al., 2006, MEIRELES, 2010) e genótipo V (ABE; MAKINO, 2010, QI et al., 2011), em várias espécies de aves. Há também descrição de cinco genótipos de gansos (JELLISON et al., 2004; XIAO et al., 2004; ZHOU et al., 2004), os genótipos de pato negro e de galinhola (MORGAN et al., 2001) e o genótipo de avestruzes, que corresponde ao genótipo II de aves (SANTOS; PEIRÓ; MEIRELES, 2005; MEIRELES et al., 2006).

Quadro 1 - Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas

Espécie	Hospedeiro	Bibliografia
<i>C. andersoni</i>	Bovinos (A)	Lindsay et al. (2000)
<i>C. baileyi</i>	Aves (B, C, TR)	Current et al. (1986)
<i>C. bovis</i>	Bovinos (ID)	Fayer et al. (2005)
<i>C. canis</i>	Caninos (ID)	Fayer et al. (2001)
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos (*D)	Robinson et al. (2010)
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>)	Ryan et al. (2008)
<i>C. felis</i>	Felinos (ID)	Iseki (1979)
<i>C. fragile</i>	Anfíbios (<i>Duttaphrynus melanostictus</i>) (E)	Jirků et al. (2008)
<i>C. galli</i>	Aves (P)	Pavlásek (1999; 2001); Ryan et al. (2003)
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>)	Power e Ryan (2008)
<i>C. meleagridis</i>	Aves, homem (ID)	Slavin (1955)
<i>C. molnari</i>	Peixes (E)	Alvarez-Pellitero e Sitjà-Bobadilla (2002)
<i>C. muris</i>	Roedores (E)	Tyzzler (1910)
<i>C. parvum</i>	Camundongo, bovinos, homem (ID)	Tyzzler (1912)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos (*D)	Fayer et al. (2008)
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos (E, ID)	Koudela e Modrý (1998)
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpentes (E)	Brownstein et al. (1977); Levine (1980); Tilley et al. (1990)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes (E, ID)	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>C. suis</i>	Suínos (ID, IG)	Ryan et al. (2004)
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, homem (ID)	Fayer et al. (2010)
<i>C. varanii*</i>	Monitor esmeralda (<i>Varanus prasinus</i>)	Pavlásek et al. (1995); Pavlásek e Ryan (2008)
<i>C. viatorum</i>	Humanos (*D)	Elwin et al. (2012)
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al. (1971)
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos (*D)	Fayer e Santin (2009)

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

* Em substituição a *C. saurophilum*. (Adaptado de XIAO; FAYER, 2008; PLUTZER; KARANIS, 2009)

1.2.1 Ciclo Biológico

Todos os estágios evolutivos de *Cryptosporidium* são muito semelhantes aos de outros coccídios pertencentes à subordem Eimeriorina, assim como seu ciclo biológico. O ciclo de vida de *Cryptosporidium* possui seis estágios de desenvolvimento dentro do organismo do hospedeiro infectado, que são: a excitação dos oocistos, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede dos oocistos e a esporogonia (SMITH; ROSE, 1998).

O ciclo se inicia com a eliminação de oocistos esporulados por um hospedeiro infectado, geralmente em fezes ou em secreções respiratórias. O hospedeiro susceptível então irá se infectar pela ingestão dos oocistos presentes em água ou alimentos ou por contato direto ou indireto com fômites. Assim, haverá excitação, liberação de quatro esporozoítos pela dissolução da sutura e a adesão desses esporozoítos na superfície das células epiteliais dos tratos gastrintestinal ou respiratório, onde serão englobados pelas microvilosidades, formando um vacúolo parasitóforo (localização intracelular extracitoplasmática). Haverá assim a diferenciação dos esporozoítos em trofozoítos, iniciando um processo de reprodução assexuada (merogonia ou esquizogonia) (CURRENT, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

Na reprodução assexuada, serão formados os merontes tipo I contendo oito merozoítos em seu interior, com formação de esquizontes tipo II, contendo quatro merozoítos em seu interior (SMITH et al., 2007). No caso do ciclo de vida de *C. baileyi*, os merontes tipo I irão passar por desenvolvimento cíclico (autoinfecção), originando novamente os trofozoítos ou então resultando em merontes tipo II que, liberando suas formas invasivas, irão se desenvolver em merontes tipo III, e assim possibilitar a formação dos estágios sexuais (CURRENT; UPTON; HAYNES, 1986). Merozoítos de segunda ou de terceira geração se diferenciam em estágios sexuais, representados por microgametócitos e macrogametócitos, que formam, respectivamente, microgametas e macrogametas (SMITH et al., 2007). Após fertilização, ocorre

formação do zigoto e, posteriormente, diferenciação em dois tipos de oocistos: os de parede fina (20%) e os de parede espessa (80%). Ambos possuem capacidade de esporulação dentro do hospedeiro, contendo em seu interior quatro esporozoítos livres. Oocistos de parede fina sofrem excitação na luz do trato gastrointestinal ou do trato respiratório, onde são capazes de iniciar uma autoinfecção, enquanto que os oocistos de parede espessa são eliminados em fezes, na forma infectante, e são altamente resistentes em condições ambientais (CURRENT, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008) (Figura 1).

A excitação de oocistos de *Cryptosporidium*, ao contrário do que ocorre em outros coccídios, ocorre sem a presença de enzimas digestivas, condições redutoras ou sais biliares, o que possibilita infecções respiratórias e em outros sítios extra-intestinais (FAYER; LEEK, 1984), embora a presença de sais biliares e de tripsina aumente a percentagem de excitação (HIJJAWI et al., 2004; SUNDERMANN; LINDSAY; BLAGBURN, 1987).

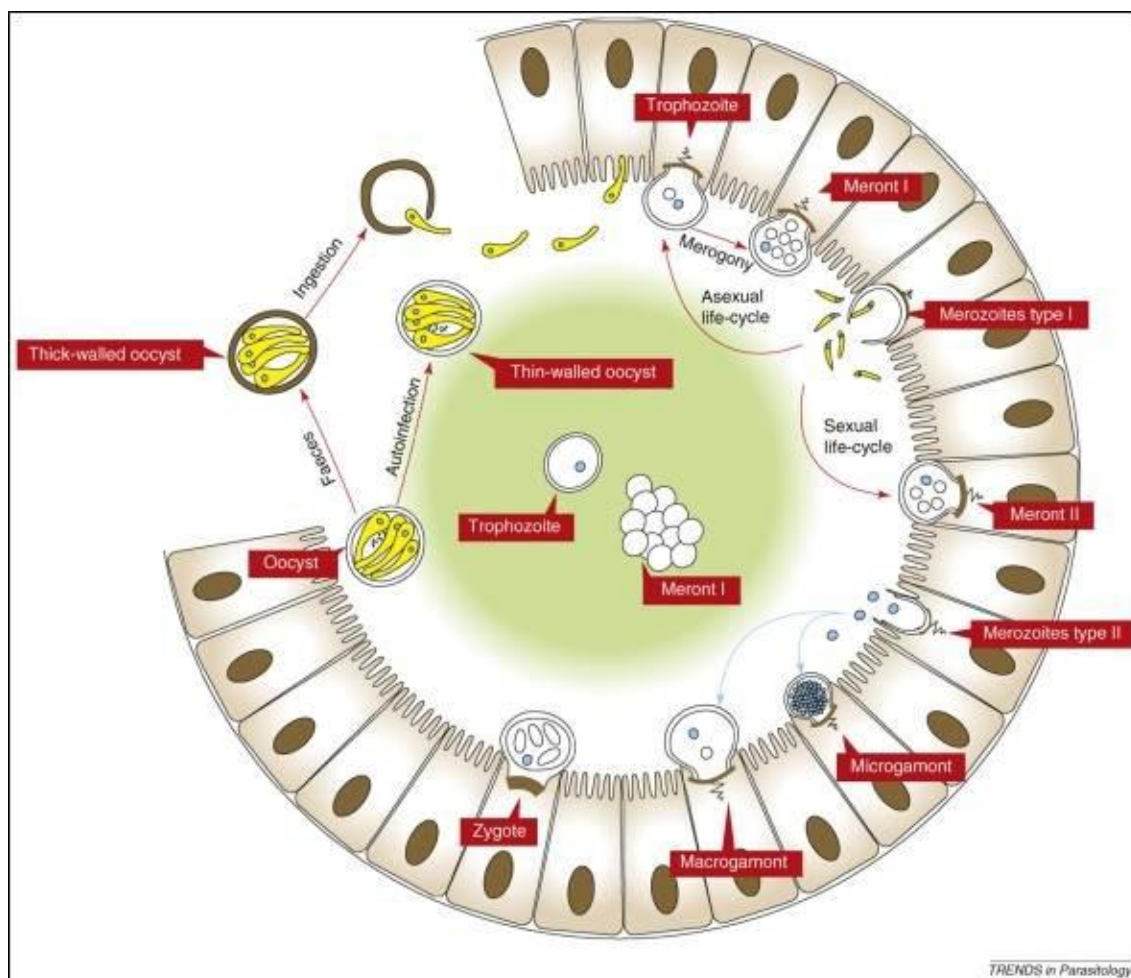
O gênero *Cryptosporidium* apresenta localização intracelular, porém, extracitoplasmática, situada dentro de uma estrutura denominada “vacúolo parasitóforo”, formada por uma membrana derivada das microvilosidades da célula epitelial. Dessa forma, essa membrana possibilita a proteção do parasito contra a resposta imune do hospedeiro. Além disso, há formação da “organela de alimentação”, que resulta da fusão da parede do parasito com a membrana celular do hospedeiro, proporcionando assim a captação de nutrientes do citoplasma da célula do hospedeiro (BOROWSKI; CLODE; THOMPSON, 2008).

Oocistos de *Cryptosporidium* de aves apresentam morfologia subesférica a ovóide e diâmetros polar e equatorial de 6.2 x 4.6 micrômetros (μm), 8.2 x 6.3 μm e 5.2 x 4.6 μm , respectivamente para *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* (CURRENT; UPTON; HAYNES, 1986; SNYDER; CURRENT; COHEN, 1988; LINDSAY; BLAGBURN; SUNDERMANN, 1989; RYAN et al., 2003).

Os períodos pré-patente e patente das espécies de *Cryptosporidium* que infectam aves são variáveis. *C. baileyi* apresenta período pré-patente de dois a sete dias e período patente de quatro a 32 dias, enquanto que *C. meleagridis* apresenta período pré-patente e patente de três a cinco dias e seis a 18 dias, respectivamente (CURRENT; UPTON; HAYNES, 1986; MEIRELES et al., 1998a; SRÉTER; VARGA, 2000; TUMOVÁ et al., 2002). O ciclo biológico de *C. galli* ainda não foi determinado. No entanto, Antunes et al. (2008) e Silva et al. (2010) relataram eliminação crônica e intermitente de pequena quantidade de oocistos dessa espécie, em Passeriformes (*Oryzoborus maximiliani*, *Oryzoborus angolensis*, *Cyanoloxia brissonii*, *Sporophila collaris*) e em Psittaciformes (*Nymphicus hollandicus*).

Os sítios de infecção variam de acordo com a espécie de *Cryptosporidium*. Enquanto *C. baileyi* infecta os epitélios do trato respiratório, da bursa de Fabricius e da cloaca (GOODWIN, 1989), *C. meleagridis* fica restrito ao intestino delgado (SLAVIN, 1955); já *C. galli* está associado a infecções no proventrículo (RYAN et al., 2003). Esporadicamente há infecção em ductos biliares e pancreáticos, conjuntiva, glândulas salivares e esofagianas e em rins, conforme relatos em que não houve identificação da espécie de *Cryptosporidium* (SRÉTER; VARGA, 2000).

Figura 1 - Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Barta e Thompson (2006)

1.2.2 Especificidade por Hospedeiros

O gênero *Cryptosporidium* possui 24 espécies descritas, além de mais de 33 genótipos classificados de acordo com o hospedeiro e análises genéticas. Na maior parte dos casos, esses genótipos relacionam-se geneticamente a outros genótipos ou espécies já classificadas, cujos hospedeiros também são geneticamente relacionados. A inter-relação genética existente entre genótipos e espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros poderia significar uma co-evolução hospedeiro-parasito (XIAO et al., 2002).

Algumas espécies de *Cryptosporidium* não se enquadram nessa teoria. Como exemplo, podemos citar *C. parvum*, que infecta mamíferos, particularmente os ruminantes e o homem, e está geneticamente mais relacionado ao genótipo de camundongos, que possui origem genética distinta de ruminantes, e *C. meleagridis*, que infecta preferencialmente aves e também o homem, e está geneticamente mais próximo a *C. parvum* e às outras espécies ou genótipos de mamíferos (XIAO et al., 2002). Considerando que algumas espécies desse protozoário possuem baixa especificidade por espécie de hospedeiro, formas evolucionárias que não envolvam somente adaptação a hospedeiros podem estar envolvidas (TANRIVERDI; WIDMER, 2006).

Infecções por *C. baileyi*, por *C. galli* e por outros genótipos de *Cryptosporidium* estão presentes em uma ampla variedade de espécies de aves, enquanto que *C. meleagridis* apresenta número mais restrito de hospedeiros aviários (SRÉTER; VARGA, 2000; NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; QI et al., 2011).

Algumas situações, como imunossupressão ou inoculações experimentais, podem fazer com que a barreira entre espécies de hospedeiros possa ser superada. Assim, Ditrich et al. (1991) descreveram o primeiro caso de infecção por *C. baileyi* em um paciente humano imunodeficiente. No entanto, nesse relato, não foi realizada classificação molecular do parasito. Posteriormente, Ditrich, Kopáček e Kucerová (1993) relatam que, apesar desse mesmo isolado ser infectante para aves, seu padrão antigênico era diferente do padrão antigênico de *C. baileyi*. Em outros estudos, por meio de inoculação intratraqueal de *C. parvum*, em galinha doméstica, Lindsay, Blagburn e Ernest (1987) e Palkovic e Marousek (1989), promoveram infecção respiratória, com desenvolvimento de sinais clínicos nos animais inoculados.

Há somente um relato de infecção natural por *C. parvum* em aves: Zylan et al. (2008) relataram infecção em alcaravão (*Burhinus oedicnemus*), na Arábia Saudita. Nakamura et al. (2009) encontraram *C. parvum* em fezes de calopsita (*Nymphicus hollandicus*), no Brasil, mas não foi determinado se havia infecção ou somente eliminação passiva de oocistos.

No caso de *C. meleagridis*, alguns trabalhos, utilizando infecção experimental, demonstraram que os oocistos são infectantes para camundongos, ratos, coelhos e bovinos (DARABUS, 1997; SRÉTER et al., 2000; DARABUS; OLARIU, 2003;). Akiyoshi et al. (2003) demonstraram que um isolado de *C. meleagridis* de origem humana promoveu infecção em camundongos, suínos e bovinos, com infectividade e virulência iguais às de *C. parvum*.

Cryptosporidium meleagridis pode ainda ser encontrado infectando o ser humano (PEDRAZA-DIAS; AMAR; MCLAUCHLIN, 2000; MORGAN et al., 2000b; GUYOT et al., 2001; TIANGTIP; JONGWUTIWES, 2002; ALVES et al., 2003; CAMA et al., 2003; GATEI et al., 2003), em alguns países com frequência semelhante ou superior a infecções por *C. parvum* (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2003). Essa espécie é considerada primariamente um parasito de células epiteliais do intestino de várias espécies de aves, particularmente de perus (SLAVIN, 1955; SRÉTER; VARGA, 2000). No entanto, ainda não há definição sobre a participação de aves na cadeia epidemiológica de infecções humanas por *C. meleagridis* (DARABUS, 1997; SRÉTER; VARGA, 2000; DARABUS; OLARIU, 2003). Essa espécie já foi encontrada no Brasil parasitando galinhas domésticas (HUBER et al., 2007; NAKAMURA et al., 2009).

Os hospedeiros naturais de *C. galli*, reconhecidos até o momento, são o curió (*Oryzoborus angolensis*), o flamingo cubano (*Phoenicopterus ruber ruber*), várias espécies de tentilhões (Spermestidae e Fringillidae), a galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*), o tetraz grande (*Tetrao urogallus*), a galinha do mato (*Tetrastes bonasia rupestris*), o cardeal do nordeste (*Paroaria dominicana*), o calau rinoceronte (*Buceros rhinoceros*), o periquito turquesa (*Neophema pulchella*), o pintarroxo de bico (*Pinicola enucleator*), o canário do reino (*Serinus canaria*), o bicudo (*Oryzoborus maximiliani*), o azulão (*Cyanoloxia brissonii*), o coleira do brejo (*Sporophila collaris*), a calopsita (*Nymphicus hollandicus*), o rouxinol messias (*Leiothrix argenteauris*) e o bohemian waxwing (*Bombycilla garrulus*) (RYAN et al., 2003; NG et al., 2006;

ANTUNES et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009; SILVA et al., 2010; QI et al., 2011).

Por meio de infecção experimental, Meireles et al. (2006) demonstraram que um isolado de avestruzes (*Struthio camelus*), com tropismo pelo epitélio cloacal, não infecta a galinha doméstica. Posteriormente, esse parasito foi encontrado por Nakamura et al. (2009) e Nguyen et al. (2013) em avestruzes e por Ng et al. (2006) e Sevá et al. (2011) em algumas espécies de psitacídeos, mas não em avestruzes, e assim foi classificado como genótipo II de aves (NG et al., 2006).

Os hospedeiros dos outros genótipos de aves são: genótipo I de aves, o canário do reino (*Serinus canaria*) (NG et al. 2006; NAKAMURA et al., 2009) e pavão azul (*Pavo cristatus*) (NAKAMURA et al., 2009) e, no caso de genótipo III de aves, várias espécies de psitacídeos (NG et al. 2006; NAKAMURA et al., 2009; MAKINO; ABE; REAVILL, 2010; QI et al., 2011) e em *red-billed blue magpie* (*Urocissa erythrorhyncha*). Já o genótipo IV de aves foi encontrado em um *japanese white-eye* (*Zosterops japonicus*) (NG et al., 2006), enquanto que o genótipo V de aves foi encontrado em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) (ABE; MAKINO; ABE; REAVILL, 2010; QI et al., 2011).

1.3 Ocorrência em Aves

A literatura relacionada à ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* em espécies aviárias é evidentemente escassa, provavelmente porque esse parasito normalmente não está relacionado aos agentes etiológicos causadores de enfermidades em aves também porque as técnicas utilizadas para diagnóstico dessa parasitose não são adotadas rotineiramente em laboratórios de ornitopatologia.

Análises epidemiológicas têm indicado a presença de infecção por *Cryptosporidium* em aves domésticas. Tzipori e Campbell (1981), por meio do

teste de imunofluorescência indireta, encontraram anticorpos anti-*Cryptosporidium* em 88% (22/25) em galinha doméstica e Snyder, Current e Cohen (1988), analisando soros de 18 lotes de frangos de corte, por meio da técnica de ELISA indireta, encontraram, em média, 24% de animais positivos por lote. Em estudo realizado por Goodwin e Brown (1988), 6,4% (64/1065) dos frangos de corte, analisados por meio de histopatologia, em 11 lotes, foram positivos para *Cryptosporidium*.

A ocorrência de *Cryptosporidium* em várias espécies de aves foi estudada também por Ley et al. (1988) que, por meio da coloração de esfregaços de fezes com a técnica da auramina O, observaram positividade em 27 entre 197 frangos de corte (13,7%), quatro entre 113 matrizes de corte (3,55%), uma entre 75 poedeiras comerciais (1,3%), um entre dois pavões (50%), seis entre 33 psitacídeos (18,2%) e um entre dois anseriformes examinados (50%).

Infecção por *C. meleagridis* foi relatada na Espanha, em surto envolvendo perdiz vermelha (*Alectoris rufa*), com morbidade entre 60-70% e mortalidade superior a 50%, e com sinais clínicos de diarreia e tosse (PAGÈS-MANTÉ et al., 2007).

A ocorrência de *Cryptosporidium* em diversas espécies de aves selvagens e domésticas tem sido demonstrada por meio de estudos epidemiológicos. Na Austrália, Ng et al. (2006) encontraram positividade de 6,25% para *Cryptosporidium*, em um total de 430 amostras fecais, analisadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Em estudo desenvolvido na China, Qi et al. (2011) encontraram prevalência de 8,1% para *Cryptosporidium*, de um total de 343 amostras fecais de aves avaliadas pela PCR.

Em um estudo mais recente, Nguyen et al. (2013) encontraram prevalência de 23,7% em uma fazenda de avestruzes no Vietnã, de um total de 464 amostras analisadas pelo método de coloração modificada de Ziehl-Neelsen, com intensidade de infecção maior no grupo de avestruzes de idade variando entre 61 e 90 dias.

1.3.1 Ocorrência em Aves no Brasil

São raros os relatos de infecção por *Cryptosporidium* em aves no território brasileiro. *C. baileyi* foi detectado em cortes histológicos da bursa de Fabricius de frangos de corte nos Estados de São Paulo (LUVIZOTTO et al., 1989; KONDO et al., 1994) e Rio de Janeiro (MEIRELES; RODRIGUES; CARVALHO, 1990; MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992) e é a espécie mais frequentemente encontrada em galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*).

Meireles e Figueiredo (1992) reportaram o primeiro isolamento e identificação de *C. baileyi* em aves, no Brasil. Posteriormente, Meireles et al. (1998a, 1998b, 1999), utilizando infecção experimental com esse isolado, estudaram os aspectos zootécnicos, a patogenia e a interação desse parasito com *Escherichia coli*, no trato respiratório de frangos de corte.

Infecção por *C. baileyi* foi relatada também por Cardozo, Teixeira Filho e Lopes (2005), em galinha doméstica e por Huber et al. (2007), em codornas e patos.

No estado de São Paulo, foram encontradas avestruzes apresentando prolapso de cloaca associado à mortalidade e infecção nos epitélios do cólon, cloaca e bursa de Fabricius; os oocistos apresentavam morfologia e morfometria semelhantes às de *C. baileyi* (RIERA et al., 2003). Em estudos posteriores, esse isolado foi classificado como um novo genótipo de avestruzes (SANTOS; PEIRÓ; MEIRELES, 2005; MEIRELES et al., 2006).

Jacobsen et al. (2006) relataram infecção por *Cryptosporidium* em intestinos, bursa de Fabricius e traquéia de frangos, sem classificação da espécie.

Nakamura et al. (2009) encontraram positividade de 4,86% para *Cryptosporidium*, em um total de 966 amostras fecais, analisadas pela PCR. Nesse estudo, houve identificação de *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis*, *C.*

parvum e *Cryptosporidium* genótipos I, II e III de aves.

Relatos no Brasil de infecção crônica por *C. galli* foram feitos por Antunes et al. (2008) em curió, calopsita e canário do reino e por Silva et al. (2010) em curió, bicudo, azulão e coleira do brejo.

Sevá et al. (2011) realizaram a classificação molecular de aves de vida livre no Brasil e encontraram positividade de 6,6% (16/242) para *Cryptosporidium* em amostras fecais de várias espécies de aves. Houve identificação de *C. galli*, *C. baileyi* e *Cryptosporidium* genótipo II de aves.

1.4 Infecção em Galinha Doméstica

A galinha doméstica é infectada mais comumente por duas espécies de *Cryptosporidium*: *C. baileyi*, na bursa de Fabricius, reto, cloaca e trato respiratório e, com menor frequência, com *C. meleagridis*, no intestino delgado (SRÉTER; VARGA, 2000).

