



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MÉRCIA DE SEIXAS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM POMBOS (*ZENAIDA
AURICULATA*) DA CIDADE DE LONDRINA, PARANÁ.**

MÉRCIA DE SEIXAS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM POMBOS (*ZENAIDA
AURICULATA*) DA CIDADE DE LONDRINA, PARANÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Seixas, Mérica de.

Ocorrência e caracterização genética de *cryptosporidium* spp. em pombos (*zenaida auriculata*) da cidade de Londrina, Paraná. / Mérica de Seixas. - Londrina, 2016.
46 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Pombos - Tese. 2. Nested-PCR - Tese. 3. Criptosporidiose - Tese. 4. Epidemiologia - Tese. I. Garcia, João Luis . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

MÉRCIA DE SEIXAS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM POMBOS (*ZENAIIDA AURICULATA*) DA
CIDADE DE LONDRINA, PARANÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani
Universidade Estadual de São Paulo - UNESP

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Isilda Carlos Seixas e José Glaucio de Seixas (in memoriam) pelo amor incondicional e apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Lincoln, Giovana, André, minhas cunhadas Marcela e Carla, e meu sobrinho Gabriel por toda parceria, amizade e cumplicidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Luís Garcia, pela oportunidade, ensinamentos, paciência, compreensão e amizade.

Aos Professores Dr. Selwyn Arlington Headley e Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani que prontamente aceitaram participar da banca de defesa, e pelas contribuições ao projeto.

As Professoras Dra. Roberta Lemos Freire e Dra. Regina Mitsuka Breganó que prontamente aceitaram participar da banca de qualificação, e pelas contribuições ao projeto.

Aos professores João Luis Garcia, Milton Hissashi Yamamura, José da Silva Guimarães Júnior, Odilon Vidotto e Ademir Benedito da Luz Pereira, Italmar Teodorico Navarro, pela oportunidade, confiança, amizade e ensinamentos durante a residência.

A muitos professores que me acompanharam durante graduação, residência e mestrado, pelos ensinamentos.

A todos os colegas de laboratório, pela ajuda sempre que necessário e pela amizade.

Ao meu irmão, parceiro e trutinha e meu eterno R2 Victor, por toda paciência, amizade, risadas, plantões, ensinamentos no laboratório e contribuição para realização deste projeto.

Aos residentes e ex-residentes do laboratório de parasitologia, os filhos da Dalvinha, Thaís, Alessandra, Sérgio, Ivo, Ana Flávia e João Pedro.

Aos estagiários Winni, Isabelli, Lya e Camila pela amizade.

Aos colegas de trabalho que se tornaram verdadeiros amigos Felipe, Ana Sue, Thaís Cabral, Priscilla, Maria Paula, Vanessa, Nelson Daniel, Aline Benitez, Luciane.

As parcerias de residência, plantões na MI e mestrado Joice, Roberta e Hannah.

À técnica do laboratório de parasitologia Dalva por toda paciência, amizade, risadas e ensinamentos.

Aos funcionários dos laboratórios, secretários do DMVP, PÓS, HV, enfermeiros e o pessoal da Limpeza, Beatriz, Elizabete, Aldair, Cristiane, Inês, Zé da micro, Hélio, Luciene, Valdecir, Helenice, Vilma, Rose, Neusa, Rosane, Ademir, Pereira, Maria José, Neusa, Débora e Maristela por estarem sempre prontos para atender nossas necessidades por facilitar nosso trabalho ao máximo possível tanto residência quanto mestrado.

Aos meus amigos de Londrina, pelas risadas, confusões, passeios, alguns veterinários outros agregados, Eduardo (Duardio), Gabriela (Cabeção), Carol, Cristiane, Brígida, Gabriela Milani, Ed Galvão, Karyn (Cid), Débora (Vet), Mariana, Renata, Jandiara, Lays, Iara, Mari (Suki), Luis, Taciane, Sarah.