C. baileyi infecta o trato respiratório, bursa de Fabricius e cloaca da galinha doméstica e de outras aves (CURRENT; UPTON; HAYNES, 1986; GOODWIN et al., 1988a; MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992; MEIRELES et al., 1999; SRÉTER; VARGA, 2000).

Fletcher, Munnell e Page (1975) fizeram o primeiro relato da infecção na bursa de Fabricius, por *C. baileyi*, em três lotes de frangos de corte com seis, sete e 17 semanas de idade. As aves, com sete e 17 semanas, apresentaram também associação com a doença de Marek. O epitélio da bursa de Fabricius encontrava-se com intensa hiperplasia e infiltração de heterófilos.

Infecção respiratória em frangos de corte foi detectada, pela primeira vez, por Dhillon et al. (1981), em aves com sete semanas de vida, provenientes de um lote de 16.000 animais. Na traquéia, havia presença de exsudato, além de

petéquias no seio nasal. Ao exame microscópico, a mucosa da traquéia apresentava dilatação cística das glândulas, infiltração de histiócitos, linfócitos e heterófilos, perda de cílios e metaplasia escamosa do epitélio. *Cryptosporidium* sp. foi descrito como numerosos organismos ácido periódico de Schiff (PAS) positivos, de 2 a 3,5 μm de diâmetro, aderidos à borda ciliada do epitélio e na superfície luminal das glândulas mucosas. *Adenovirus* foi isolado da traquéia, no entanto, seu efeito no curso da infecção não pôde ser determinado.

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

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

Goodwin et al. (1996), analisando a correlação entre traqueíte em frangos de corte, causada por *C. baileyi*, com o desenvolvimento ponderal e a condenação de carcaças em abatedouros, encontraram infecção por essa espécie em 10-60% dos lotes infectados, havendo correlação positiva entre o grau de traqueíte com o percentual de queda de ganho de peso, a presença de aerossaculite e a porcentagem de condenação de carcaças.

A influência da infecção por *C. baileyi*, após inoculação via oral ou intratraqueal, nos parâmetros zootécnicos de frangos de corte alojados em gaiolas, foi estudada por Meireles et al. (1998a). Nessa ocasião houve redução transitória do ganho de peso das aves infectadas, no período em que foi

observada maior eliminação de oocistos nas fezes. Quando experimento semelhante foi realizado, mas com alojamento das aves em piso, além de inoculação experimental de *Escherichia coli*, via respiratória, foi observado que *C. baileyi* predispõe as aves à infecção secundária por *E. coli*, além de ser agente primário de enfermidade respiratória severa (MEIRELES et al., 1999).

Blagburn et al. (1991) também estudou a interação de *C. baileyi* com outros agentes (*E. coli* e vírus da bronquite infecciosa), no trato respiratório de frangos de corte, e relataram sinergismo entre os agentes, no que se refere ao aumento de severidade no grau de inflamação, principalmente no pulmão e sacos aéreos.

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

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

Goodwin e Brown (1989) descreveram 10 casos de infecção intestinal, em frangos de corte, por meio da análise de cortes histológicos, processados no período de agosto de 1985 a setembro de 1987. As vilosidades parasitadas apresentavam-se atrofiadas, com hipertrofia de criptas e infiltração de heterófilos, linfócitos, macrófagos e plasmócitos na lâmina própria. Embora as aves infectadas apresentassem sinais clínicos, somente metade dos casos estava associada à doença gastrointestinal.

1.5 Infecção em Perus

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

Cryptosporidium sp. foi identificado, pela primeira vez, no epitélio dos seios nasais, traquéia e brônquios de perus que apresentavam sintomas respiratórios e alto índice de mortalidade (HOERR; RANCK; HASTINGS, 1978). Havia broncopneumonia caracterizada por necrose, envolvendo os parabronquios, átrios e capilares aéreos, além de hemorragia, infiltração por heterófilos, células gigantes e colônias bacterianas.

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

Em perus, a infecção por *C. meleagridis* apresenta característica subclínica (BERMUDEZ et al., 1988; WOODMANSEE et al., 1988) ou manifestação clínica de um quadro de enterite (SLAVIN, 1955; GOODWIN et al., 1988b), em alguns casos associada a outros agentes infecciosos (WAGES; FICKEN, 1989).

No Irã, Gharagozlou et al. (2006) descreveram infecção por *Cryptosporidium* sp. em 17 (35,3%) de um total de 60 perus, com idade variando de uma a sete semanas, que apresentavam emaciação, diarreia,

letargia e redução no ganho de peso; os oocistos foram visualizados nas criptas do epitélio intestinal, principalmente jejuno e íleo.

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

1.6 Infecção em Codornas

Infecção por *Cryptosporidium* spp. em codornas, no trato gastrointestinal ou respiratório, parece ser semelhante à que ocorre em outras espécies de aves. Apesar de os isolados de *Cryptosporidium* não terem sido classificados, em nível de espécie, provavelmente as espécies que infectam o intestino e o trato respiratório sejam respectivamente, *C. meleagridis* e *C. baileyi*.

O primeiro relato de criptosporidiose em codornas foi feito por Tham, Kniesberg e Dixon et al. (1982). Um lote de 1.000 aves, de quatro semanas de idade, apresentava sinais clínicos caracterizados por depressão, espirros e dificuldade respiratória, com morbidade de 50% e mortalidade de 10%.

Alto índice de mortalidade foi registrado em codornas por Hoerr, Current e Haynes (1986), em um lote de 2.500 animais. Em cinco lotes anteriores e sucessivos, as aves apresentavam diarreia. Macroscopicamente, o intestino delgado mostrou-se com fluido claro e aquoso e o ceco distendido com fluido marrom e espumoso. As lesões microscópicas foram caracterizadas por atrofia das vilosidades intestinais e presença de enterócitos descamados da superfície, além de colonização epitelial por *Cryptosporidium* sp..

Lesões semelhantes foram relatadas em codornas que apresentavam diarreia e alto índice de mortalidade; *Reovirus* e *Cryptosporidium* sp. foram isolados de amostras fecais (RITTER et al., 1986).

Murakami et al. (2002) relataram presença de conjuntivite, traqueíte e sinusite, com presença de infecção por *Cryptosporidium* sp. associado a *Mycoplasma gallisepticum*, com morbidade de 48% (36.000/75.000) e mortalidade de 5,7% por dia.

Cardozo, Teixeira Filho e Lopes (2005) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* sp. em bursa de Fabricius e cloaca de codornas, após inoculação experimental com o protozoário originado de frangos naturalmente infectados.

1.7 Infecção em Avestruzes

Em avestruzes, há relatos de infecção subclínica (GAJADHAR, 1993), prolapso de phallus e cloaca (ALLWRIGHT; WESSELS, 1993; BEZUIDENHOUT; PENRITH; BURGER, 1993; PENRITH; BURGER, 1993; PENRITH et al. 1994) e necrose pancreática (JARDINE; VERWOERD, 1997).

No estado de São Paulo foram encontrados avestruzes apresentando prolapso de cloaca, associado à presença de mortalidade. Essas aves apresentavam infecção nos epitélios do reto, cloaca e bursa de Fabricius e oocistos com características morfológicas e moleculares (PCR-RFLP) semelhante às de *C. baileyi* (RIEIRA et al., 2003; SANTOS; PEIRÓ; MEIRELES, 2005). Análise molecular posterior demonstrou que o isolado de avestruz provavelmente representa uma nova espécie de *Cryptosporidium* relacionada filogeneticamente a *C. baileyi* (MEIRELES et al., 2006) e que posteriormente foi classificada por Ng et al. (2006) como genótipo II de aves.

Recentemente, em uma fazenda de avestruzes no Vietnã, Nguyen et al. (2013) encontraram em animais assintomáticos, prevalência de 23,7% para *Cryptosporidium* de um total de 464 amostras fecais. Posteriormente, após análise molecular, foi detectada a presença de somente *Cryptosporidium* genótipo II de aves acometendo esses animais.

1.8 Infecção em Aves Selvagens

Cryptosporidium spp. já foi encontrado parasitando diversas ordens de aves selvagens, associado ou não à presença de sinais clínicos.

1.8.1 Anseriformes

Proctor e Kemp (1974) detectaram *Cryptosporidium* sp. no intestino grosso de cinco gansos de 14 dias de idade. Foram observados somente esquizontes e macrogametas aderidos à superfície epitelial, que apresentava perda ou encurtamento das microvilosidades no ponto de adesão do parasito e em áreas adjacentes.

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

Em pesquisa de oocistos em aves de vida livre, Graczyk, Fayer e Trout (1998) demonstraram que gansos (*Branta canadensis*) podem atuar como fonte de contaminação ambiental, por meio de eliminação de oocistos de *C. parvum* nas fezes.

Zhou et al. (2004) constataram que 23,4% (49/209) das amostras de fezes de gansos (*B. canadensis*) analisadas eram positivas para

Cryptosporidium sp.. Entre as espécies identificadas, estavam os genótipos I e II de ganso, genótipo de pato, *C. parvum* e *C. hominis*. Recentemente, Jellison et al. (2004) pesquisaram a presença de *Cryptosporidium* em gansos, que identificaram mais cinco novos genótipos de *Cryptosporidium* e por Kassa, Harrington e Bisesi (2004) que, em dois períodos de colheita, encontraram, utilizando a técnica de ELISA direta, prevalência de *Cryptosporidium* sp. em 81,8% (9/11) e 90% (9/10).

1.8.2 Passeriformes

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

Na literatura há alguns relatos de criptosporidiose clínica em passeriformes (LINDSAY et al., 1991; CLUBB, 1997), mas ainda persiste indefinição sobre o patogenicidade de *Cryptosporidium* spp. nessas aves. Segundo Antunes et al. (2008), Nakamura et al. (2009) e Silva et al. (2010), infecções por *C. galli* poderiam ser responsáveis por proventriculite crônica em aves, predispondo-as a infecções secundárias por outros patógenos. Ainda não há na literatura muitos trabalhos publicados sobre aspectos clínicos de *Cryptosporidium* spp. em passeriformes. É de extrema importância a pesquisa da doença nessa ordem, uma vez que algumas espécies como o curió (*Oryzoborus angolensis*) podem apresentar valor comercial extremamente alto, principalmente por características como a melodia de seu canto, elegância e conhecimentos já adquiridos de manejo em cativeiro, que faz com que essa espécie esteja entre os pássaros canoros mais valiosos do país (<http://www.wikiaves.com.br/curio>).

1.8.3 Psittaciformes

Ley et al. (1988), utilizando a coloração de esfregaços de fezes, de várias espécies aviárias, com a técnica de Auramina O, relataram pela primeira vez a infecção por *Cryptosporidium* sp. em periquitos e araras.

Em relação à Ordem Psittaciformes, Morgan et al. (2000a) constataram infecção por *C. meleagridis* em epitélio das vilosidades do intestino delgado em um “Ring-neck” (*Psitacula krameri*). Doster e Mahafey (1979), mediante utilização de microscopias ótica e eletrônica, descreveram estágios evolutivos de *Cryptosporidium* sp. na cloaca de papagaios diadema (*Amazona autumnalis*).

Infecção intestinal por *Cryptosporidium* sp., associada a sinais clínicos, foi encontrada em periquitos australianos (GOODWIN; KRABILL, 1989), calopsitas (GOODWIN; KABRILL, 1989; LINDSAY; BLAGBURN; HOERR, 1990) e, com alto índice de mortalidade, em agapornis (*Agapornis* sp.) (BELTON; POWEL, 1987).

Makino, Abe e Reavill (2010) relataram, em periquitos agapornis (*Agapornis roseicollis*), a presença de *Cryptosporidium* genótipo III de aves em epitélio dos ductos das glândulas do proventrículo e em amostras fecais de aves apresentando quadro clínico de vômito crônico e perda de peso, sugerindo assim que o parasito seja um possível agente causador da enfermidade crônica.

1.8.4 Galliformes

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

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

Em perdizes (*Alectoris rufa*), há um relato de infecção por *C. meleagridis*, causando enterite em um lote com 60 casais de aves reprodutoras, de 4-25 dias de idade, com morbidade de 60-70% e mortalidade de 70%. Nessa mesma propriedade, em um surto posterior, foi observada mortalidade de 89% em um lote de 450 aves. Havia presença de estágios evolutivos de *Cryptosporidium* no trato respiratório e no intestino. Como a caracterização molecular foi realizada somente em conteúdo intestinal, com identificação de *C. meleagridis*, os autores sugerem que a infecção respiratória poderia ser causada por *C. meleagridis*, em localização não usual, ou haveria co-infecção por *C. baileyi* (PAGÈS-MANTÉ et al., 2007).

1.8.5 Falconiformes

Van Zeeland et al. (2008) reportaram infecção por *C. baileyi* no trato respiratório superior de três falcões híbridos (*Falco rusticolus* X *Falco cherrug*) que apresentavam dispnéia e vieram a óbito após algumas semanas.

1.8.6 Charadriiformes

Em alcaravão (*Burhinus oedicephalus*), Zylan et al. (2008), na Arábia Saudita, relataram o primeiro caso de enterite por *C. parvum*, em aves.

1.9 Criptosporidiose Aviária em Saúde Pública

A infecção em seres 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 (MILLARD et al., 1994; SULAIMAN et al., 1998; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002; PREISER et al., 2003).

No entanto, pela utilização de técnicas de biologia molecular, foi possível a identificação de *C. canis* (PIENIAZEK et al., 1999; PEDRAZA-DIAS et al., 2001; CAMA et al., 2003; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) *C. felis* (PEDRAZA-DIAS et al., 2001; CAMA et al., 2003; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008), *C. meleagridis* (MCLAUHLIN et al., 2000; PEDRAZA-DIAS; AMAR; MCLAUHLIN, 2000; XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2003; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) *C. muris* (GUYOT et al., 2001; TIANGTIP; JONGWUTWES, 2002; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008), *Cryptosporidium suis* (SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008), e os genótipos suíno II (CAMA et al., 2003; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008), cervídeo (ONG et al., 2002; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) e macaco (SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) de *Cryptosporidium* 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 (OLSON et al., 2004; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

Cryptosporidium tem sido detectado em superfície de águas, seja de redes de esgotos ou em redes públicas de fornecimento de água. Surtos de criptosporidiose têm sido relatados em populações humanas por todo o mundo e algumas das possíveis explicações seriam: 1) grande quantidade de oocistos que são excretados por hospedeiros infectados; 2) dose pequena de oocistos requerida para infecção (menos de 10 oocistos); 3) baixa especificidade por

hospedeiros mamíferos (particularmente *C. parvum*); 4) o pequeno tamanho dos oocistos; 5) o fato de os oocistos serem resistentes à inativação, em condições ambientais, e à ação do cloro utilizado no tratamento de água; 5) baixa velocidade de sedimentação na água; 6) o fato de os oocistos já serem eliminados esporulados nas fezes e, conseqüentemente, na forma infectante (OKHUYSEN, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000; SMITH et al., 2007).

Como surtos de criptosporidiose humana podem ter como origem água de bebida e destinada a lazer, animais domésticos e silvestres, sejam mamíferos ou aves, podem atuar como fontes de infecção deste parasito para o ser humano, por meio de contaminação de reservatórios de água (DILLINGHAMA et al., 2002; OLSON et al., 2004; GRACZYK et al., 2007).

A contaminação da água de bebida provém de várias fontes, como esgoto, rios, lagos (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000) e fezes de animais, principalmente bovinos (PENG et al., 1997). Graczyk et al. (1996a, 1997a), Graczyk, Fayer e Cranfield (1997b) e Graczyk, Fayer e Trout (1998) relataram eliminação de oocistos de *C. parvum* e *C. hominis* em fezes de gansos (*B. canadensis*) e sugeriram a possível participação desses animais na epidemiologia de criptosporidiose humana. Da mesma maneira, Jellison et al. (2007) e Ziegler et al. (2007) sugerem que aves podem ser fonte de *Cryptosporidium* spp. em casos de contaminação de reservatórios de água.

Estudos epidemiológicos indicam que a prevalência da espécie que infecta o homem varia de acordo com a região. Em Portugal, de 29 amostras humanas examinadas, 16 eram *C. parvum* e sete, *C. hominis* (ALVES et al., 2003). No Reino Unido, Suíça e França, *C. parvum* também é responsável pela maioria das infecções humanas (ALVES et al., 2000; McLAUHLIN et al., 2000; MORGAN et al., 2000b; GUYOT et al., 2001). Já nos Estados Unidos, Austrália, Kenya, Tailândia e África do Sul, *C. hominis* é a espécie mais prevalente em infecções humanas (MORGAN et al., 2000b; LEAV et al., 2002; TIANGTIP; JONGWUTIWES, 2002). Na república Tcheca, de 11 isolados humanos, um era *C. meleagridis*, um *C. hominis* e nove *C. parvum* (HAJDUSEK; DITRICH; SLAPETA, 2004). Na América do Sul, Xiao et al.

(2001) encontraram, em 132 amostras de fezes de crianças, no Peru, infecção por *C. hominis* (67), *C. parvum* (8), *C. meleagridis* (7), *C. canis* (2) e *C. felis* (1).

Araújo et al. (2008) identificaram *C. hominis* (8/14), *C. parvum* (4/14) e *C. meleagridis* (2/14), em amostras de crianças e de pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), no estado de São Paulo. Há mais quatro relatos de classificação molecular de *Cryptosporidium* no Brasil, com identificação de *C. hominis* e *C. parvum* (BRANTLEY et al., 2003; GATEI et al., 2003; BUSHEN et al., 2006; GONÇALVES et al., 2006).

Em estudo com crianças, no Peru, Cama et al. (2008) observaram que infecções por *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* e *C. parvum* apresentam quadro clínico com menor gravidade do que infecções por *C. hominis*.

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 (DARABUS, 1997; SRÉTER; VARGA, 2000; CAMA et al., 2003; DARABUS; OLARIU, 2003; XIAO; FENG, 2008). Trabalhos utilizando infecção experimental demonstraram que oocistos de *C. meleagridis* são infectantes para camundongos, ratos, coelhos e bovinos (DARABUS, 1997; SRÉTER; VARGA, 2000; DARABUS; OLARIU, 2003), evidenciando que essa espécie, além de infectar aves, também pode promover infecção em mamíferos. Akiyoshi et al. (2003) demonstraram que um isolado de *C. meleagridis* de origem humana promoveu infecção em camundongos, suínos e bovinos, com infectividade e virulência iguais as de *C. parvum*.

1.10 Diagnóstico

A experiência é um fator fundamental para diagnóstico de criptosporidiose, uma vez que os oocistos e outros estágios de desenvolvimento do gênero *Cryptosporidium* estão entre os menores entre os

coccídios que infectam aves e também pelo fato de que os oocistos são muito similares às leveduras em tamanho e forma (SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004).

O ideal para identificação de *Cryptosporidium* é uma abordagem polifásica, utilizando-se técnicas moleculares, análise morfológica de oocistos e características biológicas, como especificidade por hospedeiro, patogenicidade, períodos pré-patente e patente e intensidade de excreção de oocistos (EGYED et al., 2002).

Oocistos de *Cryptosporidium* apresentam morfologia subsférica a ovóide e diâmetros polar e equatorial de 6.2 x 4.6 µm, 8.2 x 6.3 µm e 5.2 x 4.6 µm, respectivamente para *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* (SNYDER; CURRENT; COHEN, 1988; LINDSAY; CURRENT; COHEN, 1989; RYAN et al., 2003). Apesar de oocistos de *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* apresentarem morfologia e morfometria distintas, não é possível a definição da espécie somente pela análise de características morfológicas ou morfométricas.

A análise morfológica de oocistos não é definitiva para diagnóstico, pois os oocistos são muito pequenos, com pequena variação morfológica ou mesmo idênticos entre as diferentes espécies, sem esporocistos e difíceis de serem visualizados (MORGAN et al., 1999a; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; FALL et al., 2003). Além disso, os antígenos presentes na parede de oocistos são conservados para todo o gênero *Cryptosporidium*, não sendo possível a diferenciação entre espécies por testes imunológicos (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000).

1.10.1 Visualização de Oocistos e Outros Estágios Evolutivos por Métodos de Concentração e/ou Coloração

O método mais barato e geralmente de escolha para detecção de oocistos, a partir de amostras fecais, é o método de centrífugo-flutuação em

solução de Sheather (CURRENT, 1990). As amostras devem ser examinadas rapidamente, uma vez que longas exposições dos oocistos a soluções de alta densidade podem resultar em resultados errôneos devido à ocorrência de distorções ou rompimento da parede dos oocistos. Para visualização dos oocistos, pode ser utilizada a microscopia óptica de campo claro ou de contraste de fase (XIAO; FENG, 2008). Os oocistos são visualizados como estruturas brilhantes, contendo grânulos negros, em microscopia de contraste de fase, ou como estruturas translúcidas, com coloração levemente rósea e com grânulos em seu interior, em microscopia óptica de campo claro (SRÉTER; VARGA, 2000). A diferenciação de leveduras nesse tipo de leitura é fácil, uma vez que não irão apresentar essa coloração rósea ou grânulos interiores, características típicas de oocistos *Cryptosporidium* em solução de Sheather (CURRENT, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000).

Outras técnicas utilizadas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* são a coloração negativa com verde malaquita, na qual os oocistos são visualizados como estruturas brilhantes envoltas por um fundo verde (ELLIOT; MORGAN; THOMPSON, 1999), e a técnica de Kinyoun (álcool ácido resistente), na qual os oocistos apresentam coloração rósea a vermelha, contra um fundo verde (MA; SOAVE, 1983).

Várias técnicas de coloração podem ser empregadas para visualização de *Cryptosporidium* em tecidos. Esfregaços de mucosas corados com a técnica de Kinyoun permitem excelente visualização de estágios evolutivos de *Cryptosporidium* (LATIMER; GOODWIN; DAVIS, 1988). A técnica mais utilizada para coloração de cortes histológicos é a hematoxilina-eosina (HE), na qual os estágios evolutivos são visualizados como corpos esféricos basófilos, de 2,0 - 7,5 μm , na superfície das células epiteliais (dependendo do estágio do ciclo biológico). Outras técnicas utilizadas são as colorações à base de prata e ácido periódico de Schiff (PAS). Técnicas de microscopia eletrônica, de transmissão ou de varredura, são utilizadas para visualização da morfologia ultra-estrutural desse parasito (PETRY, 2004; VALIGUROVÁ et al., 2008).

1.10.2 Métodos Imunológicos e Moleculares

O custo geralmente elevado de técnicas de biologia molecular e sorológicas, quando comparado ao custo de métodos de identificação morfológica de *Cryptosporidium*, em amostras fecais, faz com que métodos diagnósticos baseados em princípios imunológicos e principalmente moleculares, para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., não sejam utilizados rotineiramente em laboratórios de diagnóstico.

Dentre esses métodos, se destacam o ensaio imunoenzimático (ELISA) (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; SILVA et al., 2003; JEX et al., 2008), utilizado em estudos epidemiológicos, e a reação de imunofluorescência direta (IFD) (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; BIALEK; BINDER; DIETZ, 2002; JEX et al., 2008), ambos baseados em princípios imunológicos. Dentre os métodos moleculares, o mais utilizado é a reação em cadeia da polimerase (PCR) (BALATBAT et al., 1996; MORGAN; THOMPSON, 1998; JEX et al., 2008).

Em geral, os métodos imunológicos apresentam sensibilidade superior às técnicas de coloração (ARROWOOD; STERLING, 1989; JOHNSTON et al., 2003). Em relação à PCR, devido às variações do método de extração de DNA, do gene utilizado e do protocolo da reação, e à presença de inibidores da PCR presentes em DNA, extraído de amostras fecais (CAREY; LEE; TREVORS, 2004), há relatos de resultados superiores (MORGAN et al., 1998b), similares (BIALEK; BINDER; DIETZ, 2002) ou inferiores (MAGI et al., 2006), quando essa técnica é comparada com métodos imunológicos ou de coloração.

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* é realizada mais comumente por meio da PCR e suas variantes, seguida da técnica de análise no tamanho dos fragmentos amplificados por PCR e digeridos por enzimas de restrição (RFLP) ou de sequenciamento dos fragmentos amplificados. O locus utilizados com mais frequência é o gene da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico (18S rRNA), que apresenta cinco cópias por genoma e menor polimorfismo, pelo fato de apresentar evolução mais lenta, sendo portanto, o

locus de escolha para amostras de animais que possam estar infectados por espécies ou genótipos ainda não classificados (SPANNO et al., 1998; XIAO et al., 1999a; MORGAN et al., 2000a; XIAO et al., 2000a).

Outros *loci* utilizados são aqueles com maior polimorfismo, como os genes da actina (SULAIMAN; LAL; XIAO, 2002), da proteína do choque térmico-HSP-70 (MORGAN et al., 1999b) e da proteína da parede de oocistos-COWP (XIAO et al., 2000b). Esses *loci* apresentam alto polimorfismo interespecies e, conseqüentemente, são muito úteis na análise genética de espécies ou genótipos geneticamente similares, como *C. baileyi* e *Cryptosporidium* sp. de avestruzes (XIAO et al., 2004).

Outra técnica que pode ser utilizada para diagnóstico da enfermidade é a PCR em tempo real, como um método alternativo à PCR convencional, e proporciona um resultado mais rápido, a diminuição de possíveis contaminantes no laboratório (*amplicons*), a ausência de necessidade de procedimentos após o término da PCR, como a eletroforese, e a possibilidade da visualização de resultados preliminares antes do término da reação. Na literatura há vários relatos do uso dessa técnica para diagnóstico ou diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium*, principalmente *C. parvum* e *C. hominis* em humanos (STROUP et al., 2006; JOTHIKUMAR et al., 2008).

Recentemente, Homem et al. (2012) desenvolveram a PCR em tempo real, tendo como alvo o gene da actina, para detecção de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros.

Em aves não existe nenhum estudo sobre a utilização PCR em tempo real para a detecção de *Cryptosporidium*. STROUP et al (2006) estudaram PCR em tempo real para diagnóstico de *C. parvum* e *C. meleagridis* em humanos, sugerindo que essa técnica pode ser empregada para diagnóstico e em surtos, em substituição à *nested-PCR*. LIMOR et al. (2002) utilizaram a PCR em tempo real com análise da curva de dissociação para diferenciação diversas espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, incluindo *C. meleagridis* e *C.*

baileyi. Não existem dados sobre o uso da PCR em tempo real para detecção de *C. galli* e de outros genótipos encontrados em aves.

1.11 Justificativa para o desenvolvimento do projeto

A determinação da ocorrência de *C. galli* em amostras fecais de aves, por meio da PCR em tempo real, como proposto neste projeto, é inédita. É importante ressaltar que o diagnóstico de criptosporidiose em aves, principalmente em Passeriformes e Psittaciformes, por meio de detecção de oocistos ou DNA do parasito, em amostras fecais, é extremamente difícil, devido à eliminação intermitente e, na maioria dos casos, à pequena quantidade de oocistos nas fezes.

Neste experimento foi realizado também o desenvolvimento da PCR em tempo real para detecção de *Cryptosporidium* genótipo III de aves, que não estava prevista nos objetivos iniciais deste trabalho. Desse modo, uma PCR duplex em tempo real (dPCR em tempo real) foi padronizada para detecção simultânea das duas espécies gástricas de *Cryptosporidium* de aves.

A escolha das espécies de *Cryptosporidium* para o presente estudo teve como critério principal a importância clínica em aves. Para a indústria avícola, *C. baileyi* e *C. meleagridis* provavelmente não possuem importância econômica. A crescente relevância da criação de aves para fins ornamentais e *pets* justifica a importância desse projeto, pelas possíveis perdas ocasionadas por infecções gástricas crônicas, decorrentes de parasitismo por *C. galli* e pelo *Cryptosporidium* genótipo III de aves; também é importante ressaltar a inexistência de um tratamento específico e eficiente contra a criptosporidiose.

Dessa forma, foram escolhidos os dois alvos do estudo, *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, uma vez que há poucos estudos relacionados às duas espécies; ambos são parasitos do proventrículo de aves,

principalmente das ordens Passeriformes e Psittaciformes, e estão relacionados com infecções gástricas crônicas semelhantes à infecção por *Cryptosporidium serpentis*, em serpentes. Como são poucos os relatos das duas espécies em aves, ainda não estão definidas sua importância e patogenicidade. Existe a possibilidade de que esses parasitos sejam agentes causadores de enfermidade crônica, debilitante e fatal, associados ou não a outros agentes etiológicos.

Como a detecção de DNA de *C. galli* e de *Cryptosporidium* genótipo III de aves em amostras fecais de passeriformes e psittaciformes é difícil, principalmente pela pequena quantidade de oocistos liberados nas fezes, o que pode resultar em diagnóstico falso-negativo, o teste diagnóstico escolhido para o presente trabalho teve como critérios de escolha a rapidez, eficiência e sensibilidade superiores aos métodos já utilizados para a detecção do parasito. Assim, a PCR em tempo real foi o teste de escolha, uma vez que é considerado um método altamente sensível para determinação de uma sequência-alvo específica e por proporcionar resultados em menor tempo, quando comparada com técnicas convencionais de PCR, como a *nested*-PCR (*nPCR*).

2 OBJETIVOS

O projeto teve com objetivo o desenvolvimento da PCR duplex em tempo real, tendo como alvo o gene 18S rRNA, por meio de ensaio *TaqMan*, para detecção de DNA de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves em amostras fecais e avaliar os atributos diagnósticos da PCR duplex em tempo real quando comparada à *nested-PCR*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este projeto foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), protocolado sob o número 1614/2009. Todo o procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, campus de Araçatuba e no laboratório da DNApta Biotecnologia Ltda, em São José do Rio Preto.

3.2 Amostras de Fezes

Foram colhidas 1027 amostras fecais de aves provenientes do centro de triagem de animais silvestres, da Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre da prefeitura da cidade de São Paulo (DEPAVE III) e do hospital veterinário (HV-FMVA-Unesp-Araçatuba), onde são realizados atendimentos clínicos ou triagem de uma grande diversidade de espécies de aves, principalmente provenientes de tráfico e apreensão, no Estado de São Paulo. As aves presentes nesses locais geralmente apresentam algum tipo de enfermidade infecciosa ou parasitária, as quais afloram nesses abrigos pela alta densidade populacional de animais alojados. O critério de escolha das espécies pesquisadas foi a disponibilidade nos locais de coleta durante o experimento. Sendo assim, foram selecionadas aves das ordens Psittaciformes e Passeriformes, uma vez que são as espécies mais comumente encontradas em centros de triagem por serem mais apreciadas por traficantes de aves, por sua beleza e melodia de canto. As amostras foram processadas no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal

da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP, campus de Araçatuba.

3.3 Concentração e purificação de oocistos de *Cryptosporidium*

As amostras foram coletadas em tubos tipo Falcon de 50 mL, de acordo com a quantidade disponível, no mínimo três gramas de fezes, de aves mantidas em recintos individuais, separadas por espécie, e armazenadas sob refrigeração a 4 graus Celsius (°C), em solução de bicromato de potássio 5% (concentração final de 2,5%). As amostras foram coadas em peneiras de plástico descartáveis e submetidas à concentração e purificação de oocistos por centrífugo-flutuação em solução de Sheather (CURRENT, 1990), com o processo sendo repetido pelo menos mais duas vezes para cada amostra, para recuperação do maior número de oocistos possível, já que há eliminação de pequena quantidade de oocistos em fezes. O sedimento dos processos de purificação foi separado em duas alíquotas, sendo uma das alíquotas armazenada em solução de bicromato de potássio 2,5% (concentração final), na proporção de 1:1, a 4°C, e a outra foi congelada a -20°C, para posterior extração do DNA genômico.

3.4 Extração de DNA genômico de *Cryptosporidium* spp.

Uma alíquota contendo aproximadamente 100 miligramas (mg) do sedimento resultante da purificação das amostras fecais foi diluída em 300 microlitros (µL) de tampão de lise (10 milimolar (mM) Tris; 10 mM EDTA; polivinilpirrolidona 1%; chelex 100 12,5%), sódio dodecil sulfato 0,5%, e homogeneizada em vortex. As amostras foram submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido por um minuto e descongelamento a 65°C por três minutos, por cinco vezes. Foram adicionados então 20 µL de proteinase K

(25mg/mL), com incubação a 65°C, por duas horas, a 400 rotações por minuto (rpm) .

Após incubação, foram adicionados 1.000 µL de tampão de extração L6 (tiocianato de guanidina 4 M; EDTA 20 mM; Triton X-100 0,25%), com incubação a 60°C por 10 minutos a 900 rpm, seguida de centrifugação a 16.100 g por três minutos. O sobrenadante foi recolhido em outro microtubo, onde foram adicionados 100 µL de sílica ativada (Sigma), com incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente e com homogeneização periódica, por inversão do microtubo, seguindo-se centrifugação a 16.100 g, por três minutos, e descarte do sobrenadante. O sedimento de sílica contendo o DNA foi lavado duas vezes com 500 µL de tampão de lavagem L2 (tiocianato de guanidina 4 M; EDTA 20 mM), duas vezes etanol 80% e uma vez com acetona 100%. Após centrifugação a 12.100 g, por dois minutos, o sobrenadante foi descartado e a sílica foi incubada a 58°C, por 10 minutos, com a tampa do tubo aberta, para sua secagem. Ao sedimento foram adicionados 150 µL de TE (EDTA 10 mM, Tris 1 mM), com posterior incubação a 58° C, por 10 minutos, com agitação a 900 rpm e posterior centrifugação, a 16.100 g, por três minutos, e colheita do sobrenadante contendo o DNA, que foi armazenado a -20°C.

3.5 *Nested* PCR para amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico (gene 18S rRNA)

Para amplificação de fragmento parcial do gene 18S rRNA foi utilizada a *n*PCR com os *primers* 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' e 5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3' para a reação primária (~1325 pares de bases(pb)) e 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' e 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' para a reação secundária (826-840 pb) (XIAO et al., 2000a), nas seguintes condições de reação: preparação de 25µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 1 x, MgCl₂ 2,5 mM, 1 unidade (U) de Taq DNA polimerase, 200 micromolar (µM) de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nanomolar (nM) de cada oligonucleotídeo iniciador

(*primer*) e 5 μ L de DNA alvo na reação primária e 2,5 μ L de DNA na reação secundária. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94°C por três minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94°C por 45 segundos, 45 segundos de anelamento a 50°C e 60 segundos de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por sete minutos. Nas amostras que apresentaram amplificação fraca do fragmento de DNA, foi realizada uma nova reação com os *primers* da reação secundária, utilizando um microlitro do produto da reação secundária diluído na proporção de 1:10, na tentativa de intensificar a amplificação do fragmento de DNA.

3.6 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

As amostras que apresentaram amplificação intensa do fragmento de DNA, visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, foram submetidas à purificação de DNA utilizando-se o *kit* QIAquick® Gel Extraction (Qiagen), e posteriormente sequenciadas com utilização do ABI Prism® *Dye Terminator* 3.1, em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems), no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal. As reações de sequenciamento foram realizadas nas duas direções, com os *primers* da *n*PCR.

As sequências consenso foram determinadas utilizando o software CodonCode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), considerando somente os nucleotídeos com qualidade acima de 20, e alinhadas com sequências homólogas publicadas no *GenBank*, utilizando o software Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e o *Bioedit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999).

3.7 Clonagem molecular

A clonagem molecular foi realizada para obtenção de grande quantidade do DNA-alvo a ser utilizado na padronização da curva de regressão padrão da dPCR em tempo real.

As reações foram realizadas nas dependências do laboratório da DNApta Biotecnologia Ltda., em São José do Rio Preto, SP., visando à amplificação de fragmentos de DNA de ~830 pb, referentes às sequências parciais do gene 18S rRNA de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, respectivamente, de um curió (*Oryzoborus angolensis*) e de um periquito agapornis (*Agapornis roseicollis*). A identificação da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* foi realizada previamente por meio de *n*PCR e sequenciamento.

3.7.1 Bactérias competentes

Bactérias liofilizadas *E.coli* linhagem JM 107 (Thermo Scientific®), foram ressuspensas em dois mililitros de meio SOC Medium (Sigma-Aldrich®), que maximiza a eficiência de transformação de células competentes. Para transformá-las em bactérias competentes, foi utilizado o TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific®), seguindo o seguinte protocolo: 100 µL de meio SOC contendo as bactérias foram adicionados a dois mililitros de meio C-Medium, com incubação “overnight”, a 37°C, a 150 rpm. Após, 150 µL da cultura de bactérias “overnight” foram adicionados a 1,5 mL de meio C-Medium e incubados a 37°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 12.000 *g* por um minuto e o sobrenadante foi descartado. Assim, as células bacterianas foram ressuspensas em 300 µL de solução-T e incubadas por cinco minutos em gelo; após esse período, foram centrifugadas novamente a 12.000 *g*, por um minuto, com descarte do sobrenadante. Novamente houve

ressuspensão das células em 120 μL de solução-T e incubação durante cinco minutos em gelo. Nesse momento, as bactérias já estavam competentes, e o vetor contendo o inserto foi adicionado (cinco μL do inserto + vetor para cada 50 μL de preparado de bactérias), com incubação em gelo, por sete minutos. Após, houve plaqueamento em meio Luria-Bertani sólido (meio LB) (Sigma-Aldrich®).

3.7.2 Ligação do inserto no vetor

A ligação do inserto no vetor foi realizada utilizando o *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific®), adicionando sete microlitros do produto de PCR, 10 μL de 2x tampão de reação e um microlitro de *DNA blunting enzyme*. As amostras foram vortexadas brevemente e incubadas a 70°C, por cinco minutos, seguindo-se incubação em gelo, até a próxima etapa, quando foram adicionados, a cada reação, um microlitro de PJET 1.2/*blunting Cloning Vector* (50 ng/ μL) e um microlitro de T4 ligase, totalizando 20 μL de volume final. Os microtubos foram novamente vortexados brevemente e incubados em temperatura ambiente, por 30 minutos, até o momento de serem adicionados às bactérias competentes.

3.7.3 Plaqueamento em meio sólido e cultivo em meio líquido

Após transformação das bactérias e inserção do vetor contendo o inserto, dentro das bactérias, elas foram plaqueadas em meio LB sólido enriquecido com ampicilina (50mg/ml) e a cultura foi incubada “*overnight*”, para o crescimento das col nias. Após esse período, houve crescimento de col nias na placa e elas foram selecionadas (uma colônia por tubo, cinco col nias de cada amostra) e ressuspensas novamente em 400 μL de meio Luria-Bertani

líquido (LB broth) (Sigma-Aldrich®) com ampicilina (50mg/mL) e incubadas a 37°C por quatro horas.

3.7.4 Análise dos clones recombinantes

A análise da presença e orientação do inserto de DNA no vetor foi realizada por meio de PCR diretamente da colônia presente em meio sólido, utilizando 12,5 µL de JumpStart® Taq ReadyMix® (Sigma-Aldrich), os *primers* (pJET 1.2 *Forward Sequencing Primer* e pJET 1.2 *Reverse Sequencing Primer*) presentes no CloneJET PCR *Cloning Kit* (Thermo Scientific®), na concentração de 10 pmol/µL. Uma colônia de cada amostra foi ressuspensa em 20 µL dessa solução. O ciclo utilizado para amplificação consistiu em desnaturação inicial do DNA a 95°C por três minutos, seguida de 25 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94°C por 30 segundos, 30 segundos de anelamento a 60°C e 30 segundos de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por três minutos. Como forma de confirmação do tamanho do fragmento clonado, o produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3%.

3.7.5 Purificação do DNA plasmidial

O isolamento do DNA plasmidial da cultura de *E. coli* recombinante resultante do item 3.7.3 foi realizado com o GenElute® *HP Five-Minute Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich®), com adição de 40 µL de tampão de lise a 400 µL da cultura, com incubação em temperatura ambiente, por 30 minutos, até atingir coloração transparente. Após, houve transferência para uma coluna (GenElute *Miniprep Binding Column*), previamente preparada, e centrifugação por 10 segundos. Assim, as colunas foram lavadas duas vezes (700 µL e 200 µL) utilizando o *wash solution concentrate* e centrifugadas por 30 segundos.

Para eluição do DNA plasmidial, 40 μ L da solução de eluição foram adicionados à coluna, seguindo-se centrifugação por 30 segundos.

3.7.6 Sequenciamento dos fragmentos clonados

Os fragmentos clonados resultantes foram submetidos à *n*PCR, seguindo-se a purificação do DNA amplificado utilizando o *kit* QIAquick® Gel Extraction (Qiagen), e posteriormente sequenciadas com utilização do ABI Prism® *Dye Terminator* 3.1, em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems), no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal. As reações de sequenciamento foram realizadas nas duas direções, com os *primers* da *n*PCR.

As sequências consenso foram determinadas utilizando o software CodonCode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), considerando somente os nucleotídeos com qualidade acima de 20, e alinhadas com sequências homólogas publicadas no *GenBank*, utilizando o software Clustal X (THOMPSON et al. 1997) e o *Bioedit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999).

3.8 Padronização da dPCR em tempo real para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves

Após obtenção de DNA plasmidial por meio da clonagem molecular, iniciou-se a padronização da dPCR em tempo real para detecção de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves.

3.8.1 Desenho de *primers* e sonda *TaqMan* para a dPCR em tempo real

Os *primers* e a sonda *TaqMan* utilizados na dPCR em tempo real foram elaborados com auxílio do programa Primer Express® versão 3.0 (Applied Biosystems).

Para tanto, as sequências de *C. galli* e de *Cryptosporidium* genótipo III de aves foram alinhadas com sequências de outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, disponíveis no *GenBank*, utilizando o software Bioedit, com o intuito de determinar sequências específicas que permitissem a detecção das duas espécies gástricas de aves. O gene 18SrRNA foi selecionado pelo fato de que há cinco cópias desse gene no genoma de *C. parvum* (LE BLANCQ et al., 1997) e, provavelmente, também em outras espécies de *Cryptosporidium*.

Após determinação das sequências dos *primers* e das sondas (Quadro 2), elas foram submetidas à análise no *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), para verificação de sua especificidade *in silico* (Quadro 3).

Quadro 2 - *Primers* e sonda utilizados na dPCR em tempo real para detecção de sequência do gene da subunidade 18S de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves

Espécie/Genótipo	<i>Primers</i> /Sondas	Posição*	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado (pb)
<i>C. galli</i>	Primer senso	282-305	CGTAGTTGGATTTCTGTTGCATCA	134
	Sonda	327-348	FAM AATATAATATCAACATCCTCCC MGB	
	Primer anti-senso	396-415	GGCAGTTGCCTGCTTTAAGC**	
<i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves	Primer senso	366-391	GCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATT	138
	Sonda	413-435	VIC CATTATAATAACAACATCCTTCC MGB	
	Primer anti-senso	485-504	GGCAGTTGCCTGCTTTAAGC**	

*Posição de anelamento no gene da subunidade 18S do rRNA de *C. galli* (GenBank número AY168847) e *Cryptosporidium* genótipo III de aves (GenBank número AB471641)

**Primer com a mesma sequência para os dois alvos

3.8.2 Teste dos reagentes para a dPCR em tempo real

Nos testes de todos os reagentes, assim como na determinação da curva de regressão padrão, foi utilizado DNA plasmidial obtido por meio de clonagem molecular, previamente descrita no item 3.7.

Primeiramente, as reações para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves foram testadas separadamente; somente após determinação das condições ideais de cada reação, foi realizada a dPCR em tempo real.

3.8.2.1 Avaliação dos *primers*

Os *primers* foram testados inicialmente em relação à temperatura de anelamento ideal e à ocorrência de estruturas secundárias, por meio de PCR em tempo real, sem sondas, utilizando o SsoFast™Evagreen® Supermix (BioRad) e análise da curva de dissociação. As reações foram realizadas com 10 µL de SsoFast™Evagreen® Supermix (BioRad), 400nM de cada *primer* e o fragmento de DNA clonado. O ciclo utilizado para amplificação consistiu em três minutos a 98°C, seguidos por 40 ciclos de cinco segundos a 98°C e cinco segundos em gradiente de temperatura a 58°C, 59°C, 60°C e 61,2°C, seguindo-se uma etapa de dissociação do fragmento amplificado por meio de aumento de temperatura, de 65°C a 95°C, com incrementos de 0,5°C e leitura por cinco segundos, no aparelho de amplificação em tempo real CFX96® (BioRad). Cada amostra foi analisada em duplicata. Após a reação, os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%, para visualização do produto amplificado.

3.8.2.2 Teste de concentração de primers, sonda, cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e adição de albumina sérica bovina não acetilada (BSA)

A concentração ideal dos *primers* foi determinada utilizando reações com 100 nM, 300 nM e 600 nM de cada *primer*, com concentração fixa de 250 nM de sonda.

As reações constituíram-se de 12,5 μ L de JumpStart[®] Taq ReadyMix[®] (Sigma-Aldrich), 5,5nM de $MgCl_2$, 250nM de sonda e *primers* variando entre 100nM, 300nM e 600nM, conforme quadro 4. O ciclo utilizado para amplificação consistiu em dois minutos a 94°C, seguidos por 45 ciclos de 30 segundos a 94°C e um minuto a 60°C, no aparelho de amplificação em tempo real CFX96[®] (BioRad). Cada amostra foi analisada em duplicata.