Aos bichos que são filhos dos amigos que acabam virando sobrinhos, Moshi, Kyone, Toni, Guinho, Bernardo, Colly, Minhoca, Suki, Moli, Fofinha, Gordinho, Floquinho e Tekis.

A Mundi minha companheira, filha, que me aguenta todos os dias.

Aos pombos que foram utilizados no projeto, pois sem eles seria impossível realizar esse projeto.

Ao programa de pós-graduação pela oportunidade, e auxílio na realização desse trabalho.

A Capes, pela aprovação e financiamento do nosso projeto.

”Conhecimento não é aquilo que você sabe,
mas o que você faz com aquilo que você sabe. ”

(Aldous Huxley)

SEIXAS, MÉRCIA. **Ocorrência e caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. em pombos (*Zenaida auriculata*) da cidade de Londrina, Paraná.** 2016. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O *Cryptosporidium* é um protozoário que parasita diversas espécies animais incluindo o homem. Transmitido por via fecal-oral por meio da ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos. Existem várias espécies de *Cryptosporidium*, porém, nas aves as espécies mais comuns são *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium galli*. O pombo *Zenaida auriculata*, popularmente conhecido como amargosinha ou pomba-de-bando, é comum em centros urbanos e nas áreas rurais, e poderia atuar como hospedeiro de *Cryptosporidium*. Este parasita já foi encontrado em mais de 30 espécies de aves no mundo, porém nenhum estudo foi publicado visando detectar esse protozoário em *Z. auriculata*. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência e caracterizar geneticamente o *Cryptosporidium* spp. em pombos da espécie *Z. auriculata* na cidade de Londrina, Paraná. Para isso, foram capturados 196 pombos, naturalmente infectados de ambos os sexos, da espécie *Z. auriculata* em armadilhas tipo arapuca (com iscas), na área urbana e peri-urbana da cidade de Londrina. Após a eutanásia dos animais, o trato gastrintestinal foi retirado e aberto, e o conteúdo intestinal foi colhido, armazenado em microtubos e mantidos em freezer a -20°C até o processamento. Para determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nas fezes foi realizada a n-PCR do gene 18S rRNA. Dos 196 animais estudados, 30 aves apresentavam-se positivos (15,3%). Destas amostras positivas, 15 foram sequenciadas e suas espécies determinadas. Sendo que 87,6% (13/15) foi positiva para *C. meleagridis* e 13,3% (2/15) para *C. galli*. Este é o primeiro estudo a descrever a presença de *Cryptosporidium* nas fezes da espécie *Z. auriculata*. Podemos observar também a relevância para saúde pública devido ao potencial zoonótico do *C. meleagridis* e o caráter sinantrópico de *Z. auriculata*.

Palavras-chave: Pombos. Nested-PCR. Criptosporidiose. Epidemiologia.

SEIXAS, MÉRCIA. **Occurrence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. in doves (*Zenaida auriculata*) from Londrina City, Parana State.** 2016. 46p. Dissertation (Master in Animal Science) – State University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Cryptosporidium is a protozoa that parasites a large number of animal species including humans. It is transmitted through fecal-oral route by ingesting water and food contaminated with oocysts. There are plenty of *Cryptosporidium* species, however, the most common species in birds are *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium galli*. The dove *Zenaida auriculata*, popularly known as eared dove, is very common in urban and rural areas, and could act as a host to *Cryptosporidium*. This parasite has been already found in more than 30 avian species in the world, but there is no published study on detection of this protozoa in *Z. auriculata*. The aim of this work was to verify the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in naturally infected doves *Z. auriculata*, trap-captured in Londrina City, Parana State. For this study, 196 doves of both sexes were trap-captured in urban and near urban areas of Londrina. After euthanasia, the gastrointestinal tract was taken and opened, and the intestinal content was collected, stored in microtubes and kept in freezer - 20°C until it was processed. To determine the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples, a n-PCR was performed. From the 196 birds, 30 were positives (15.3%). From this positive samples, 15 were successfully sequenced and their species were determined. They resulted in 87.6% (13/15) *C. meleagridis* and 13.3% (2/15) *C. galli*. This is the first work to describe the presence of *Cryptosporidium* in feces of *Z. auriculata*. We also note the importance to public health due to the zoonotic potential of *C. meleagridis* and synanthropic character of *Z. auriculata*.