Quadro 3 - Alinhamento dos *primers* e sondas específicos para o gene da subunidade 18S do rRNA de *Cryptosporidium galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves*, com seqüências de espécies que infectam aves com freqüência¹ ou raramente², e com seqüências de *Cryptosporidium* geneticamente mais relacionadas aos dois alvos³

Espécie ou Genótipo de <i>Cryptosporidium</i>	Identificação das Sequências no GenBank	Alinhamento das Sequências
		365 375 384 393 403 412 419 429
<i>C. galli</i>	GU734647	AGCTCGTAGTTGGATTTCGTTG-CATCAT-TATATTATCACTAAGGTAA-TAAT---ATAATATCAACATCCTCCCTGT
Genótipo III de aves	DQ650343-T..TT-.....A..T.....-C.T.---.....A.....T..CAA
Genótipo IV de aves ²	DQ650344-T.....C.....CT...A.
Genótipo Galinhola ²	AY273769-T.CTT.--...A..CT..C.....-..T.---.....GA.....T..CAC
<i>C. serpentis</i> ³	AF093502-T..TT-.....A..T.T.....-..T.T--.....T...A.
<i>C. muris</i> ³	AF093498-T..A..C...A..T.....TA..T.---..T.....T...A.
<i>C. andersoni</i> ³	EU245042-T..A..T...A..T..C.....T..T.---..T.....T...A.
<i>C. baileyi</i> ¹	AJ276096AAT.-..T.A....-C.AT..C.C....---.T.TAT...C..T....AA.T.ACA.
Genótipo I de aves ¹	GQ227479AAT.-..T.A....-..AT...C....---.T.TAT...C..T....AA.T.ACA.
Genótipo II de aves ¹	DQ002931AATT-.T.A....-..GT...C....---.T.TAT...C..T....AA.T.A.A.
Genótipo V de aves ²	HM116381AATT-.T.A....-..AT...C....---.T.TAT...C..T....AA.T.A.A.
<i>C. meleagridis</i> ¹	AF180339AAT.ATT.A....-..AT.T.T-.A.T.A..T.TAT.....T....AA.T.A.A.
<i>C. parvum</i> ³	AF093490AAT.ATT.A....-A..AT.T.TT.A.G.A..T.TAT.....T....AA.T.A.A.
		437 443 453 463 473 483 493 503
<i>C. galli</i>	GU734647	TA---TATCT---AATATAGAGGGAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCAACTGCCCTTGAATACTC
Genótipo III de aves	DQ650343	..---..T.TTT.....TG..A.....
Genótipo IV de aves ^{2,3}	DQ650344	..---..T.---.....T..A.....
Genótipo Galinhola ^{2,3}	AY273769	..---..T.TTT.....TG..A.....
<i>C. serpentis</i> ³	AF093502	..---..T.TT.....T..A.....
<i>C. muris</i> ³	AF093498	..---..T.CTA.....T..A..C.....
<i>C. andersoni</i> ³	EU245042	..---..T-CTA.....T..A.....
<i>C. baileyi</i> ¹	AJ276096	..CT-...T.AA-.G...GT--.A..C.....T.T.....
Genótipo I de aves ¹	GQ227479	..CT-...T.AA-.G...GT--.A.....T.T.....
Genótipo II de aves ¹	DQ002931	..CT-...T.AA-.G...T--.A.....T.T.....
Genótipo V de aves ²	HM116381	..CT-...T.AA-.G...T--.A.....T.T.....
<i>C. meleagridis</i> ¹	AF180339	..CTAA..T.ATT.G...T--.A.....TA.....
<i>C. parvum</i> ³	AF093490	..CTA...A.TTT.G...T--.A.....TA.....

* Os *primers* senso e anti-senso e as sondas específicos para *Cryptosporidium* genótipo III de aves anelam, respectivamente, nas posições 162-187, 281-300 e 209-230 na seqüência DQ650343

Quadro 4 - Concentrações de *primers* senso/anti-senso utilizados para padronização da reação

Senso/Anti-senso	100 nM	300 nM	600 nM
100 nM	100/100	300/100	600/100
300 nM	100/300	300/300	600/300
600 nM	100/600	300/600	600/600

O próximo passo foi a determinação da concentração ideal de sonda, realizada nas concentrações de 150 nM, 250 nM e 350 nM .

Ainda foram realizados testes para definir a concentração de $MgCl_2$ e verificar o efeito da adição de BSA na reação. O $MgCl_2$ foi testado nas concentrações de 4,5 mM, 5,5 mM e 6,5 mM, enquanto que a BSA foi adicionada na quantidade de 0,6 $\mu g/\mu l$.

Para a escolha da melhor concentração de *primers*, sonda, $MgCl_2$ e BSA utilizou-se como critério o menor valor de ciclo de *threshold* encontrado e as condições ideais de amplificação (fase linear, fase exponencial e fase *plateau*), durante as reações.

Assim, as condições ideais da reação constituíram-se em: preparação de 25 μL de solução contendo 12,5 μL de JumpStart[®] Taq ReadyMix[®] (Sigma-Aldrich[®]), 4,5nM de $MgCl_2$, 250nM de cada sonda, 600nM de cada *primer*, 0,6 $\mu g/\mu l$ de albumina sérica bovina não acetilada (Sigma-Aldrich[®]) e 5 μL de DNA alvo. O ciclo utilizado para amplificação consistiu em dois minutos a 94°C, seguidos por 50 ciclos de 30 segundos a 94°C e um minuto a 61°C, no aparelho de amplificação em tempo real CFX96[®] (BioRad[®]).

3.8.3 Curva de regressão padrão

Após avaliação preliminar das condições ideais, a eficiência da PCR em tempo real foi confirmada por meio de curva de regressão padrão, que correlaciona as concentrações conhecidas de uma sequência-alvo, com a intensidade dos sinais de fluorescência gerados durante os ciclos de amplificação. Para determinação da curva, foram utilizados fragmentos de DNA plasmidial dos dois parasitos, previamente digeridos e linearizados com a enzima de restrição HindIII (Thermo Scientific) e purificados com o QIAquick[®] *Gel Extraction Kit* (Qiagen).

3.8.3.1 Diluições seriadas a partir de DNA plasmidial

A partir do plasmídeo foram feitas diluições seriadas na base 10, variando de 10^7 a 10^1 moléculas de DNA plasmidial, de modo que se obtivessem sete pontos na curva de regressão. Cada diluição foi testada em triplicata.

Para o cálculo do número de cópias de DNA plasmidial necessários para a realização das diluições, seguiu-se as recomendações do manual da Applied Biosystems[®] (2003).

Primeiramente foi necessária a realização da quantificação inicial de DNA plasmidial (ng/ μ L) presente nas amostras, que foram determinadas no aparelho Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop[®]).

O cálculo da massa de uma única molécula de plasmídeo foi realizado por meio da fórmula: $m = [n] [1.096e-21 \text{ g/pb}]$, onde: m = massa (g); n = tamanho do plasmídeo (pb) (plasmídeo + inserto); $e-21 = \times 10^{-21}$.

Após o cálculo da massa, o segundo passo foi o cálculo da massa do plasmídeo contendo a quantidade de cópias de interesse, que foi calculado pela fórmula: massa de DNA plasmidial necessária (g) = quantidade de cópias de interesse x massa de um único plasmídeo.

Dando continuidade nos cálculos, o terceiro passo foi calcular a concentração de DNA plasmidial necessária (g/ μ L), para atingir a quantidade de cópias de interesse. Para isso, foi necessário dividir a massa de DNA plasmidial necessária (g) pelo volume a ser pipetado em cada reação (μ L).

O último passo foi o cálculo da diluição em série do DNA plasmidial. Como o DNA plasmidial geralmente é muito concentrado, foi necessária a realização de duas diluições até atingir uma solução de trabalho adequada. Uma vez que o DNA plasmidial atingiu a concentração adequada de trabalho, foi utilizada a seguinte fórmula, para o cálculo do volume necessário no preparo das diluições utilizadas na curva de regressão padrão, para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves: $C_1V_1 = C_2V_2$, onde: C_1 = concentração inicial (g/ μ L); V_1 = volume de DNA plasmidial (μ L); C_2 = concentração final (g/ μ L); V_2 = volume final (μ L).

As diluições seriadas de DNA plasmidial de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves utilizadas nesse experimento, estão representadas, respectivamente pelas figuras 2 e 3.

Figura 2 – Diluição seriada de DNA plasmidial de *C. galli* utilizada para padronização da dPCR em tempo real.

Amostra	g/ μ l	1	2	3	4
		Massa de um único plasmídeo (g)	Número de cópias desejadas	Massa plasmídeo/número cópias desejadas	Concentração de plasmídeo para número de cópias de interesse*
<i>C. galli</i>	7,37000E-09	4,16699E-18	1.000.000.000	4,16699E-09	1,6668E-09
		4,16699E-18	100.000.000	4,16699E-10	1,6668E-10
		4,16699E-18	10.000.000	4,16699E-11	1,6668E-11
		4,16699E-18	1.000.000	4,16699E-12	1,6668E-12
		4,16699E-18	100.000	4,16699E-13	1,6668E-13
		4,16699E-18	10.000	4,16699E-14	1,6668E-14
		4,16699E-18	1.000	4,16699E-15	1,6668E-15
		4,16699E-18	100	4,16699E-16	1,6668E-16
		4,16699E-18	10	4,16699E-17	1,6668E-17
		4,16699E-18	1	4,16699E-18	1,6668E-18
		4,16699E-18	0	8,33398E-19	3,33359E-19
		4,16699E-18	0	1,6668E-19	6,66719E-20
4,16699E-18	0	3,33359E-20	1,33344E-20		
4,16699E-18	0	6,66719E-21	2,66687E-21		

*Massa desejada de plasmídeo (item 3) dividido pelo volume, em microlitros, que será pipetado na reação

Cálculo de diluições

Diluição	Fonte de plasmídeo para diluição	Concentração inicial (g/ μ l) - C1	Volume de plasmídeo (μ l) - V1	Volume de diluente (μ l)	Volume final (μ l) - V2	Concentração Final (g/ μ l) - C2	Número de cópias do gene da RNA / 2,5 μ l
1	Estoque diluído 1	7,4E-09	2,5	22,5	25	7,4E-10	N/A
	Estoque diluído 2	7,4E-10	2,5	22,5	25	7,4E-11	N/A
2	Diluição 1	7,4E-11	5,7	19,3	25	1,7E-11	10.000.000
3	Diluição 2	1,7E-11	2,5	22,5	25	1,7E-12	1.000.000
4	Diluição 3	1,7E-12	2,5	22,5	25	1,7E-13	100.000
5	Diluição 4	1,7E-13	2,5	22,5	25	1,7E-14	10.000
6	Diluição 5	1,7E-14	2,5	22,5	25	1,7E-15	1.000
7	Diluição 6	1,7E-15	2,5	22,5	25	1,7E-16	100
8	Diluição 7	1,7E-16	2,5	22,5	25	1,7E-17	10
9	Diluição 8	1,7E-17	2,5	22,5	25	1,7E-18	1

Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

Figura 3 – Diluição seriada de DNA plasmidial de *Cryptosporidium* genótipo III de aves utilizada para padronização da dPCR em tempo real.

Amostra	g/ μ l	1	2	3	4
		Massa de um único plasmídeo (g)	Número de cópias desejadas	Massa plasmídeo/número cópias desejadas	Concentração de plasmídeo para número de cópias de interesse*
<i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves	4,80000E-09	4,17138E-18	1.000.000.000	4,17138E-09	1,66855E-09
		4,17138E-18	100.000.000	4,17138E-10	1,66855E-10
		4,17138E-18	10.000.000	4,17138E-11	1,66855E-11
		4,17138E-18	1.000.000	4,17138E-12	1,66855E-12
		4,17138E-18	100.000	4,17138E-13	1,66855E-13
		4,17138E-18	10.000	4,17138E-14	1,66855E-14
		4,17138E-18	1.000	4,17138E-15	1,66855E-15
		4,17138E-18	100	4,17138E-16	1,66855E-16
		4,17138E-18	10	4,17138E-17	1,66855E-17
		4,17138E-18	1	4,17138E-18	1,66855E-18
		4,17138E-18	0	8,34275E-19	3,3371E-19
		4,17138E-18	0	1,66855E-19	6,6742E-20
4,17138E-18	0	3,3371E-20	1,33484E-20		
4,17138E-18	0	6,6742E-21	2,66968E-21		

*Massa desejada de plasmídeo dividido pelo volume, em microlitros, que será pipetado na reação

Cálculo de diluições

Diluição	Fonte de plasmídeo para diluição	Concentração inicial (g/ μ l) - C1	Volume de plasmídeo (μ l) - V1	Volume de diluente (μ l)	Volume final (μ l) - V2	Concentração Final (g/ μ l) - C2	Número de cópias do gene da actina / 2,5 μ l
1	Estoque diluído 1	4,8E-09	2,5	22,5	25	4,8E-10	N/A
	Estoque diluído 2	4,8E-10	2,5	22,5	25	4,8E-11	N/A
2	Diluição 1	4,8E-11	8,7	16,3	25	1,7E-11	10.000.000
3	Diluição 2	1,7E-11	2,5	22,5	25	1,7E-12	1.000.000
4	Diluição 3	1,7E-12	2,5	22,5	25	1,7E-13	100.000
5	Diluição 4	1,7E-13	2,5	22,5	25	1,7E-14	10.000
6	Diluição 5	1,7E-14	2,5	22,5	25	1,7E-15	1.000
7	Diluição 6	1,7E-15	2,5	22,5	25	1,7E-16	100
8	Diluição 7	1,7E-16	2,5	22,5	25	1,7E-17	10
9	Diluição 8	1,7E-17	2,5	22,5	25	1,7E-18	1

Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

3.8.4 Teste de especificidade analítica da dPCR em tempo real

Amostras de DNA genômico de diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, previamente identificadas e armazenadas no laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba, foram testadas pela dPCR em tempo real para verificação de sua especificidade analítica, ou seja, a capacidade do teste em identificar somente o alvo em questão. Foram utilizadas amostras de DNA de *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. galli*, *C. ryanae*, *C. serpentis* e *Cryptosporidium* genótipos I, II e III de aves. Cada amostra foi testada em triplicata.

Como forma de confirmação do tamanho do fragmento amplificado na dPCR em tempo real, o produto dessa reação foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%.

3.9 Clonagem molecular dos fragmentos da dPCR em tempo real

A clonagem molecular dos fragmentos da dPCR em tempo real foi realizada nas mesmas condições do item 3.7, no laboratório da DNapta Biotecnologia Ltda., em São José do Rio Preto, SP., visando à amplificação de fragmentos resultantes da dPCR em tempo real, para posterior identificação das amostras por meio de sequenciamento. Foram selecionadas 54 amostras positivas, utilizando como critério de escolha as amostras da dPCR em tempo real que resultaram em positividade para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves (infecção mista), e aquelas cujo resultado foi positivo para uma das espécies na dPCR em tempo real e negativas na *nPCR*.

3.9.1 Sequenciamento dos fragmentos da dPCR em tempo real clonados

Após análise dos clones recombinantes, conforme descrito no item 3.7.4, as amostras que apresentaram amplificação, visualizada por meio de eletroforese em gel de agarose 3%, foram submetidas à purificação de DNA, diretamente do produto da PCR, com utilização do USB[®]ExoSAP-IT[®] *PCR Product Cleanup* (Affymetrix[®]), e posteriormente sequenciadas com utilização do ABI Prism[®]*Dye Terminator* 3.1, em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems), no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal. As reações de sequenciamento foram realizadas nas duas direções, com os *primers* pJET 1.2 *forward* e pJET 1.2 *reverse*, presentes no kit CloneJET *PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific[®]).

As sequências consenso foram determinadas utilizando o software CodonCode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), considerando somente os nucleotídeos com qualidade acima de 20. Essas sequências foram alinhadas com sequências homólogas publicadas no *GenBank*, utilizando o software Clustal W (Thompson et al. 1997) e o *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Hall 1999).

4 RESULTADOS

Durante o período de coleta, de novembro de 2009 a março de 2012, foi possível a obtenção 1027 amostras de fezes. As amostras foram colhidas de acordo com a disponibilidade, de modo que grande parte foi proveniente de aves adultas. Desse total, 320 (31,16%) amostras foram provenientes de aves da ordem Psittaciformes e 707 (68,84%) amostras de aves da ordem Passeriformes (Quadro 5).

Quadro 5 - Espécies de aves submetidas à colheita de fezes

(continuação)			
Ordem	Nome científico	Nome comum	Número amostras colhidas
Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio verdadeiro	166
	<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio do mangue	12
	<i>Amazona vinacea</i>	Papagaio do peito roxo	4
	<i>Amazona xantops</i>	Papagaio galego	13
	<i>Ara chloropterus</i>	Arara vermelha grande	24
	<i>Aratinga aurea</i>	Periquito rei	1
	<i>Aratinga auricapillus</i>	Jandaia testa vermelha	2
	<i>Aratinga leucophthalmus</i>	Periquito maracanã	8
	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito rico	62
	<i>Brotogeris tirica/ Agapornis roseicollis*</i>	Periquito rico/ Agapornis rose face	2
	<i>Derophtus accipitrinus</i>	Anacã	1
	<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã nobre	10
	<i>Forpus xanthopterygius</i>	Tuim	1
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	8
	<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca verde	2
	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Tiriba de testa vermelha	4
	Total Psittaciformes		320
Passeriformes	<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Garibaldi	5
	<i>Cyanocorax chrysops</i>	Gralha Picaça	2
	<i>Cyanoloxia brissonii</i>	Azulão	57
	<i>Cyanocorax cristatellus</i>	Gralha do campo	1
	<i>Elaenia mesoleuca</i>	Tuque	1
	<i>Estrilda astrild</i>	Bico de lacre	5
	<i>Euphonia chlorotica</i>	Fim fim	1
	<i>Euphonia chalybea</i>	Cais-cais	1
	<i>Euphonia violacea</i>	Gaturamo verdadeiro	1

(continuação)

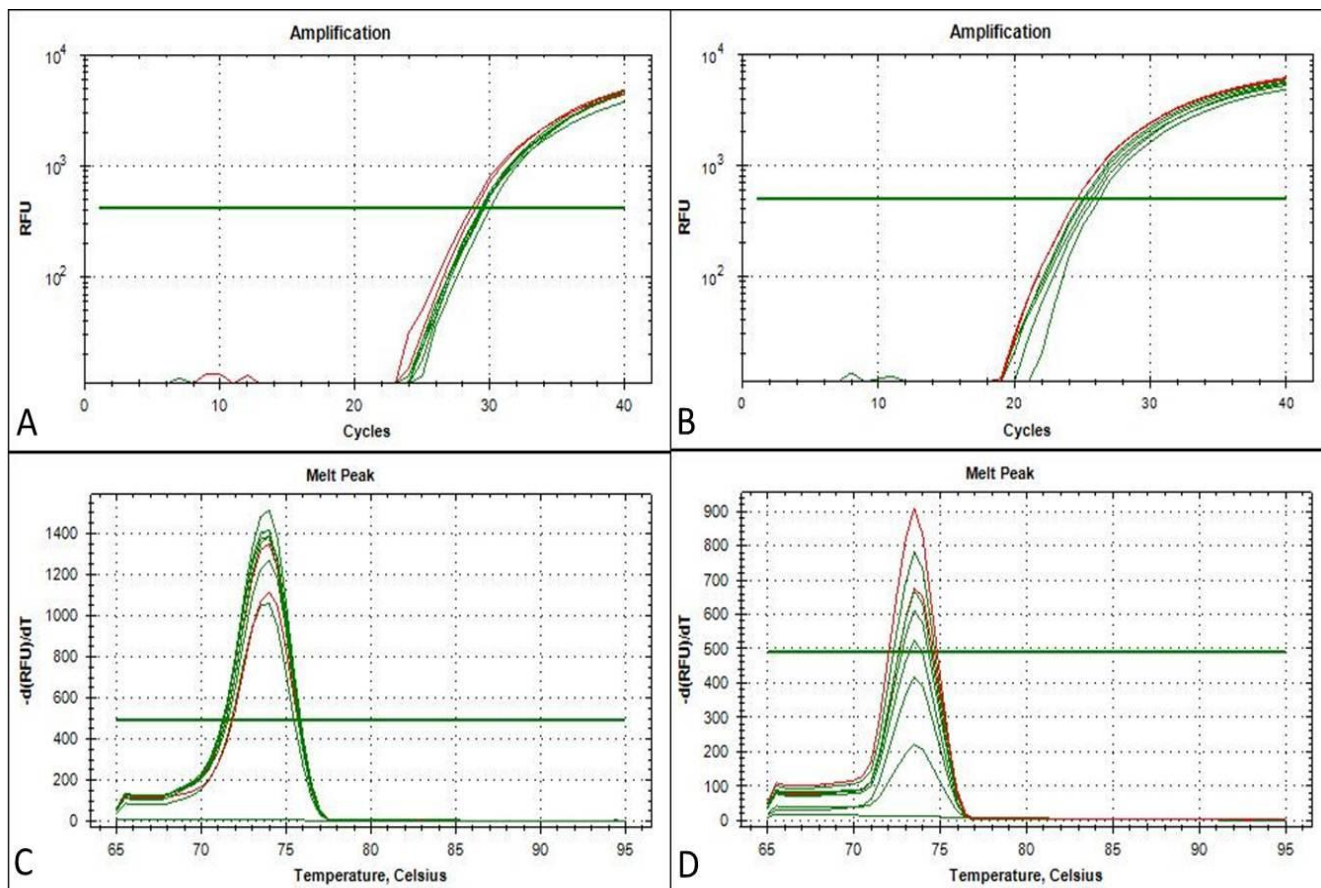
Ordem	Nome científico	Nome comum	Número amostras colhidas
Passeriformes	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Pássaro preto	35
	Híbrido	Pintagol	5
	<i>Haplospiza unicolor</i>	Cigarra bambu	1
	<i>Icterus cayanensis</i>	Encontro	3
	<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	7
	<i>Lanio cucullatus</i>	Tico tico rei	4
	<i>Mimus saturninus</i>	Sabiá do campo	1
	<i>Molothrus bonariensis</i>	Chopim	6
	<i>Oryzoborus angolensis</i>	Curió	9
	<i>Oryzoborus maximiliani</i>	Bicudo	1
	<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal do Nordeste	34
	<i>Paroaria coronata</i>	Cardeal de topete vermelho	3
	<i>Passer domesticus</i>	Pardal	3
	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem te vi	29
	<i>Procnias nudicollis</i>	Araponga	2
	<i>Pyroderus scutatus</i>	Pavó	1
	<i>Ramphocelus bresilius</i>	Tiê sangue	1
	<i>Saltator similis</i>	Trinca ferro	152
	<i>Saltatricula atricollis</i>	Bico de pimenta	1
	<i>Serinus canarius</i>	Canário do reino	13
	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário da terra	58
	<i>Sporagra magellanica</i>	Pintassilgo	15
	<i>Sporophila albogularis</i>	Golinho	5
	<i>Sporophila bouvreuil</i>	Caboclinho	4
	<i>Sporophila caerulescens</i>	Coleira paulista	52
	<i>Sporophila falcirostris</i>	Cigarrinha verdadeira	10
	<i>Sporophila frontalis</i>	Pixoxó	17
	<i>Sporophila lineola</i>	Bigodinho	12
	<i>Sporophila nigricollis</i>	Coleira baiano	7
	<i>Sporophila plumbea</i>	Patativa	4
	<i>Sporophila sp.</i>	Coleirinho	16
	<i>Taeniopygia guttata</i>	Mandarim	2
	<i>Tangara ornata</i>	Sanhaço do encontro amarelo	3
	<i>Tangara seledon</i>	Saíra sete cores	2
<i>Tapera naevia</i>	Saci	1	
<i>Thraupis cyanopectus</i>	Sanhaço encontro azul	4	
<i>Thraupis palmarum melanopterus</i>	Sanhaço do coqueiro subsp. Amazonica	1	
<i>Thraupis sayaca</i>	Sanhaço cinzento	13	
<i>Turdus albicollis</i>	Sabiá coleira	4	

(conclusão)			
Ordem	Nome científico	Nome comum	Número amostras colhidas
Passeriformes	<i>Turdus amaurochalinus</i>	Sabiá poca	7
	<i>Turdus flavipes</i>	Sabiá una	6
	<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá barranco	8
	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá laranjeira	47
	<i>Volatinia jacarina</i>	Tiziu	3
	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico tico	21
	Total Passeriformes		707

* As duas espécies estavam alojadas no mesmo viveiro, não sendo possível identificar a qual espécie pertencia a amostra fecal

Após o desenho e síntese dos *primers* e da sonda, foram realizados os testes para padronização da dPCR em tempo real. Primeiramente, os *primers* foram testados para verificação da ocorrência de estruturas secundárias, como a formação de *primer dimers*, e para determinar a temperatura ideal de anelamento. A temperatura de 61,2°C foi a que resultou em melhor amplificação, e não houve evidência de formação de estruturas secundárias, como pode ser observado pela ausência de picos de temperatura de dissociação diferentes dos esperados para os fragmentos de DNA amplificados, referentes aos dois alvos (Figura 4).

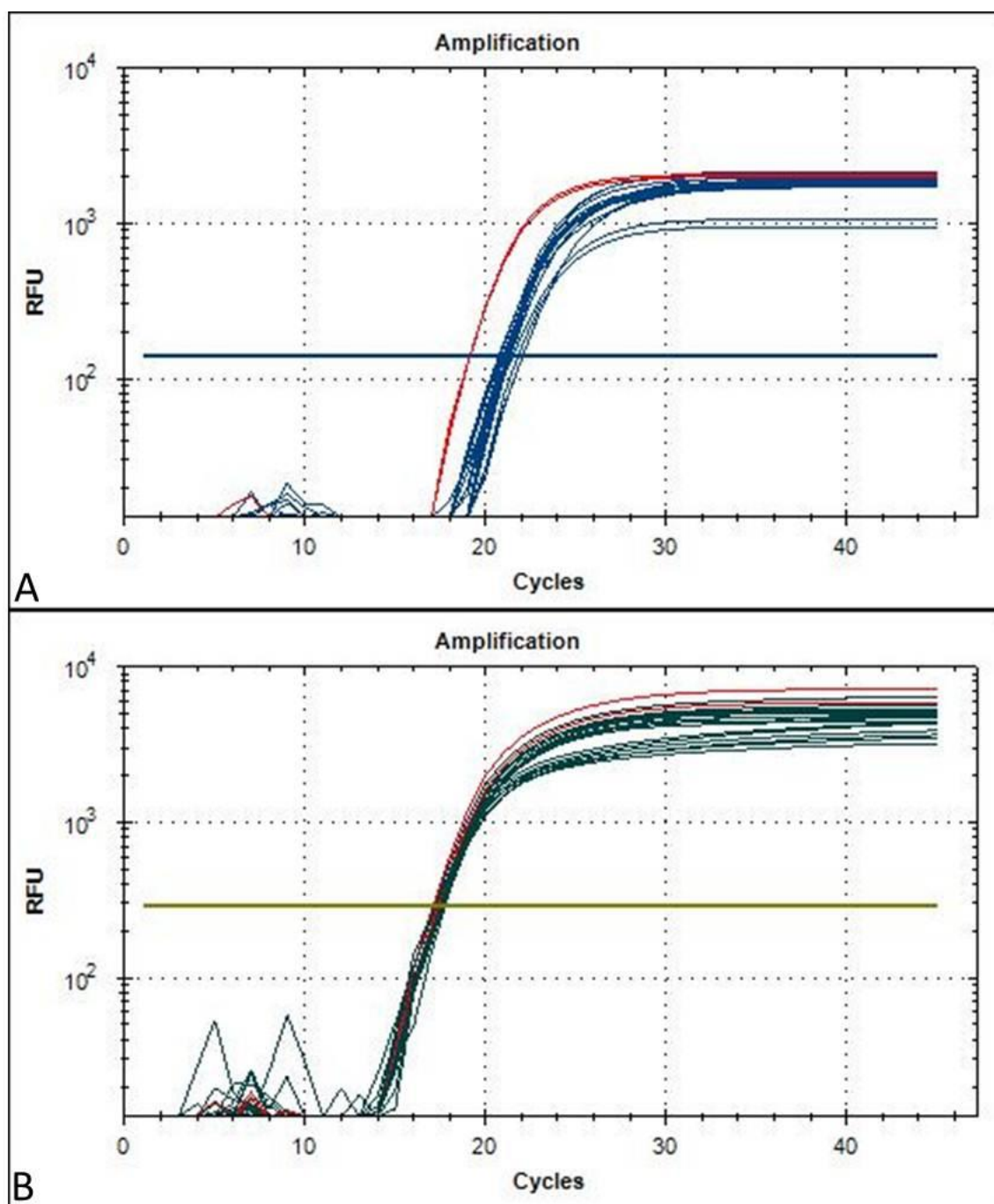
Figura 4 - Teste dos *primers* da dPCR em tempo real, com utilização do fluoróforo EvaGreen[®], realizado em duplicata. *C. galli*: curvas de amplificação (A) e de dissociação (C), em gradiente de temperatura de 58°C, 59°C, 60°C e 61,2°C. *Cryptosporidium* genótipo III de aves: curvas de amplificação (B) e de dissociação (D), em gradiente de temperatura de 58°C, 59°C, 60°C e 61,2°C. A melhor temperatura para os dois alvos (61,2°C) está evidenciada em vermelho



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

Dentre todas as combinações de concentrações de *primers*, variando entre 100 nM, 300 nM e 600 nM de cada *primer*, a concentração ideal foi a de 600 nM, para ambos os conjuntos de *primers* (Figura 5).

Figura 5 - Teste de concentração de *primers* senso/anti-senso, utilizando a PCR em tempo real com combinação das concentrações de 100 nM, 300 nM e 600 nM de cada *primer* e concentração fixa de 250 nM de sonda, realizado em duplicata. Curva de amplificação de *C. galli* (A) e de *Cryptosporidium* genótipo III de aves (B). A melhor concentração para os dois alvos (600 nM/600 nM) está evidenciada em vermelho

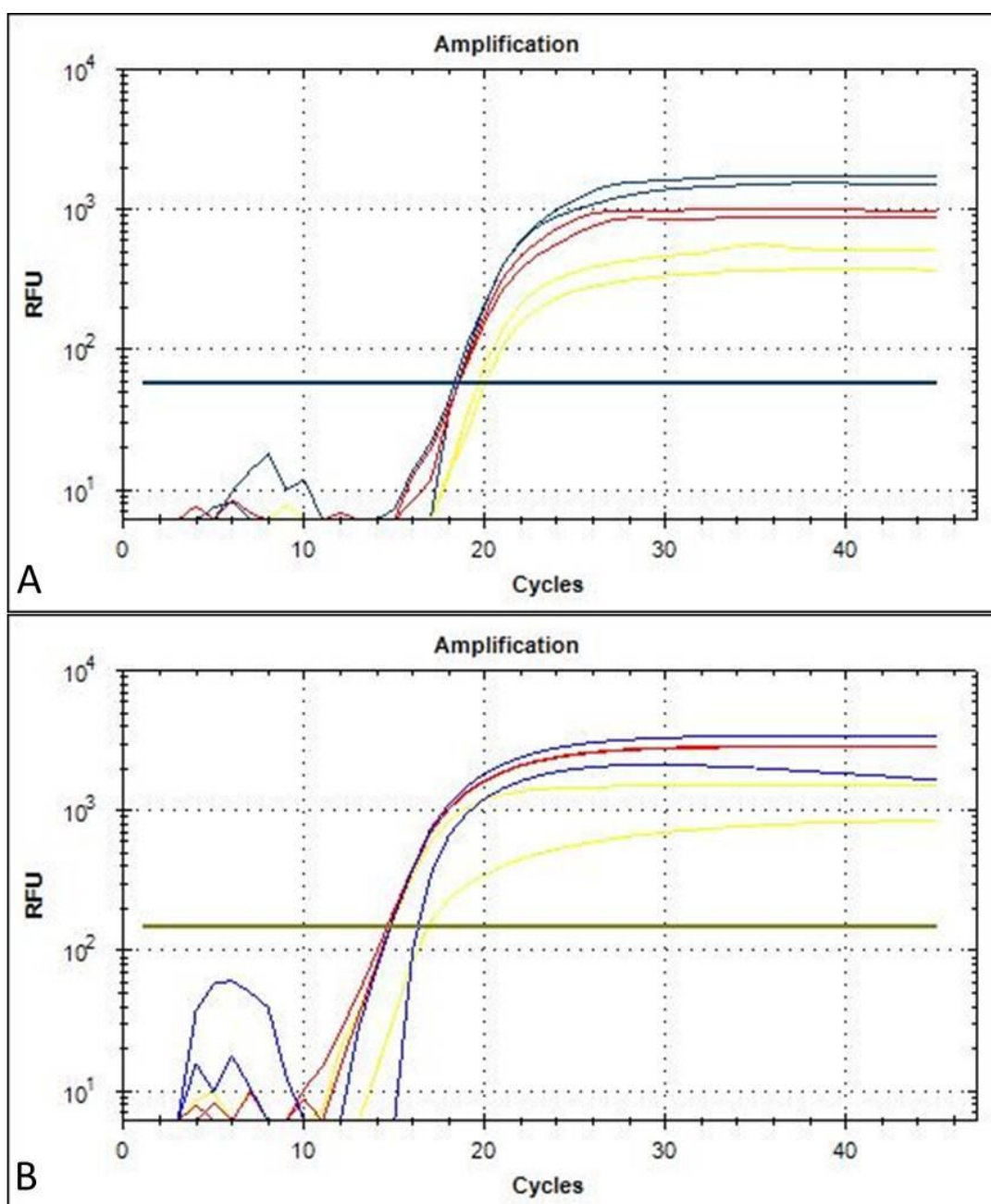


Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

Na determinação da concentração ideal de sonda, para ambos os alvos, os melhores resultados foram observados com as concentrações de 250 nM e 350 nM, quando comparados à concentração de 150 nM. Nessas

concentrações, não houve diferença quanto ao valor do ciclo de *threshold*; dessa forma, optou-se pela menor concentração, de 250 nM (Figura 6).

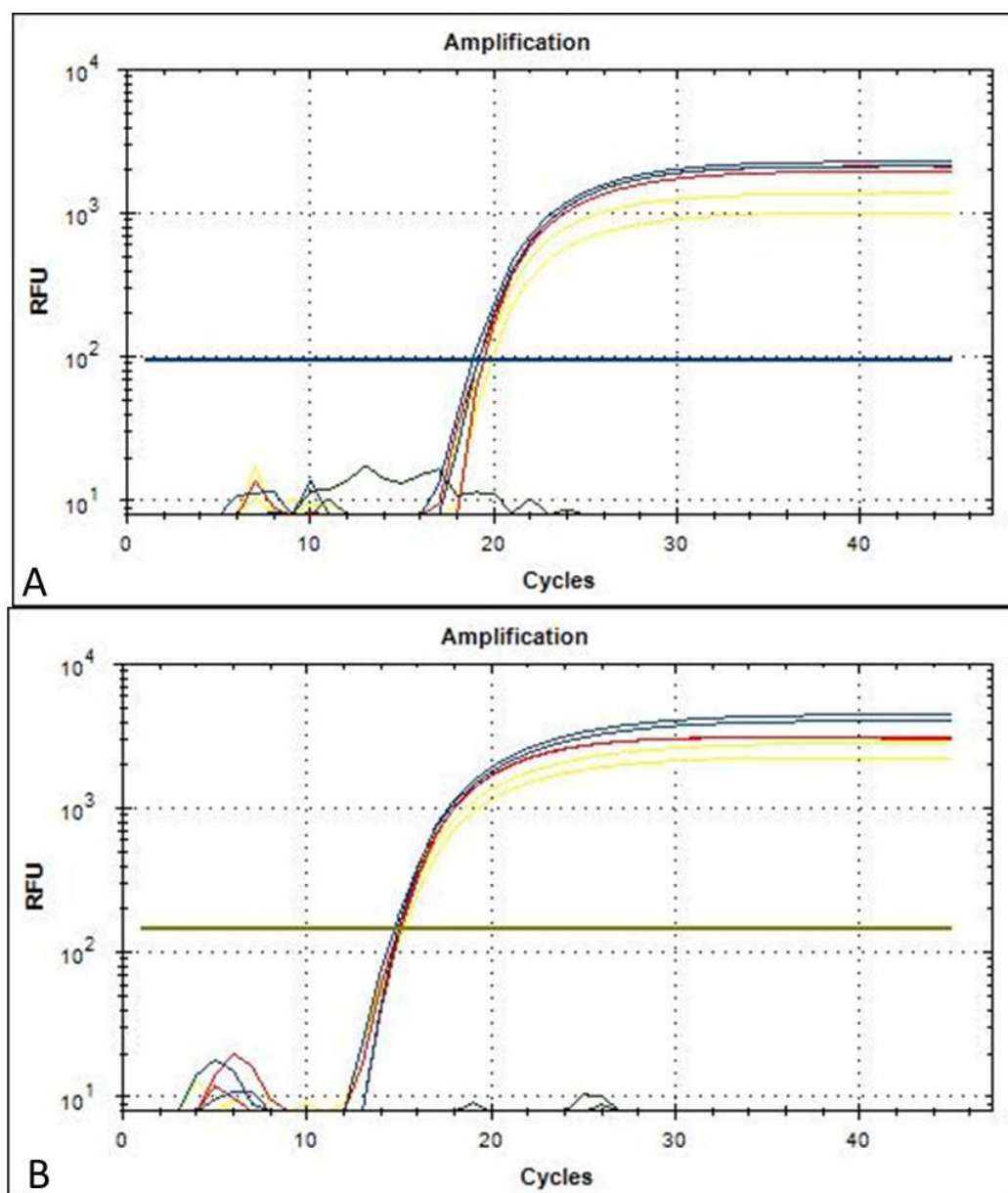
Figura 6 - Teste de concentração de sondas MGB desenhadas para a dPCR em tempo real, realizada em duplicata. A) *C. galli*: 150 nM (amarelo), 250 nM (vermelho) e 350 nM (azul). B) *Cryptosporidium* genótipo III de aves: 150 nM (amarelo), 250 nM (vermelho) e 350 nM (azul)



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

A adição de $MgCl_2$ foi testada nas concentrações de 4,5 mM, 5,5 mM e 6,5 mM, sendo que os melhores resultados foram obtidos com 5,5 mM (Figura 7).

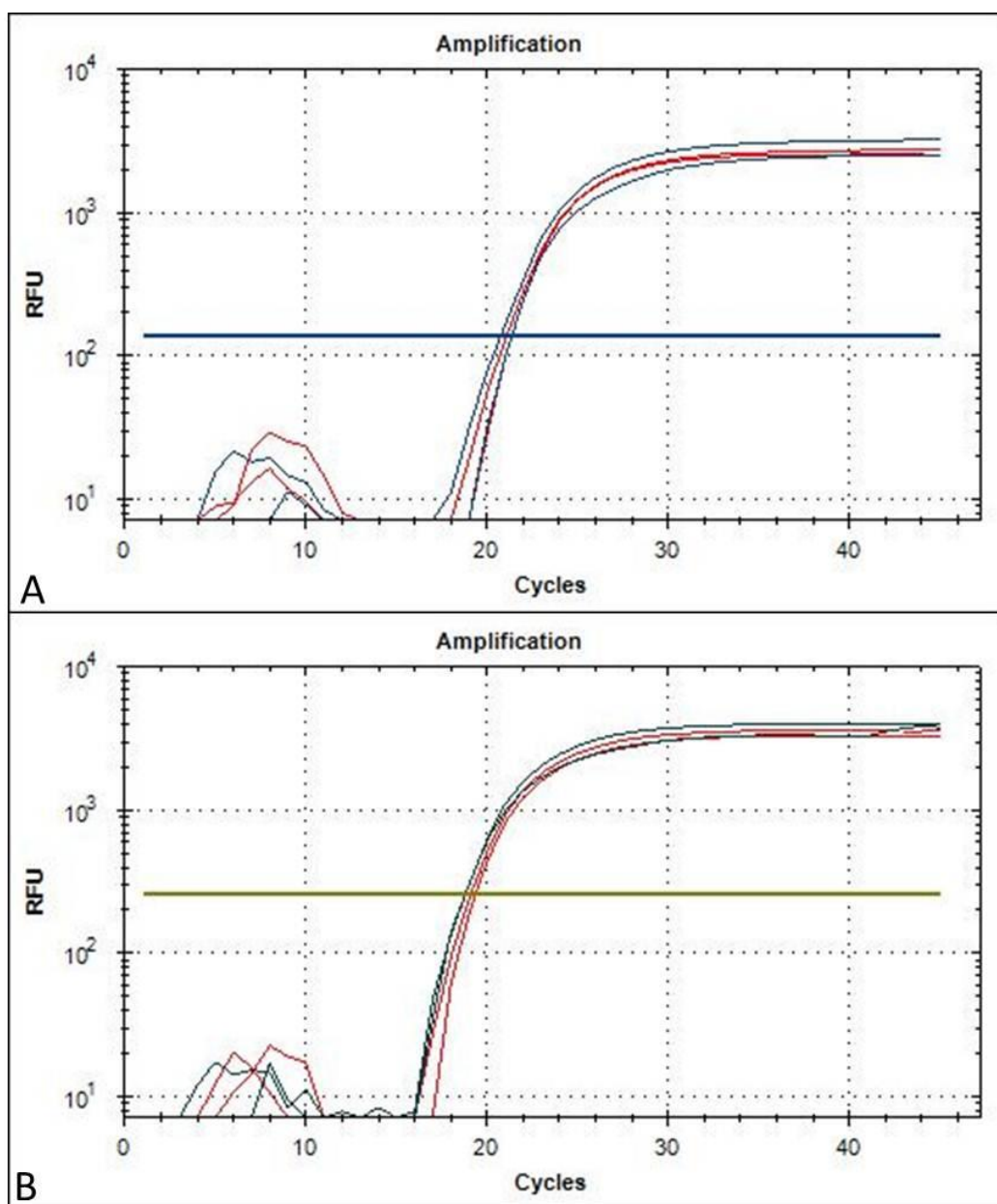
Figura 7 - Teste de concentração de $MgCl_2$ para a PCR em tempo real, realizada em duplicata para *C. galli* (A) e *Cryptosporidium* genótipo III de aves (B): 4,5 nM (amarelo), 5,5 nM (vermelho) e 6,5 nM (azul)



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

A BSA foi adicionada na reação, na quantidade de $0,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, não havendo nenhuma interferência na reação (Figura 8).

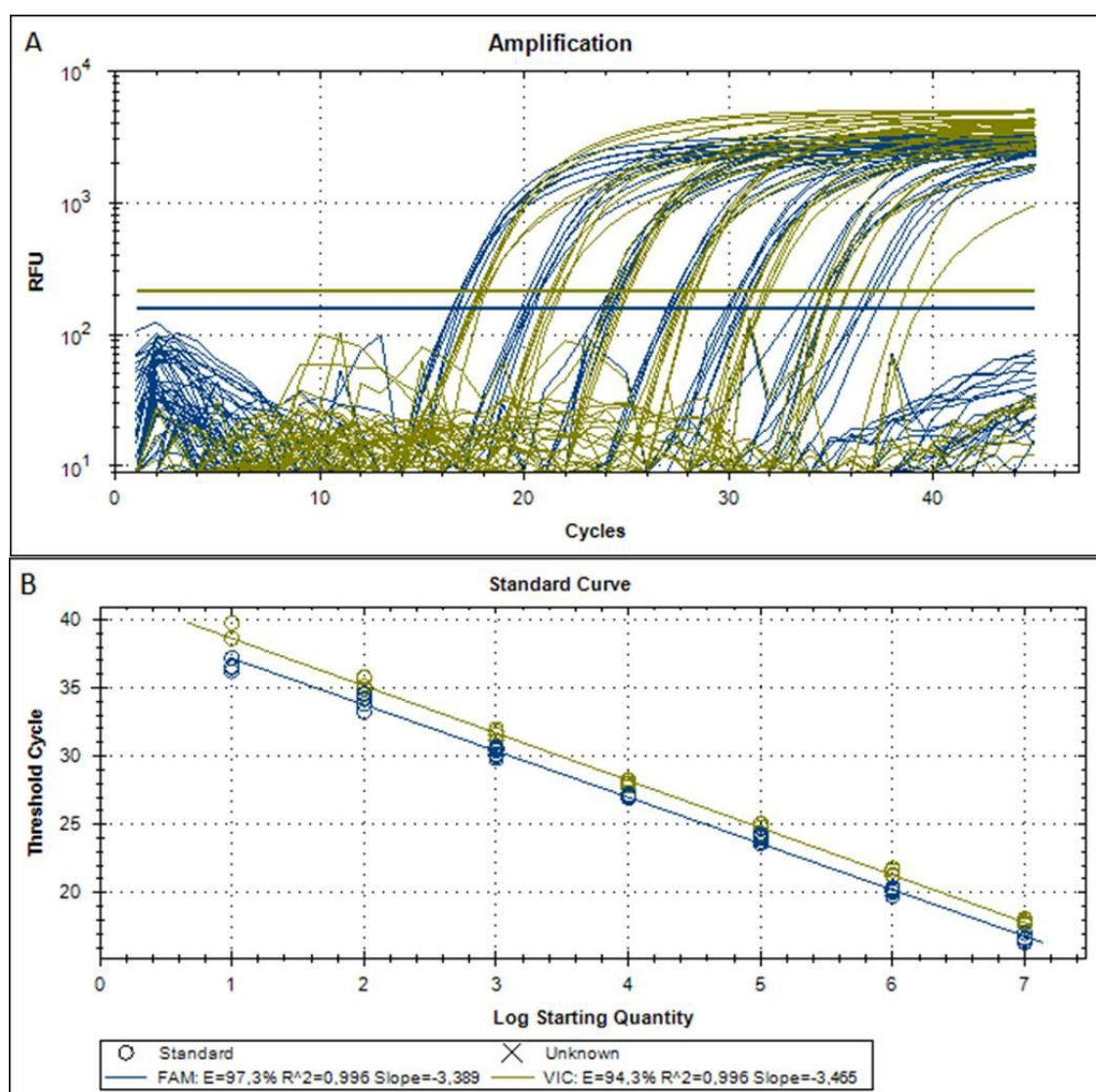
Figura 8 - Teste de adição de BSA na PCR em tempo real, realizado em duplicata, para *C. galli* (A) e *Cryptosporidium* genótipo III de aves (B): ausência de BSA (azul), presença de BSA (vermelho)



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

A curva de regressão padrão obtida após a padronização da dPCR em tempo real apresentou eficiência de 97,3%, R^2 0,99 e slope -3,38 para *C. galli* e eficiência de 94,3%, R^2 0,99 e slope -3,46 para *Cryptosporidium* genótipo III de aves (Figura 9).