Keywords: Doves. Nested-PCR. Cryptosporidiosis. Epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fotografia de *Zenaida auriculata* adulta 14
- Figura 2** – Mapa de registro de ocorrência de pombos *Zenaida auriculata* de acordo com os biomas brasileiros 14
- Figura 3** – Árvore filogenética de sequências do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* de aves da espécie *Zenaida Auriculata* deste estudo e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank..... 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação do grau de similaridade das amostras obtidas neste estudo comparadas com sequencias previamente depositadas no GenBank.....	33
Tabela 2 – Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em pombos (<i>Zenaida auriculata</i>) segundo os locais de captura, Londrina/PR, de setembro de 2010 até junho de 2014.....	34
Tabela 3 – Presença de machos e fêmeas de pombos (<i>Zenaida auriculata</i>) em diferentes locais de captura, em Londrina/PR, de setembro de 2010 até junho de 2014.....	34
Tabela 4 – Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em pombos (<i>Zenaida auriculata</i>) segundo o sexo e os diferentes locais de captura, em Londrina/PR, de setembro de 2010 até junho de 2014.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies de <i>Cryptosporidium</i> atualmente descritas	18
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	HISTÓRICO	16
2.2	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	17
2.3	CICLO BIOLÓGICO	18
2.4	ESPÉCIES EM AVES.....	19
2.5	PATOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS EM AVES.....	21
2.6	POTENCIAL ZONÓTICO	21
2.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
	REFERÊNCIAS	23
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	ARTIGO – OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE <i>CRYPTOSPORIDIUM SPP.</i> EM POMBOS (<i>ZENAIDA AURICULATA</i>) DO MUNICÍPIO DE LONDRINA, PARANÁ.	28
4.1	RESUMO	28
4.2	ABSTRACT.....	28
4.3	INTRODUÇÃO.....	29
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.4.1	Local e população de estudo	30
4.4.2	Coleta de Amostras	30
4.4.3	Extração de DNA	30
4.4.4	Protocolo de Reação Em Cadeia Da Polimerase (PCR).....	31
4.4.5	Sequenciamento Genético e Árvore filogenética	31
4.4.6	Análise Estatística	32
4.5	RESULTADOS.....	32
4.6	DISCUSSÃO.....	36

4.7	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE A – Aceite do Comitê de Ética em Experimentação Animal	44

1 INTRODUÇÃO

Cryptosporidium pertence ao Filo Apicomplexa (LEVINE, 1988), Subclasse *Coccidia*, Gênero *Cryptosporidium*. É um protozoário que parasita mamíferos (incluindo o homem), répteis, aves, roedores e peixes (MONIS, THOMPSON, 2003). É transmitido por via fecal – oral, principalmente por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos, causando uma infecção gastrintestinal (MONIS, THOMPSON, 2003). Estes protozoários têm distribuição mundial e já foram descritos em 95 países (RYAN et al., 2014). Atualmente, já foram descritas mais de 20 espécies de *Cryptosporidium*, através de estudos epidemiológicos e experimentais, no entanto, existem genótipos não caracterizados como espécies (SLAPETA, 2013). A primeira descrição de *Cryptosporidium* em aves foi realizada por Tizzer em 1929, no epitélio de galinhas jovens. A criptosporidiose está entre as principais causas de infecção parasitária nas aves domésticas e selvagens, sendo relatada em mais de 30 espécies de aves em todo o mundo (O' DONOGHUE, 1999; FAYER, 2010; RYAN, 2010). As três espécies reconhecidas de *Cryptosporidium* que infectam as aves são: *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* (FAYER, 2010; RYAN, 2010).

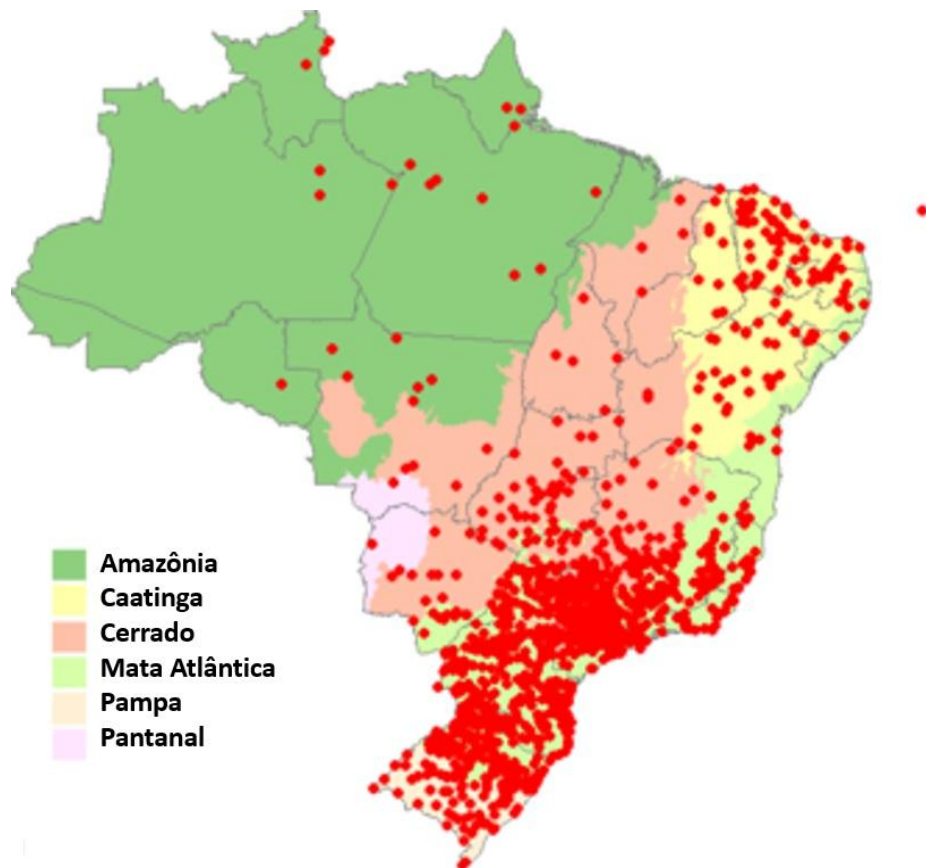
O pombo *Zenaida auriculata* (DES MURS, 1847), é também conhecido no Brasil de acordo com sua localização geográfica, como pomba - de - bando (Sul), amargosa (Sudeste) ou avoante (Nordeste). Aves desse gênero apresentam algumas características físicas que auxiliam em sua identificação (Figura1) como: dorso pardo; cabeça com duas faixas negras laterais aos olhos; manchas negras na asa bem delimitadas; coloração da cabeça do macho é azulada e a fêmea tom amarronzado; tamanho intermediário (aproximadamente 23 cm) e os pés e pernas são vermelhos (SICK, 1997). Pertencem à Ordem Columbiformes, Família Columbidae e Gênero *Zenaida*. Esta ave pode formar bandos durante as migrações ou nas colônias onde repousam durante o período noturno. Elas ocorrem das Antilhas (América Central), à Terra do Fogo, (América do Sul), e descontinuamente em todo o território brasileiro, principalmente em regiões abertas como campos de cultivos, margens de florestas, caatinga, cerrado, podendo ser encontrada no arquipélago de Fernando de Noronha (SOUZA et al., 2007; SICK, 1997). Na Figura 2 pode-se observar a sua distribuição no território brasileiro.