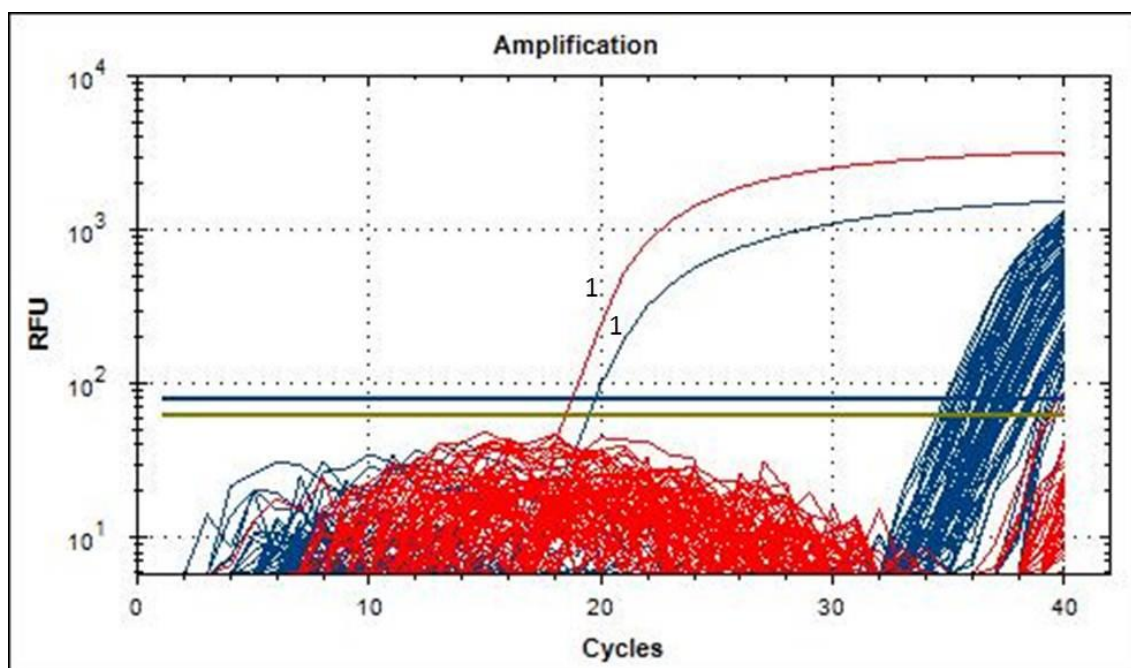
Figura 9 - Padronização da PCR duplex em tempo real, reação realizada em triplicata. A) amplificação em tempo real das diluições contendo 10^7 a 10^1 cópias de fragmento clonado do gene da subunidade 18S do rRNA de *C. galli* (FAM) e *Cryptosporidium* genótipo III de aves (VIC). B) curva de regressão padrão das diluições: E = eficiência de amplificação; R^2 = coeficiente de determinação; Slope = valor referente à inclinação e posição da curva



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

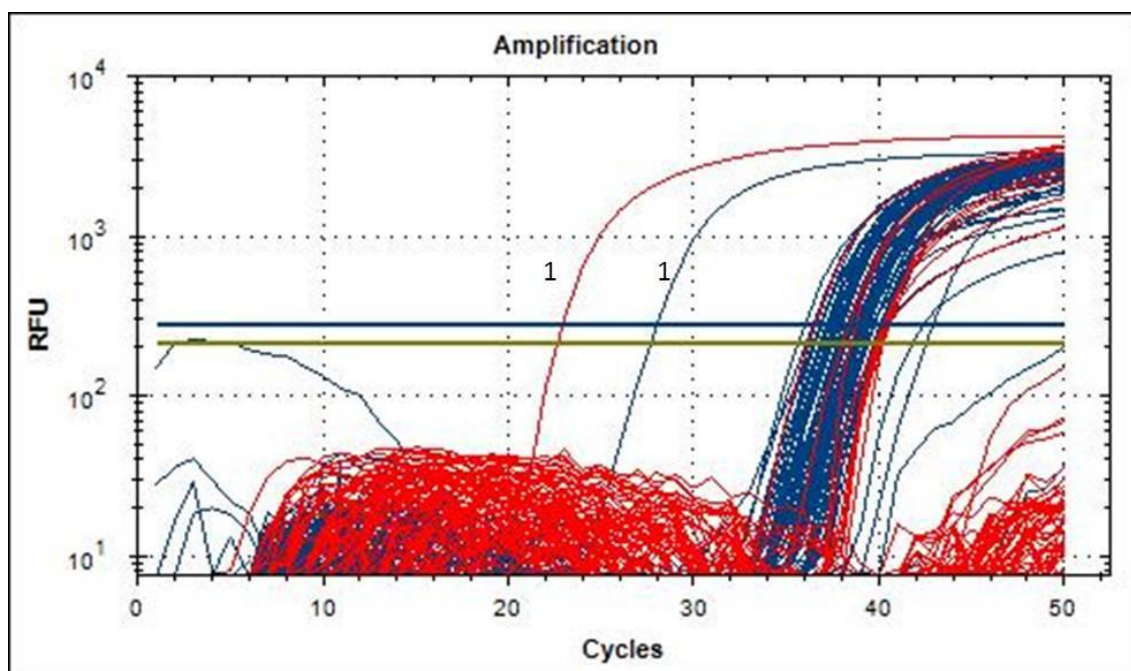
Inicialmente a dPCR em tempo real foi padronizada com um total de 40 ciclos. Como a maioria das amostras apresentou amplificação em $Ct \geq 35$ (Figura 10), optou-se pela realização da dPCR em tempo real com 50 ciclos totais, para avaliar se as amostras apresentavam curva de amplificação (fase linear, fase exponencial e fase *plateau*), o que representa mais uma evidência de amplificação específica para os alvos (Figura 11).

Figura 10 – Amplificação das amostras fecais por meio da dPCR em tempo real, com total de 40 ciclos. Em azul, amplificação de *C. galli*; em vermelho, amplificação de *Cryptosporidium* genótipo III de aves. (1) curvas de amplificação dos controles positivos. Notar amplificação da maioria das amostras em $Ct \geq 35$, não sendo possível a formação da fase *plateau*



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

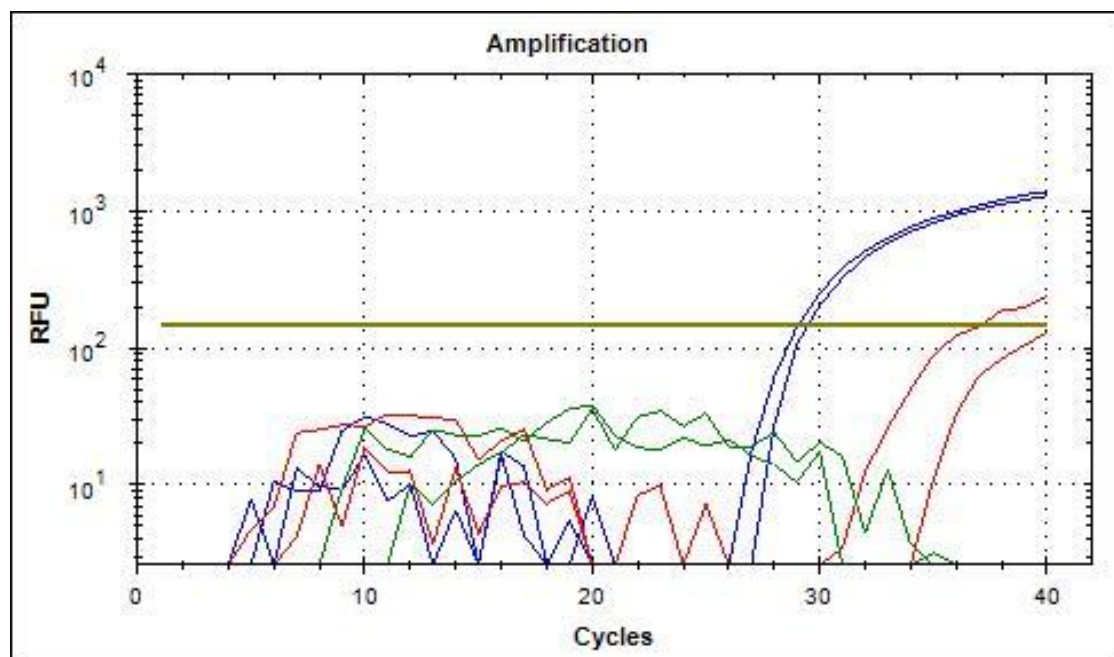
Figura 11 – Amplificação das amostras fecais por meio da dPCR em tempo real, com total de 50 ciclos. Em azul, amplificação de *C. galli*; em vermelho, amplificação de *Cryptosporidium* genótipo III de aves. (1) curvas de amplificação dos controles positivos. Notar a formação da fase *plateau*, nas amostras com $C_t \geq 35$, na reação com 50 ciclos



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

A avaliação da especificidade analítica para *C. galli* não revelou amplificação de DNA de outras espécies de *Cryptosporidium* testadas; já no caso de *Cryptosporidium* genótipo III de aves, houve amplificação de DNA de *C. serpentis*, porém, com ciclo de *threshold* de valor elevado e sem a formação de curva típica de amplificação (fase linear, exponencial e plateau) (Figura 12), caracterizando dessa forma uma baixa eficiência de amplificação, provavelmente devido ao polimorfismo na região de anelamento da sonda com o DNA genômico de *C. serpentis* (Quadro 3).

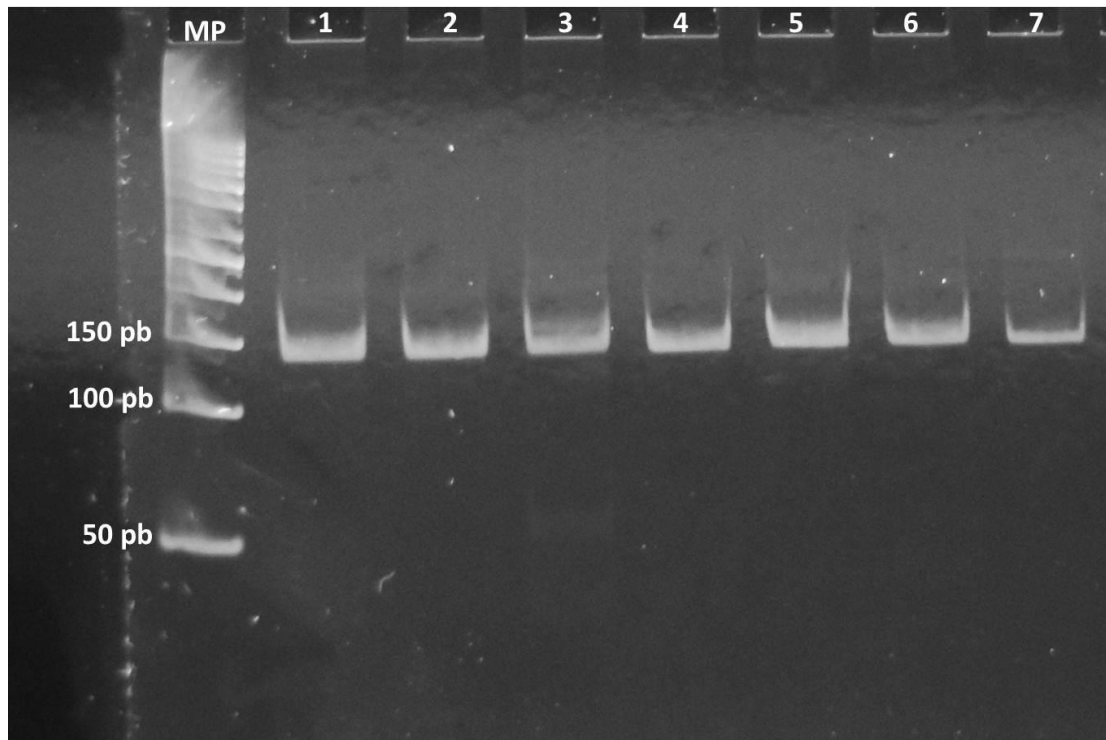
Figura 12 - Curva de amplificação da dPCR em tempo real para *Cryptosporidium* genótipo III de aves; amostras avaliadas em duplicata: curva de amplificação para a espécie alvo (controle positivo) em azul; curva de amplificação com ciclo de *threshold* de valor elevado e sem a formação de curva típica de amplificação em amostra de DNA de *C. serpentis* em vermelho; controle negativo em verde



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

Para confirmação do tamanho dos fragmentos alvo, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, onde foram observadas bandas correspondentes ao tamanho esperado, ou seja, de 134 a 138 pb, respectivamente para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves (Figura 13).

Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, corados com GelRed. MP= Marcador de peso molecular; 1 a 4 = amostras de campo avaliadas com dPCR em tempo real, positivas para *C. galli*, com amplificação de bandas de aproximadamente 134 pb; 5 a 7 = amostras de campo avaliadas com dPCR em tempo real, positivas para *Cryptosporidium* genótipo III de aves, com amplificação de bandas de aproximadamente 138 pb



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

Dentre as 1027 amostras fecais de aves, 104 (10,13%) foram positivas pela *nPCR* (Tabela 2). As amostras com quantidade suficiente de DNA, amplificado pela *nPCR*, foram sequenciadas para identificar outras espécies de *Cryptosporidium* que não são detectadas pela dPCR em tempo real específica para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves e para confirmar a especificidade da dPCR em tempo real. Dessa forma, foi possível o sequenciamento de 40 amostras. As seguintes espécies foram identificadas: *C. baileyi* em oito amostras (*Cyanoloxia brissonii*, *Saltator similis*, *Sicalis flaveola*, *Sporophila lineola*, *Turdus albicollis*, *Turdus rufiventris*); *C. galli* em 28 amostras (*Aratinga leucophthalmus*, *Cyanoloxia brissonii*, *Gnorimopsar chopi*, *Icterus cayanensis*, *Nymphicus hollandicus*, *Paroaria dominicana*, *Saltator similis*, *Sicalis flaveola*, *Sporagra magellanica*, *Sporophila caerulescens*, *Sporophila lineola*, *Sporophila sp.*, *Turdus amaurochalinus*, *Turdus leucomelas*, *Zonotrichia capensis*); *Cryptosporidium* genótipo III de aves em três amostras (*Brotogeris*

tirica/Agapornis roseicollis, *Nymphicus hollandicus* e *Saltator similis*) e *Cryptosporidium* genótipo de V de aves em uma amostra (*Amazona aestiva*) (Tabela 1).

Várias situações de diagnóstico foram observadas ao analisar os métodos de diagnóstico deste experimento (dPCR em tempo real e nPCR), nas 1027 amostras fecais (Tabela 1): 1^a: amostras positivas somente para *C. galli*, pela dPCR em tempo real, e negativas pela nPCR (496 = 48,30%); 2^a: amostras positivas somente para *Cryptosporidium* genótipo III de aves, pela dPCR em tempo real, e negativas pela nPCR (6 = 0,58%); 3^a: amostras positivas somente para *C. galli*, pela dPCR em tempo real, e positivas pela nPCR (70 = 6,82%); 4^a: amostras positivas somente para *Cryptosporidium* genótipo III de aves, pela dPCR em tempo real, e positivas pela nPCR (1 = 0,10 %); 5^a: amostras positivas para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, pela dPCR em tempo real, e negativas pela nPCR (13 = 1,27%); 6^a: amostras positivas para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, pela dPCR em tempo real, e positivas pela nPCR (1 = 0,10%); 7^a: amostras negativas para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, pela dPCR em tempo real, e positivas pela nPCR (36 = 3,50%).

Houve ainda a presença de infecção mista, por mais de uma espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*: 13 amostras foram positivas para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, pela dPCR em tempo real; em oito amostras positivas somente para *C. galli*, pela dPCR em tempo real, as seguintes espécies e genótipos foram identificados após sequenciamento dos fragmentos amplificados pela nPCR: em cinco amostras, *C. baileyi*, em duas amostras, *Cryptosporidium* genótipo III de aves e, em uma amostra, *Cryptosporidium* genótipo V de aves.

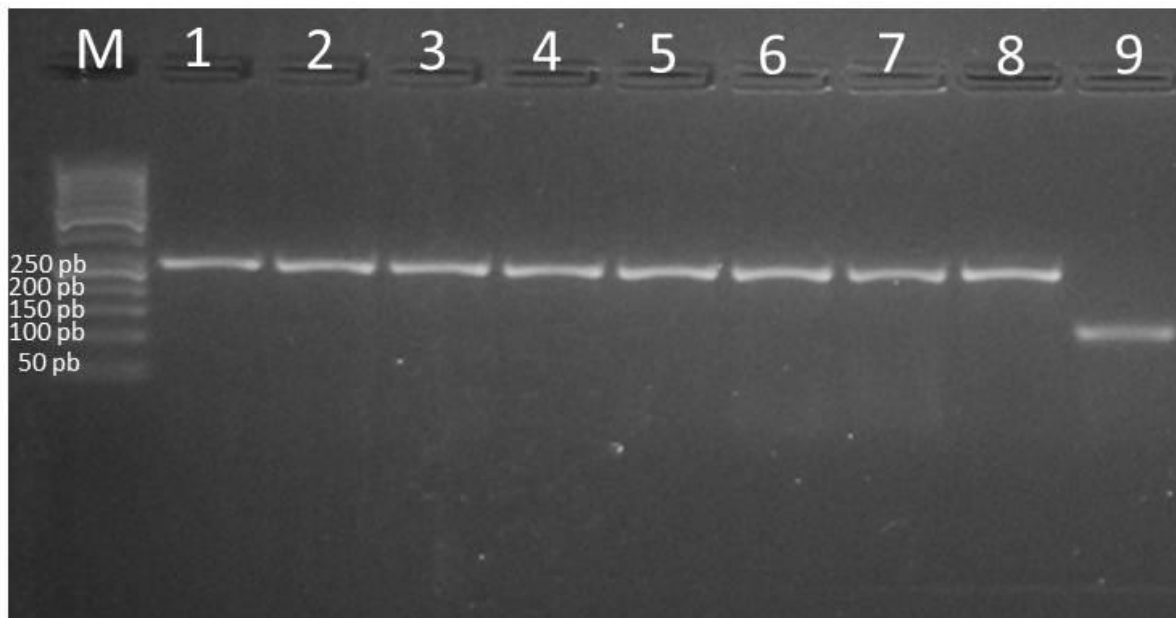
A dPCR em tempo real apresentou maior sensibilidade que a nPCR para detecção de *C. galli* em amostras de campo, com positividade em 580/1027 (56,47%), enquanto que a nPCR resultou em positividade para *Cryptosporidium* spp. em 104/1027 (10,13%) amostras. Para *Cryptosporidium* genótipo III de aves, houve positividade em 21/1027 (2,04%) amostras.

Como houve uma diferença muito grande entre a positividade obtida pela *n*PCR e pela dPCR em tempo real, a única forma de comprovação de que a dPCR para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves realmente apresenta alta especificidade e que os resultados positivos por essa reação e negativos pela *n*PCR não são produto de amplificação inespecífica, foi a realização de clonagem dos fragmentos amplificados pela dPCR em tempo real, com posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados.

Foi realizada a clonagem molecular em 54 amostras positivas amplificadas pela dPCR em tempo real. A confirmação do resultado da clonagem molecular foi realizada por meio da PCR diretamente da colônia cultivada em meio sólido, utilizando os *primers* do kit de clonagem, seguida de eletroforese em gel de agarose 3%, onde foram observadas bandas correspondentes ao tamanho esperado, ou seja, de aproximadamente 252 a 256 pb (inserto + vetor), respectivamente para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves (Figura 14). Em 27 amostras, houve crescimento da colônia sem o inserto no seu interior. Assim, a clonagem molecular foi repetida nessas 27 amostras, mas sem sucesso na obtenção do inserto + vetor.

Os fragmentos clonados referentes às 27 amostras nas quais houve sucesso na inserção do fragmento resultante da dPCR em tempo real no vetor, foram enviados para sequenciamento. De cada amostra, foram selecionadas até cinco colônias para posterior purificação e sequenciamento dos plasmídeos, pelo fato de que cada colônia de bactéria possui apenas um tipo de inserto (fragmento de DNA-alvo). Como algumas amostras apresentaram evidência de infecção mista com as duas espécies gástricas, a seleção de um número maior de colônias aumenta a probabilidade de confirmar a ocorrência de infecção mista.

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed. M= Marcador de peso molecular; 1 a 8 = amostras de positivas pela dPCR em tempo real e submetidas à clonagem molecular: bandas de aproximadamente 252 a 256 pb (vetor + inserto); 9 = amostra positiva pela dPCR em tempo real e submetida à clonagem molecular: banda de aproximadamente 118pb (vetor sem o inserto)



Fonte: Nakamura, A. A. (2013)

Dentre as 27 amostras encaminhadas para sequenciamento, em quatro delas não foi possível a identificação devido à má-qualidade da reação de sequenciamento. Sendo assim, foi possível a identificação da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* em 23 amostras, nas quais foram observadas as seguintes situações de diagnóstico: 1) resultado positivo para *C. galli* pela dPCR em tempo real e pela nPCR; 2) resultado positivo para *C. galli* pela dPCR em tempo real e negativo pela nPCR; 3) presença de infecção mista por *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves detectada pela dPCR em tempo real e negatividade pela nPCR e 4) resultado positivo para *C. galli* ou *Cryptosporidium* genótipo III de aves pela dPCR em tempo real e negatividade pela nPCR (Tabela 2).

Tabela 1 - Amostras fecais de aves positivas pela *nested* PCR para *Cryptosporidium* spp. ou pela PCR duplex em tempo real para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, e identificação molecular da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*

(continuação)

Nome científico	Nome comum	Número de amostras positivas/total de amostras colhidas por espécie de ave (%)	<i>nested</i> -PCR	dPCR em tempo real <i>C. galli</i>	dPCR em tempo real <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves	Sequenciamento <i>n</i> PCR
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio verdadeiro	109/166 (65,66)	-	+	-	nr
		1/166 (0,6)	+	+	-	<i>Cryptosporidium</i> genótipo V de aves
		2/166 (1,2)	+	+	-	nd
<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio do mangue	1/12 (8,33)	+	+	+	nd
		11/12 (91,67)	-	+	-	nr
<i>Amazona vinacea</i>	Papagaio do peito roxo	1/4 (25)	-	+	-	nr
		1/4 (25)	+	+	-	nd
<i>Amazona xantops</i>	Papagaio galego	9/13 (69,23)	-	+	-	nr
<i>Ara chloropterus</i>	Arara vermelha grande	1/24 (4,17)	-	+	-	nr
<i>Aratinga aurea</i>	Periquito rei	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Aratinga auricapillus</i>	Jandaia testa vermelha	1/2 (50)	-	+	-	nr
		1/2 (50)	+	-	-	nd
<i>Aratinga leucophthalmus</i>	Periquito maracanã	2/8 (25)	-	+	-	nr
		1/8 (12,5)	+	+	-	<i>C. galli</i>
<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito rico	1/62 (1,61)	+	-	-	nd
		40/62 (64,52)	-	+	-	nr
<i>Brotogeris tirica/ Agapornis roseicollis*</i>	Periquito rico/ Agapornis rose face	1/2 (50)	+	-	-	<i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves
		1/2 (50)	+	-	-	nd
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Garibaldi	1/5 (20)	+	+	-	nd
		1/5 (20)	-	+	-	nr
<i>Cyanocorax chrysops</i>	Gralha Picaça	2/2 (100)	-	+	-	nr
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	Azulão	25/57 (43,86)	-	+	-	nr
		2/57 (3,51)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		1/57 (1,75)	+	+	-	<i>C. baileyi</i>
		2/57 (3,51)	+	+	-	nd
		1/57 (1,75)	-	-	+	nr

(continuação)

Nome científico	Nome comum	Número de amostras positivas/total de amostras colhidas por espécie de ave (%)	nested-PCR	dPCR em tempo real <i>C. galli</i>	dPCR em tempo real <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves	Sequenciamento nPCR
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	Azulão	1/57 (1,75)	-	+	+	nr
<i>Cyanocorax cristatellus</i>	Gralha do campo	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Deroptus accipitrinus</i>	Anacã	1/1 (100)	+	+	-	nd
<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã nobre	6/10 (60)	-	+	-	nr
<i>Elaenia mesoleuca</i>	Tuque	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Estrilda astrild</i>	Bico de lacre	2/5 (40)	-	+	-	nr
		1/5 (20)	+	+	-	nd
<i>Euphonia chlorotica</i>	Fim fim	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Euphonia chalybea</i>	Cais-cais	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Euphonia violacea</i>	Gaturamo verdadeiro	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Forpus xanthopterygius</i>	Tuim	1/1 (100)	-	+	+	nr
<i>Gnorimopsar chopi</i>	Pássaro preto	13/35 (37,14)	-	+	-	nr
		2/35 (5,71)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		1/35 (2,86)	+	-	-	nd
		1/35 (2,86)	+	-	-	<i>C. galli</i>
Híbrido	Pintagol	3/5 (60)	-	+	-	nr
<i>Haplospiza unicolor</i>	Cigarra bambu	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Icterus cayanensis</i>	Encontro	1/3 (33,33)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		1/3 (33,33)	-	+	-	nr
<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	4/7 (57,14)	-	+	-	nr
<i>Lanio cucullatus</i>	Tico tico rei	2/4 (50)	-	+	-	nr
<i>Mimus saturninus</i>	Sabiá do campo	1/1 (100)	+	+	-	nd
		1/6 (16,67)	-	+	+	nr
		4/6 (66,67)	-	+	-	nr
<i>Molothrus bonariensis</i>	Chopim	1/6 (16,67)	+	+	-	nd
		1/8 (12,5)	+	-	+	<i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves
<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	1/8 (12,5)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		1/8 (12,5)	-	+	-	nr
		2/8 (25)	-	-	+	nr

(continuação)

Nome científico	Nome comum	Número de amostras positivas/total de amostras colhidas por espécie de ave (%)	nested-PCR	dPCR em tempo real <i>C. galli</i>	dPCR em tempo real <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves	Sequenciamento nPCR
<i>Oryzoborus angolensis</i>	Curió	7/9 (77,78)	-	+	-	nr
<i>Oryzoborus maximiliani</i>	Bicudo	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal do Nordeste	17/34 (50)	-	+	-	nr
		1/34 (2,94)	-	+	+	nr
		1/34 (2,94)	+	+	-	nd
		1/34 (2,94)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		1/34 (2,94)	+	-	-	nd
		2/34 (5,88)	+	-	-	nd
<i>Paroaria coronata</i>	Cardeal de topete vermelho	2/3 (66,67)	-	+	-	nr
<i>Passer domesticus</i>	Pardal	3/3 (100)	-	+	-	nr
<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca verde	1/2 (50)	-	-	+	nr
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem te vi	16/29 (55,17)	-	+	-	nr
		3/29 (10,34)	+	+	-	nd
<i>Procnias nudicollis</i>	Araponga	1/2 (50)	+	-	-	nd
<i>Pyroderus scutatus</i>	Pavó	1/1 (100)	-	-	+	nr
<i>Pyrrhura frontalis</i>	Tiriba de testa vermelha	1/4 (25)	-	+	-	nr
<i>Ramphocelus bresilius</i>	Tiê sangue	1/1 (100)	+	-	-	nd
		2/152 (1,32)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		1/152 (0,66)	+	+	-	<i>C. baileyi</i>
		56/152 (36,84)	-	+	-	nr
		7/152 (4,60)	+	+	-	nd
		2/152 (1,32)	+	+	-	<i>C. galli</i> (1) <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves (1)
		1/152 (0,66)	+	-	-	<i>C. galli</i>
		3/152 (1,97)	+	-	-	nd
1/152 (0,66)	-	+	+	<i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves		
<i>Saltatrix atricollis</i>	Bico de pimenta	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Serinus canarius</i>	Canário do reino	4/13 (30,77)	-	+	-	nr
		1/13 (7,69)	+	-	-	nd
		1/13 (7,69)	-	-	+	nr
		1/13 (7,69)	-	+	+	nr

(continuação)

Nome científico	Nome comum	Número de amostras positivas/total de amostras colhidas por espécie de ave (%)	nested-PCR	dPCR em tempo real <i>C. galli</i>	dPCR em tempo real <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves	Sequenciamento nPCR
<i>Sicalis flaveola</i>	Canário da terra	27/58 (46,55)	-	+	-	nr
		7/58 (12,07)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		5/58 (8,62)	+	+	-	nd
		2/58 (3,45)	+	+	-	<i>C. baileyi</i>
		1/58 (1,72)	+	-	-	<i>C. galli</i>
		1/58 (1,72)	+	-	-	nd
		4/58 (6,90)	+	-	-	nd
<i>Sporagra magellanica</i>	Pintassilgo	2/15 (13,33)	+	-	-	nd
		1/15 (6,67)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		10/15 (66,67)	-	+	-	nr
<i>Sporophila albogularis</i>	Golinho	4/5 (80)	-	+	-	nr
<i>Sporophila bouvreuil</i>	Caboclinho	1/4 (25)	-	+	-	nr
<i>Sporophila caerulea</i>	Coleira paulista	24/52 (46,15)	-	+	-	nr
		1/52 (1,92)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		1/52 (1,92)	+	+	-	nd
		4/52 (7,69)	+	-	-	nd
<i>Sporophila falcirostris</i>	Cigarrinha verdadeira	2/10 (20)	-	+	+	nr
		3/10 (30)	-	+	-	nr
<i>Sporophila frontalis</i>	Pixoxó	2/17 (11,76)	+	+	-	nd
		3/17 (17,65)	-	+	+	nr
		4/17 (23,53)	-	+	-	nr
<i>Sporophila lineola</i>	Bigodinho	6/12 (50)	-	+	-	nr
		1/12 (8,33)	+	-	-	<i>C. baileyi</i>
<i>Sporophila nigricolis</i>	Coleira baiano	4/7 (57,14)	-	+	-	nr
		1/7 (14,29)	+	+	-	nd
<i>Sporophila plumbea</i>	Patativa	1/4 (25)	+	+	-	nd
		3/4 (75)	-	+	-	nr
<i>Sporophila sp.</i>	Coleirinho	6/16 (37,5)	+	+	-	<i>C.galli</i>
		3/16 (18,75)	-	+	-	nr
		1/16 (6,25)	+	-	-	<i>C. galli</i>
<i>Taeniopygia guttata</i>	Mandarim	2/2 (100)	-	+	-	nr

(conclusão)

Nome científico	Nome comum	Número de amostras positivas/total de amostras colhidas por espécie de ave (%)	nested-PCR	dPCR em tempo real <i>C. galli</i>	dPCR em tempo real <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves	Sequenciamento nPCR
<i>Tangara ornata</i>	Sanhaço do encontro amarelo	2/3 (66,67)	+	-	-	nd
		1/3 (33,33)	-	+	-	nr
<i>Tangara seledon</i>	Saíra sete cores	1/2 (50)	-	+	-	nr
<i>Tapera naevia</i>	Saci	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Thraupis cyanoptera</i>	Sanhaço encontro azul	2/4 (50)	-	+	-	nr
<i>Thraupis palmarum melanopterus</i>	Sanhaço do coqueiro subsp. Amazonica	1/1 (100)	-	+	-	nr
<i>Thraupis sayaca</i>	Sanhaço cinzento	6/13 (46,15)	-	+	-	nr
		1/13 (7,69)	-	+	+	nr
<i>Turdus albicollis</i>	Sabiá coleira	1/4 (25)	+	-	-	<i>C. baileyi</i>
		1/4 (25)	-	+	-	nr
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Sabiá poca	1/7 (14,29)	+	+	-	<i>C. galli</i>
		2/7 (28,57)	-	+	-	nr
<i>Turdus flavipes</i>	Sabiá una	2/6 (33,33)	-	+	-	nr
<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá barranco	2/8 (25)	+	+	-	nd
		1/8 (12,5)	-	+	-	nr
		1/8 (12,5)	-	+	-	<i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves
		1/8 (12,5)	+	-	-	<i>C. galli</i>
<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá laranjeira	19/47 (40,42)	-	+	-	nr
		1/47 (2,13)	+	+	-	<i>C. baileyi</i> (1)
		2/47 (4,25)	+	+	-	nd
		1/47 (2,13)	+	-	-	<i>C. baileyi</i>
<i>Volatinia jacarina</i>	Tiziu	1/3 (33,33)	-	+	-	nr
<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico tico	13/21 (61,90)	-	+	-	nr
		1/21 (4,76)	-	+	+	nr
		1/21 (4,76)	+	-	-	nd
		1/21 (4,76)	+	+	-	<i>C. galli</i>

* As duas espécies estavam alojadas no mesmo viveiro, não sendo possível identificar a qual espécie pertencia a amostra fecal.

nr: amostras positivas somente pela PCR em tempo real onde algumas amostras foram submetidas ao sequenciamento dos fragmentos amplificados após clonagem molecular, conforme tabela 3.

nd: amostra não identificada por sequenciamento devido à pequena quantidade de DNA amplificado pela *nested* PCR.

Tabela 3 - Resultados do sequenciamento dos fragmentos clonados, resultantes da PCR duplex em tempo real para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, e identificação molecular da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*

Nº de colônias de cada amostra selecionadas para sequenciamento	Amostra	Sequenciamento clones	nPCR	Sequenciamento nPCR	dPCR em tempo real <i>C.galli</i>	dPCR em tempo real <i>Cryptosporidium</i> genótipo III de aves
1	<i>Sporophila caerulescens</i>	<i>C. galli</i>	+	<i>C. galli</i>	+	-
1	<i>Saltator similis</i>	<i>C. galli</i>	+	<i>C. galli</i>	+	-
1	<i>Zonotrichia capensis</i>	<i>C. galli</i>	+	<i>C. galli</i>	+	-
2	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>C. galli</i>	+	<i>C. galli</i>	+	-
1	<i>Sporophila sp.</i>	<i>C. galli</i>	+	<i>C. galli</i>	+	-
1	<i>Gnorimopsar chopi</i>	<i>C. galli</i>	+	<i>C. galli</i>	+	-
3	<i>Sporophila sp.</i>	<i>C. galli</i>	+	<i>C. galli</i>	+	-
2	<i>Nymphicus hollandicus</i>	<i>C. galli</i>	+	<i>C. galli</i>	+	-
1	<i>Amazona vinacea</i>	<i>C.galli</i>	+	-	+	-
2	<i>Saltator similis</i>	<i>C. galli</i>	+	-	+	+
5	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Genótipo III de aves	+	-	-	+
1	<i>Brotogeris tirica</i>	<i>C. galli</i>	-	-	+	-
1	<i>Brotogeris tirica</i>	<i>C. galli</i>	-	-	+	-
3	<i>Sporophila caerulescens</i>	<i>C. galli</i>	-	-	+	+
1		Genótipo III de aves				
3	<i>Paroaria coronata</i>	<i>C. galli</i>	-	-	+	+
1	<i>Serinus canarius</i>	Genótipo III de aves	-		+	+
2		<i>C. galli</i>				
1	<i>Zonotrichia capensis</i>	Genótipo III de aves	-	-	+	+
1		<i>C. galli</i>				
1	<i>Sporophila sp.</i>	<i>C. galli</i>	-	-	+	+
1		Genótipo III de aves				
2	<i>Serinus canarius</i>	Genótipo III de aves	-	-	+	+
2	<i>Amazona aestiva</i>	Genótipo III de aves	-	-	+	+
5	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Genótipo III de aves	-	-	-	+
1	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Genótipo III de aves	-	-	-	+
1	<i>Saltator similis</i>	Genótipo III de aves	-	-	-	+

5 DISCUSSÃO

As amostras foram colhidas no Hospital Veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira da FMVA-UNESP - Araçatuba e, em sua maioria, na Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre da Prefeitura de São Paulo, DEPAVE III, local que abriga uma grande diversidade de espécies de animais, principalmente de aves. A biodiversidade no Brasil é muito ampla, sendo o país considerado como o terceiro em diversidade de espécies de aves do mundo, com registro de aproximadamente 1.800 espécies, segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2011). Grande parte das amostras fecais colhidas foram provenientes de aves apreendidas, oriundas do tráfico de animais silvestres e/ou de aves apresentando alguma enfermidade, muitas vezes com sinais evidentes de estresse.

O comércio de animais silvestres é considerado como a terceira atividade ilegal no mundo, perdendo apenas para o tráfico de armas e drogas (RENCTAS, 2011). Das diversas consequências decorrentes do tráfico, a possibilidade de transmissão de doenças desconhecidas dos animais silvestres para pessoas ou outros animais é considerada uma das mais importantes, uma vez que não há qualquer tipo de controle sanitário na venda desses animais (PAVLIN; SCHLOEGEL; DASZAK, 2009). Dentre as ordens de aves, os Passeriformes e Psittaciformes estão entre as aves mais apreciadas para o comércio ilegal, por se tratarem de aves de canto melodioso ou aquelas consideradas capazes de se tornarem animais de estimação, conferindo assim valores de venda elevados pelos traficantes (FERREIRA; GLOCK, 2004).

Em animais retirados da natureza podem ocorrer distúrbios em sua homeostase em decorrência de manipulação, transporte e alteração brusca de suas dietas, fazendo com que manifestem sinais de estresse, como por exemplo, agressividade, ansiedade, medo, irritabilidade, desvios comportamentais e metabólicos, podendo evoluir, em muitos casos, para o óbito (PACHALY et al., 1993; SCORZA et al., 2010). O estresse ocasionado por agentes físicos externos pode ocasionar supressão da imunidade das aves,

predispondo-as a diversas enfermidades (HOERR, 2010); dessa forma, a colheita de fezes desses animais representa uma excelente oportunidade para detecção de patógenos, dentre eles o *Cryptosporidium*. Silva et al. (2010) descreveram em seu estudo correlação positiva entre a condição de estresse reprodutivo com o aumento de eliminação de oocistos de *C. galli*, além de predispor as aves a outras enfermidades, como infecções concomitantes por *E. coli* e *Isospora* sp.

A maioria das amostras de fezes de aves colhidas nesse experimento foi proveniente de aves adultas, de acordo com a disponibilidade. Ao contrário do que ocorre com outras espécies de *Cryptosporidium* de aves, a idade não é um fator limitante para detecção de espécies gástricas, já que *C. galli* e provavelmente *Cryptosporidium* genótipo III de aves estão associadas a infecções crônicas em aves adultas (SILVA et al., 2010), de forma semelhante ao que ocorre com *C. serpentis* em serpentes adultas (RAMIREZ; WARD; SREEVATSAN, 2004), que promove doença gástrica crônica com presença de eliminação intermitente de oocistos (O'DONOGHUE, 1995).

Neste trabalho, foram utilizados *primers* e sondas para um gene que apresenta cinco cópias por genoma, no caso de *C. parvum* (LE BLANCQ et al., 1997) e provavelmente para as outras espécies, o que aumenta a possibilidade de detecção, particularmente em amostras com pequena quantidade de DNA. Apesar de esse gene ser altamente conservado entre espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, foi possível identificar regiões polimórficas para utilização como *primers* e sondas específicos para detecção das duas espécies gástricas de aves.

As primeiras tentativas de desenho de *primers* e sonda específicos para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves foram feitas com programas gratuitos disponíveis na internet, como o *Primer Blast*, *PrimerQuest* e *Primer3*. No entanto, não foi possível encontrar um conjunto de *primers* e sondas que permitissem a amplificação específica de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves, pois não foram encontradas seqüências, nas regiões polimórficas do gene, que preenchessem os requisitos mínimos necessários para a síntese de

primers e sondas, entre as quais: 1) o produto da amplificação deve variar entre 50 e 150 pares de bases; 2) deve haver 40 a 60% de bases nitrogenadas G e C na constituição do *primer* e da sonda; 3) a temperatura de *melting* da sonda deve ser 10°C acima da temperatura de *melting* dos *primers*.

A solução encontrada foi a utilização do programa *Primer Express*® (Applied Biosystems) e síntese de sondas MGB (*Minor Groove Binder*), que apresentam menor número de nucleotídeos, temperatura de *melting* mais alta e maior especificidade (YAO; NELLÁKER; KARLSSON, 2006). Mesmo com utilização desse programa, só foi possível encontrar um conjunto de *primers* e sonda para cada DNA alvo, referente a sequência do gene 18S rRNA.

Durante a padronização da reação, um reagente importante é o MgCl₂, uma vez que é um cofator para atividade da taq DNA polimerase, possuindo propriedades de doação estável de íons Mg²⁺. Dessa forma, pode afetar as temperaturas de desnaturação das fitas de DNA e de anelamento dos *primers*. Em altas concentrações, pode promover o aparecimento de produtos inespecíficos decorrentes do aumento da atividade enzimática e formação de dímeros de *primers* (ECKERT; KUNKEL, 1990).

Amostras fecais possuem grande quantidade de substâncias com propriedades de inibir a reação de PCR, como metais pesados, polifenóis, ácido húmico, dentre outros, e que são co-purificadas juntamente com o DNA extraído de fezes (CAREY et al., 2004). Em amostras de campo, é importante o uso da BSA, que é uma proteína que aumenta a estabilidade da taq DNA polimerase e também neutraliza e inibe a ação inibidora de algumas substâncias presentes em amostras fecais, sob a taq DNA polimerase (SCHRADER et al., 2012).

Os resultados obtidos na padronização da curva de regressão padrão da dPCR em tempo real para as espécies gástricas de *Cryptosporidium* foram de eficiência de 97,3%, e inclinação de -3,38 para *C. galli*; eficiência de 94,3% e inclinação de -3,46 para *Cryptosporidium* genótipo III de aves. De acordo com

Pfaffl (2001), a eficiência da PCR em tempo real deve ser de $100 \pm 20\%$, correspondente a um valor de inclinação da curva de $-3,6 < \text{inclinação} < -3,1$.

A especificidade analítica para *Cryptosporidium* genótipo III de aves revelou amplificação de DNA de *C. serpentis*, com presença de curva de amplificação atípica, resultado do anelamento errôneo da sonda com o DNA genômico de *C. serpentis*. Hadfield et al. (2011) descrevem resultado semelhante em seu estudo, com amplificação de *Cryptosporidium* genótipo cavalo, concomitantemente com *C. parvum*, por meio de *primers* e sonda *TaqMan* MGB específicos para *C. parvum*. Mesmo com a presença de amplificação inespecífica, os autores discutem a possibilidade da diferenciação das duas espécies por meio da análise da curva de amplificação.

A análise do alinhamento representado no Quadro 3 revela similaridade genética entre *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves com outros genótipos de localização gástrica em aves, como *Cryptosporidium* genótipo IV de aves, que possui semelhança genética com o *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo galinhola, que é muito similar a *Cryptosporidium* genótipo III de aves; em ambos os casos, há presença de substituições de apenas um nucleotídeo no *primer* senso e de dois nucleotídeos na sonda MGB. Devido ao fato dessas duas espécies gástricas terem serem descritas somente uma vez (Morgan et al., 2001; Ng et al., 2006;) e, portanto, apresentarem baixa prevalência, não foi possível a obtenção de DNA para testar a especificidade analítica da dPCR em tempo real, em relação a esses genótipos. Por esses motivos, a possibilidade de amplificação de DNA de outras espécies gástricas de *Cryptosporidium* em aves não pode ser descartada.

A prevalência observada pela *nPCR* para *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de aves, de 10,13% (104/1027), foi maior que a observada anteriormente no Brasil, de 4,86% (47/966) (NAKAMURA et al., 2009) e 6,6% (16/242) (SEVÁ et al., 2011), na Austrália, de 6,3% (27/430) (NG et al., 2006) e na China, de 8,1% (35/434) (QI et al., 2011). Na maioria das amostras positivas pela *nPCR* não foi possível realizar o sequenciamento dos fragmentos amplificados, devido à pequena quantidade de DNA observado à eletroforese,

provavelmente pelo pequeno número de oocistos presentes nas amostras, como já observado anteriormente por Nakamura et al. (2009).

A dPCR em tempo real apresentou maior número de resultados positivos para *C. galli*, 580/1027 (56,47%) quando comparada à nPCR, 104/1027 (10,13%). No caso *Cryptosporidium* genótipo III de aves, houve positividade de 21/1027 (2,04).

A diferença entre a positividade observada na nPCR e na dPCR em tempo real para *C. galli* pode ser devida ao fato de que a PCR em tempo real é uma técnica que, em geral, apresenta maior sensibilidade que a nPCR (DE WAELE et al., 2011; YANG et al., 2009). Neste estudo, grande parte das amostras teve amplificação a partir de 35 Ct, provavelmente pela pequena quantidade de oocistos presentes nas amostras. Os resultados encontrados estão de acordo com Yang et al. (2009), que encontraram positividade pela PRC em tempo real somente com amplificação em altos valores de Ct, em amostras onde não houve detecção pela nPCR, devido à pequena quantidade de oocistos presentes. Essa mesma correlação entre altos valores de Ct e pequena quantidade de patógeno em amostras fecais foi observada por Fillaux et al. (2008), ao utilizarem a PCR em tempo real para diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii*, em humanos.

Cryptosporidium galli é a espécie encontrada com mais frequência em Passeriformes (NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; SILVA et al., 2010; SEVÁ et al., 2011; QI et al., 2011), e todas as amostras fecais foram colhidas de aves que estavam alojadas em um mesmo ambiente, o que possibilita o contato indireto entre elas e o possível contágio da maioria das aves; mesmo não desenvolvendo infecção, elas poderiam carrear oocistos de forma passiva e, assim, apresentarem positividade em uma técnica de diagnóstico de alta sensibilidade, como a PCR em tempo real. Além disso, conforme relato de Nakamura et al. (2009), em infecções por *C. galli* o número de oocistos presentes em lâminas observadas à microscopia é muito baixo, o que justifica a detecção dessa espécie somente com técnicas que apresentam alta sensibilidade.

Cryptosporidium genótipo III de aves já foi citado como uma possível causa de enfermidade gástrica crônica em aves (MAKINO; ABE; REAVILL, 2010). Os trabalhos publicados até o momento indicam que esse genótipo de *Cryptosporidium* apresenta baixa ocorrência em aves (NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; SEVÁ et al., 2011; QI et al., 2012), como observado neste experimento.

No presente estudo, houve uma diferença muito grande entre a positividade obtida pela *n*PCR e pela *d*PCR em tempo real; a única forma de comprovação de que a *d*PCR para *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves realmente apresenta alta especificidade, e que os resultados positivos por essa reação e negativos pela *n*PCR não foram produto de amplificação inespecífica, foi a realização de clonagem molecular dos fragmentos amplificados pela *d*PCR em tempo real, com posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados. Todos os fragmentos amplificados pela *d*PCR em tempo real, que foram selecionados para clonagem molecular e sequenciamento, demonstraram que a seqüência amplificada era a do alvo em questão, confirmando assim que a *d*PCR em tempo real é específica para *Cryptosporidium* de localização gástrica.

Pela primeira vez no Brasil, a ocorrência de *Cryptosporidium* genótipo III de aves foi relatada em passeriformes das espécies *C. brissonii*, *M. bonariensis*, *P. dominicana*, *P. scutatus*, *S. similis*, *S. canaria*, *S. falcirostris*, *S. frontalis*, *T. sayaca*, *T. leucomelas* e em *Z. capensis*. Qi et al. (2012) relataram a ocorrência desse genótipo na espécie de Passeriformes *Urocissa erythrorhyncha*, na China.

Ainda foi possível a identificação do genótipo descrito em calopsitas por Abe e Makino (2010) no Japão e Qi et al. (2012) na China, o genótipo V de aves, encontrado nesse estudo em papagaio verdadeiro. Este é o primeiro relato desse genótipo infectando aves, no Brasil, e ainda não há informações sobre aspectos epidemiológicos e patológicos da infecção por esse genótipo.

A dPCR em tempo real para detecção específica de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves em amostras fecais de aves, desenvolvida no presente trabalho, apresenta potencial para utilização como teste de triagem, pois o teste possui alta capacidade de detecção, favorecendo assim o diagnóstico em indivíduos assintomáticos. Apesar da amplificação de DNA de *C. serpentis*, por *primers* e sonda de *Cryptosporidium* genótipo III de aves, não a possibilidade de diagnóstico falso positivo é remota, uma vez serpentes não fazem parte da dieta alimentar de Passeriformes e Psittaciformes, e *C. serpentis* não infecta aves.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir:

- A dPCR em tempo real não amplifica DNA de outras espécies de *Cryptosporidium* testadas, com exceção de DNA de *C. serpentis*, quando são utilizados os primers e sondas de *Cryptosporidium* genótipo III de aves.
- Comparativamente à nPCR, a dPCR em tempo real apresentou alta capacidade de detecção de DNA de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves.
- A dPCR em tempo real desenvolvida neste estudo é um recurso que apresenta praticidade, rapidez e confiabilidade para diagnóstico de criptosporidiose gástrica em aves.

REFERÊNCIAS

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

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

ALLWRIGHT, D. M.; WESSELS, J. *Cryptosporidium* species in ostriches. **The Veterinary Record**, v. 133, p. 24, 1993.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M. I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M. J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁSQUEZ, S.; NIETO, J. M. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 62, p. 133-145, 2004.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparusaurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1007-1021, 2002.

ALVES, M.; MATOS, O.; SPANO, F.; ANTUNES, F. PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected patients in Lisbon, Portugal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 94, p. 291-297, 2000.

ALVES M. A.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A. A.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2744-2747, 2003.

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, p. 702-705, 2008.

APPLIED BIOSYSTEMS (United States). **Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR.** United States: **Applied Biosystems**, 2003. 8 p

ARAÚJO, A. J.; KANAMURA, H. Y.; ALMEIDA, M. E.; GOMES, A. H.; PINTO, T. H.; SILVA, A. J. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 139-143, 2008.

ARROWOOD, M. J.; STERLING, C. R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1490-1495, 1989.

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

BALATBAT, A. B.; JORDAN, G. W.; TANG, Y. J.; SILVA JÚNIOR, J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1769-1772, 1996.

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

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

BERMUDEZ, A. J.; LEY, D. H.; LEVY, M. G.; FICKEN, M. D.; GUY, J. S.; GERIG, T. M. Intestinal and bursal cryptosporidiosis in turkeys following inoculation with *Cryptosporidium* sp. isolated from commercial poults. **Avian Diseases**, v. 32, p. 445-450, 1988.

BEZUIDENHOUT, A. J.; PENRITH, M. L.; BURGER, W. P. Prolapse of the phallus and sewer in the ostrich (*Struthio camelus*). **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 64, p. 156-168, 1993.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 43, p. 283-288, 2002.

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

BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; HOERR, F. J.; DAVIS, J. F.; GIAMBRONE, J. J. Pathobiology of cryptosporidiosis (*C. baileyi*) in broiler chickens. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 25S-28S, 1991.

BOROWSKI, H.; CLODE, P. L.; THOMPSON, R. C. A. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 509-516, 2008.

BRANTLEY, R. K.; WILLIAMS K. R.; SILVA T. M.; SISTROM M.; THIELMAN, N. M.; WARD, H.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. AIDS-Associated Diarrhea and Wasting in Northeast Brazil is Associated With Subtherapeutic Plasma Levels of Antiretroviral Medications and With Both Bovine and Human Subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 16-22, 2003.

BROWNSTEIN, D. G.; STRANDBERG, J. D.; MONTALI, R. J.; BUSH, M.; FORTNER, J. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 606-617, 1977.

BULL, S.; CHALMERS, R.; STURDEE, A. P.; CURRY, A.; KENNAUGH, J. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p.195-197, 1998.

BUSHEN, O. Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R. C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; FAYER, R.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 378-384, 2006

CAMA, V. A.; BERN, C.; ROBERTS, J.; CABRERA, L.; STERLING, C. R.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R. H.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1567-1574, 2008.

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

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

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

CARRENO, R. A.; MARTIN, D. S.; BARTA, J. R. *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v. 85, p. 899-904, 1999.

CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. Cryptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man, 2. ed. Paris: OIE, 1988, p. 122.

CLUBB, S. L. Cryptosporidiosis in the Gouldian finch. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 11, p. 41-42, 1997.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (2011) **Listas das aves do Brasil**. 10ª Edição, 25/1/2011, Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: [20.01.2013].

CURRENT, W. L. *Cryptosporidium* Species. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine current therapy**. 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B Saunders Company, 1999. p. 121-131.

CURRENT, W. L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 59-82.

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.

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

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

DE WAELE, V.; BERZANO, M.; BERKVEN, D.; SPEYBROECK, N.; LOWERY, C.; MULCAHY, G. M.; MURPHY, T. M. Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 76–89, 2011.

DHILLON, A. S.; THACKER, H. L.; DIETZEL, A. V.; WINTERFIELD, R. W. Respiratory cryptosporidiosis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 256, 747-751, 1981.

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

DITRICH, O.; KOPÁČEK, P.; KUCEROVÁ, Z. Antigenic characterization of human isolates of cryptosporidia. **Folia Parasitologica**, v. 40, p. 301-305, 1993.

DITRICH, O.; PALKOVIC, L.; STERBA, J.; PROKOPIC, J.; LOUDOVÁ, J.; GIBODA, M. The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. **Parasitology Research**, v. 77, p. 44-47, 1991.

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

ECKERT, K.; KUNKEL, T. A. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 3739-3744, 1990.

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

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

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. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 675-682, 2012.

FALL, A.; THOMPSON, R. C. A.; HOBBS, R. P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**, v. 59, p. 399-402, 2003.

FAYER, R.; LEEK, R. G. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on *in vitro* excystation of *Cryptosporidium*. **Journal of Protozoology**, v. 31, p. 567-569, 1984.

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

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 192-200, 2009.

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 191-198, 2008.

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

FAYER, R.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LAL, A. A.; DUBEY, J. P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1415-1422, 2001.

FERREIRA, C. M.; GLOCK, L. Diagnóstico preliminar sobre a avifauna traficada no Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, v. 12, n. 1, p. 21-30, 2004.

FILLAUX, J.; MALVY, S.; ALVAREZ, M.; FABRE, R.; CASSAING, S.; ARCHOU, B.; LINAS, M. D.; BERRY, A. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, p. 258–261, 2008.

FLETCHER, O. J.; MUNNELL, J. F.; PAGE, R. K. Cryptosporidiosis of the bursa of Fabricius of chickens. **Avian Diseases**, v. 19, p. 630-639, 1975.

GAJADHAR, A. A. *Cryptosporidium* species in imported ostriches and consideration of possible implications for birds in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 115-116, 1993.

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

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

GHARAGOZLOU, M. J.; DEZFOULIAN, O.; RAHBARI, S.; BOKAIE, S.; JAHANZAD, I.; RAZAVI, A. N. E. Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 53, p. 282–285, 2006.

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

GONÇALVES, E. M. N.; DA SILVA, A. J.; EDUARDO, M. B. P.; UEMURA, I. H.; MOURA, I. S.; CASTILHO, V. L. P.; CORBETT, C. E. P. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, p. 119-126, 2006.

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

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

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

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

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

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

GOODWIN, M. A.; LATIMER, K. S.; BROWN, J.; STEFFENS, W. L.; MARTIN, P. W.; RESURRECCION, R. S.; SMELTZER, M. A.; DICKSON, T. G. Respiratory cryptosporidiosis in chickens. **Poultry Science**, v. 67, p. 1684-1693, 1988a.

GOODWIN, M. A.; STEFFENS, W. L.; RUSSEL, I. D.; BROWN, J. Diarrhea associated with intestinal cryptosporidiosis in turkeys. **Avian Diseases**, v.32, p. 63-67, 1988b.

GORHAM, S. L.; MALLINSON, E. T.; SNYDER, D. B.; ODOR, E. M. Cryptosporidia in the bursa of Fabricius: a correlation with mortality rates in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 16, p. 205-211, 1987.

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

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; FAYER, R.; TROUT, J.; GOODALE, H. J. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts is retained upon intestinal passage through a migratory water-fowl species (Canada goose *Branta canadensis*). **Tropical Medicine & International Health**, v. 2, p. 341-347, 1997a.

GRACZYK, T. K.; FAYER, R.; CRANFIELD, M. R. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium parvum*: implications for water-borne cryptosporidiosis. **Parasitology Today**, v. 13, p. 348-351, 1997b.

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

GRACZYK, T. K.; SUNDERLAND, D.; TAMANG, L.; SHIELDS, T. M.; LUCY, F. E.; BREYSEE, P. N.: Quantitative evaluation of the impact of bather density on levels of human-virulent microsporidian spores in recreational water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4095–4099, 2007.

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

HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples using real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 918–992, 2011.

HAJDUSEK, O.; DITRICH, O.; SLAPETA, J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 183-192, 2004.

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.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; MORGAN, U. M.; OLSON, M. E.; THOMPSON, R. C. A. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni* with evidence for the existence of novel extracellular stages in the *Cryptosporidium* life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1719-1726, 2002.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; NG'ANZO, M.; RYAN, U. M.; OLSON, M. E.; COX, P. T.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 769–777, 2004.

HOERR, F. J. Clinical Aspects of Immunosuppression in Poultry. **Avian Diseases**, v. 54, p. 2-15, 2010.

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

HOERR, F. J.; RANCK, F. M.; HASTINGS, T. F. Respiratory cryptosporidiosis in turkeys. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, p. 1591-1593, 1978.

HOMEM, C. G.; NAKAMURA, A. A.; SILVA, D. C.; TEIXEIRA, W. F.; COELHO, W. M.; MEIRELES, M. V. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1741-1745, 2012.

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

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 28, p. 13-35, 1979.

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

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

JARDINE, J. E.; VERWOERD, D. J. Pancreatic cryptosporidiosis in ostriches. **Avian Pathology**, v. 26, p. 665-670, 1997.

JELLISON, K. L.; DISTEL, D. L.; HEMOND, H. F.; SCHAUER, D. B. Phylogenetic analyses of the hypervariable region of the 18s rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canadá Geese (*Branta Canadensis*): Evidence for five novel genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 452-458, 2004.

JELLISON, K. L.; DISTEL, D. L.; HEMOND, H. F.; SCHAUER, D. B. Phylogenetic analysis implicates birds as a source of *Cryptosporidium* spp. oocysts in agricultural watersheds. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 3620-3625, 2007.

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

JIRKŮ, M.; VALIGUROVÁ, A.; KOUDELA B.; KŘÍŽEK J.; MODRÝ D.; ŠLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitologica**, v. 55, p. 81-94, 2008.

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 of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 623-626, 2003.

JOTHIKUMAR, N.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; QVARNSTROM, Y.; HILL, V. R. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1099-1105, 2008.

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

KHEL, K. S. C.; CICIRELLO, H.; HAVENS, P. L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 416-418, 1995.

KONDO, N.; SEQUEIRA, J. L.; BORETTI, L. P.; BANDARRA, E. P. *Cryptosporidium* sp. em bursa de Fabricius de frango de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda, **Anais...** 1994. p. 320.

KOUDELA, B.; MODRÝ, D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. **Folia Parasitologica**, v. 45, p. 93-100, 1998.

KUO, C. H.; WARES, J. P.; KISSINGER, J. C. The apicomplexan whole genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 2689-2698, 2008.

LATIMER, K. S.; GOODWIN, M. A.; DAVIS, M. K. Rapid cytologic diagnosis of respiratory cryptosporidiosis in chickens. **Avian Diseases**, v. 32, p. 826-830, 1988.

LE BLANCQ, S. M.; KHRAMTSOV, N. V.; ZAMANI, F.; UPTON, S. J.; WU, T. W. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, p. 463-478, 1997.

LEAV, B. A.; MACKAY, M. R.; ANYANWU, A.; O'CONNOR, R. M.; CEVALLOS, A. M.; KINDRA, G.; ROLLIN, N. C.; BENNISH, M. L.; NELSON, R. G.; WARD, H. D. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3881-3890, 2002.

LEVINE, N. D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Parasitology**, v. 66, p. 830-834, 1980.

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

LIMOR, J. R.; LAL, A. A.; XIAO, L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.7, p. 2335-2338, 2002.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; ERNEST, J. A. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in chickens. **Journal of Parasitology**, v. 73, 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 Diseases**, v. 34, p. 791-793, 1990.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; HOERR, F. J.; SMITH, P. C. Cryptosporidiosis in zoo and pet birds. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 180S-181S, 1991.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; SUNDERMANN, C. A. Morphometric comparison of the oocysts of *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis* from birds. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 56, p. 91-92, 1989.

LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; OWENS, D. S.; MORGAN, M.; MEAD, J. R.; BLAGBURN, B. L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 91-95, 2000.

LUVIZOTTO, M. C. R.; MEIRELES, M. V.; ANDREATTI FILHO, R. L.; BORETTI, L. P. Alterações histopatológicas na bursa de Fabricius de frangos de corte determinadas por *Cryptosporidium* spp. In: JORNADA CIENTÍFICA DA ASSOCIAÇÃO DOS DOCENTES DO CAMPUS DE BOTUCATU-UNESP, 1989, Botucatu, **Anais...** 1989. p. 120.

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.

MAGI, B.; CANOCCHI, V.; TORDINI, G.; CELLSEI, C.; BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**, v. 98, p. 150-152, 2006.

MAKINO, I.; ABE, N.; REAVILL, D. R. *Cryptosporidium* Avian Genotype III as a Possible Causative Agent of Chronic Vomiting in Peach-Faced Lovebirds (*Agapornis roseicollis*). **Avian Diseases**, v. 54, p. 1102-1107, 2010.

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

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

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

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

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

MEIRELES, M. V.; PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; COSTA, A. J.; LUVIZOTTO, M. C. R.; DORETTO JUNIOR, L.; AVILA, F. A. Influência da infecção experimental com *Cryptosporidium baileyi* na resposta imune de frangos de corte vacinados contra a doença de Newcastle. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 5, p. 15-19, 1998b.

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

MEIRELES, M. V.; RODRIGUES, R. L.; CARVALHO, E. C. Q. Criptosporidiose em frangos de corte no município de Bom Jardim, RJ. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.12, nº único, p. 41-42, 1990.

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

MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v. 70, p. 1156-1160, 1976.

MILLARD, P. S.; GENSHEIMER, K. F.; ADDISS, D. G.; SOSON, D. M.; BECKETT, G. A.; HOUCK-JANKOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v. 272, p. 1592-1196, 1994.

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

MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. A. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 995-998, 1998b.

MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward?. **Parasitology Today**, v. 14, p. 241-245, 1998.

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

MORGAN, U. M.; WEBER, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; THOMPSON, R. C.; NDIRITU, W.; LAL, A.; MOORE, A.; DEPLAZES, P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1180-1183, 2000b.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1733-1751, 1999a.

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

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

NACIRI, M.; MAZZELLA, O. Association cryptosporidiose et maladie de Marek chez des poulets nains. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 164, p. 311-312, 1988.

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

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

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

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

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

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

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 139-195, 1995.

OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; CRABB, J. H.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1275-1281, 1999.

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

ONG, C. S. L.; EISLER, D. L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V. W. K.; TOMBLIN J.; BOWIE, W. R.; ISSAC-RENTON, J. L. Novel *Cryptosporidium* genotypes specific in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 263-268, 2002.

PACHALY, J. R.; WERNER, P. R.; SCHIMANSKI, J. C.; CIFFONI, E. M. G. Estresse por captura e contenção em animais selvagens. **A Hora Veterinária**, v.13, n.74, p.47- 52, 1993.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PAGÈS-MANTÉ, A.; PAGÈS-BOSCH, M.; MAJÓ-MASFERRER, N.; GÓMEZ-COUSO H.; ARES-MAZÁS, E. Na 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.

PALKOVIC, L.; MAROUSEK, V. The pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912 and *C. baileyi* Current, Upton et Haynes, 1986 for chickens. **Folia Parasitologica**, v. 36, p. 209-217, 1989.

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

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Remedia – Klinická Mikrobiologie**, v. 3, p. 290-301, 1999.

PAVLÁSEK, I. Findings of Cryptosporidia in the stomach of chickens and of exotic and wild birds. **Veterinarstvi**, v. 51, p. 103-108, 2001.

PAVLÁSEK, I.; LAVICKOVA, M.; HORAK, P.; KRAL, J.; KRAL, B. *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity at Prague zoo. **Gazella**, v. 22, p. 99-108, 1995.

PAVLÁSEK, I.; RYAN, U. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 434-437, 2008.

PAVLIN, B. I.; SCHLOEGEL, L. M.; DASZAK, P. Risk of Importing Zoonotic Diseases through Wildlife Trade, United States. **Journal Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1721-1726, 2009.

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

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

PENG, M. M.; XIAO, L.; FREEMAN, A. R.; ARROWOOD, M. J.; ESCALANTE, A. A.; WELTMAN, A. C.; ONG, C. S. L.; MACKENZIE, W. R.; LAL, A. A.; BEARD, C. B. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: Evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerging Infection Diseases**, v. 3, p. 567-573, 1997.

PENRITH, M. L.; BURGER, W. P. A. *Cryptosporidium* sp. in an ostrich. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 64, p. 60-61, 1993.

PENRITH, M. L.; BEZUIDENHOUT, A. J.; BURGER, W.P.; PUTTERILL, J. F. Evidence of cryptosporidial infection as a cause of prolapse of the phallus and cloaca in ostrich chicks (*Struthio camelus*). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 283-289, 1994.

PETRY, F. Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, p. 586-601, 2004.

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

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 187-199, 2009.

POWER, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium macropodum* n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern gray kangaroos *Macropus giganteus*. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1114-1117, 2008.

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.

PROCTOR, J. S.; KEMP, R. L. *Cryptosporidium anserinum* sp. n. (Sporozoa) in a domestic goose *Anser anser* L., from Iowa. **Journal of Protozoology**, v. 21, p. 654-666, 1974.

QI, M.; WANG, R., NING, C.; LI, X.; ZHANG, L.; JIAN, F.; SUN, Y.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: Genetic diversity and potencial 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**, v.6, p. 1-13, 2004.

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

RENTAS (Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres). **1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre**. 2011. Disponível em: <<http://www.rentas.org.br/>>. Acesso em: 25.01.2013.

RHEE, J. K.; KIM, H. C.; LEE, S. B.; YOON, S. Y. Immunosuppressive effect of *Cryptosporidium baileyi* on vaccination against Newcastle disease in chickens. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, p. 121-125, 1998.

RIERA, R. F.; SANTOS, M. M. A. B.; ROBERTO, L. O.; MEIRELES, M. V. Detecção de *Cryptosporidium* sp. em avestruzes (*Struthio camelus*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 30., 2003. Manaus. **Anais...** Manaus: CONBRAVET, 2003. 1 CD ROM.

RITTER, G. D.; LEY, D. H.; LEVY, M. G.; GUY, J. S.; BARNES, H. J. Intestinal cryptosporidiosis and reovirus isolation from Bobwhite quail (*Colinus virginianus*) with enteritis. **Avian Diseases**, v. 30, p. 603-608, 1986.

ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; KATZER, F. Redescription of *Cryptosporidium cuniculus* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v.40, p. 1539–1548, 2010.

ROSALES, M. J.; PERÉZ CORDÓN, G.; SÁNCHEZ, M. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. **Acta Tropica**, v. 95, p. 74–78, 2005.

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

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

RYAN, U. M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p.22–26, 2008.

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

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

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1014-1026, 2012.

SCORZA, F. A., ALBUQUERQUE, R. D., ARIDA, R. M., ALBUQUERQUE, M. D., TERRA, V. C., MACHADO, H. R., CYSNEIROS, R. M., SCORZA, C. A., CAVALHEIRO, E. A. What are the similarities between stress, sudden cardiac death in *Gallus gallus* and sudden unexpected death in people with epilepsy. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 68, n. 5, 2010.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; 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, C. V.; FERREIRA, M. S.; GONÇALVEZ-PIRES, M. R. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Detection of *Cryptosporidium* - specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1097-1099, 2003.

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, p. 271-277, 2010.

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

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 29-40, 2007.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today**, v. 14, p. 14-22, 1998.

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

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; CRISANTI, A.; SALLICANDRO, P.; MORGAN, U. M.; LE BLANCO S. M.; TCHACK, L.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3255-3259, 1998.

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

- SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds - A review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, p. 261-279, 2000.
- STROUP, S. E.; ROY, S.; MCHELE, J.; MARO, V.; NTABAGUZI, S.; SIDDIQUE, A.; KANG, G.; GUERRANT, R. L.; KIRKPATRICK, B. D.; FAYER, R.; HERBEIN, J.; WARD, H.; HAQUE, R.; HOUP, E. R. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1217-1222, 2006.
- SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**, v.88, p. 388-394, 2002.
- SULAIMAN, I. M.; XIAO, L.; YANG, C.; ESCALANTE, L.; MOORE, A.; BEARD, C. B.; ARROWOOD, M. J.; LAL, A. A. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 681-685, 1998.
- SUNDERMANN, C. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. In vitro excystation of *Cryptosporidium baileyi* from chickens. **Journal of Protozoology**, v. 34, p.28-30, 1987.
- TANRIVERDI, S.; WIDMER, G. Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, p.113-122, 2006.
- TARWID, J. N.; LAWTHORN, R. J.; RIDDELL, C. Cryptosporidiosis in the respiratory tract of turkeys in Saskatchewan. **Avian Diseases**, v. 29, p. 528-532, 1985.
- THAM, V. L.; KNIESBERG, S.; DIXON, B. R. Cryptosporidiosis in quails. **Avian Pathology**, v. 11, p. 619-626, 1982.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acids Researchs**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.
- THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; WATT, P.; DOWD, S .E.; ENRIQUEZ, R.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 378-382, 2002.

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

TILLEY, M.; UPTON, S.J.; FREED, P. S. A comparative study of the biology of *Cryptosporidium serpentis* and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 21, p. 463–467, 1990.

TUMOVÁ, T.; SKRIVAN, M.; MAROUNEK, M.; PAVLÁSEK, I.; LEDVINKA, Z. Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. **Avian Diseases**, v. 46, p. 203–207, 2002.

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

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

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v. 23, p. 487-509, 1910.

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

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

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

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

VETTERLING, J. M.; JERVIS, H. R.; MERRILL, T. G.; SPRINZ, H.
Cryptosporidium wrairi sp. n. from the Guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. **Journal of Protozoology**, v. 18, p. 243-247, 1971.

WAGES, D. P.; FICKEN, M. D. Cryptosporidiosis and turkey viral hepatitis in turkeys. **Avian Diseases**, v. 33, p. 191-194, 1989.

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, p. 37-42, 2001.

WOODMANSEE, D. B.; PAVLÁSEK, I.; POHLENZ, J. F. L.; MOON, H. W. Subclinical cryptosporidiosis of turkeys in Iowa. **Journal of Parasitology**, v. 74, p. 898-900, 1988.

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

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

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: ORTEGA, Y. R.; DOYLE, M. P. **Foodborne parasites**. New York, LLC: Springer-Verlag, 2006. p. 57-108.

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

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation 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, p. 72-97, 2004.

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

XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocysts wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5499- 5502, 2000b.

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

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

YANG, R.; JACOBSON, C.; GORDON, C.; RYAN, U. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 19–24, 2009.

YAO, Y.; NELLÁKER, C.; KARLSSON, H. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. **Molecular and cellular probes**, v. 20, p. 311-316, 2006.

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

ZIEGLER, P. E.; WADE, S. E.; SCHAAF, S. L.; STERN, D. A.; NADARESKI, C. A.; MOHAMMED, H. O. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology**, v.147, p. 176–184, 2007.

ZYLAN, K.; BAILEY, T.; SMITH, H. V.; SILVANOSE, C.; KINNE, J.; SCHUSTER, R. K.; HYLAND, K. An outbreak of cryptosporidiosis in a collection of stone curlews (*Burhinus oedicephalus*) in Dubai. **Avian Pathology**, v. 37, p. 521-526, 2008.