Figura 1 – Fotografia de *Z. auriculata* adulta.



Fonte: <http://ibc.lynxeds.com/photo/eared-dove-zenaida-auriculata/pomba-de-bando>

Figura 2 – Mapa de registro de ocorrência de pombos *Zenaida auriculata* de acordo com os biomas brasileiros.



Fonte: IBGE.

Zenaida auriculata alimentam-se geralmente de sementes cultivadas como grãos de trigo, milho, soja, sorgo, amendoim, e no período de escassez se alimentam de plantas silvestres, frutos e resíduos alimentares produzidos pelo homem. Em alguns países da América do Sul como Brasil, Argentina, Uruguai e Colômbia elas são consideradas pragas agrícolas, devido aos prejuízos econômicos (MURTON et al., 1974; CANDIDO JR, 2008; RANVAUD et al., 2001).

Diversas técnicas diagnósticas são empregadas para verificação da presença do *Cryptosporidium* nas fezes, dentre elas a técnica de Ziehl-Neelsen modificado, que se baseia na coloração de esfregaços de fezes na qual pode-se detectar oocistos de *Cryptosporidium* por microscopia direta. No entanto, os métodos de diagnóstico baseados em microscopia direta, apresentam baixa sensibilidade quando comparado a outras técnicas de diagnóstico, como as técnicas moleculares, pois requerem pessoal treinado para identificar o protozoário. Além disso, sua estrutura pode ser confundida com outros patógenos que se coram de maneira semelhante, como as Cianobactérias. Uppal e colaboradores (2014), compararam a sensibilidade entre o método diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado e a Nested-PCR em amostras diarreicas de pacientes HIV positivos, comprovando que o método biomolecular foi 17,88% mais eficiente no diagnóstico em termos de sensibilidade.

Diversas técnicas de biologia molecular são utilizadas no diagnóstico da criptosporidiose, dentre elas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Trata-se de uma técnica sensível que permite a identificação de espécies e subtipos de *Cryptosporidium* spp. sendo importante identificar as vias de transmissão e os genótipos de potencial zoonótico (XIAO, 2010).

O crescimento populacional descontrolado da *Z. auriculata*, na cidade de Londrina tem causado preocupações relacionadas à transmissão de doenças à saúde humana e animal (SHIBATTA et. al., 2009). A criptosporidiose é uma dessas doenças zoonóticas que possuem as aves como fonte de infecção. Desta forma, estudos relativos à ocorrência de *Cryptosporidium* em *Z. auriculata*, devem ser realizados para elucidar a importância dessa ave em saúde pública.

2 REFERENCIAL TEÓRICO – CRIPTOSPORIDIOSE NAS AVES

2.1 HISTÓRICO

O primeiro relato do *Cryptosporidium* foi feito no ano de 1907 por Ernest Edward Tyzzer, que descreveu um protozoário frequentemente encontrado nas glândulas gástricas de ratos de laboratório, classificando-o como *C. muris* (TYZZER, 1907). Ainda no século passado, o mesmo descreveu o ciclo de vida mais detalhado, do *C. muris*, e sugeriu que os esporozoítos eram maturados nas glândulas gástricas, gerando autoinfecção (TYZZER, 1910). No ano de 1912, Tyzzer encontrou estruturas semelhantes ao *C. muris* no intestino delgado de ratos de laboratório, porém eles eram menores, e observou ainda em infecção experimental na transmissão entre ratos o parasita sempre se localizava no intestino delgado, que foi então nomeado *C. parvum*.

O primeiro relato de *Cryptosporidium* em aves com descrição de todos os estágios de desenvolvimento, foi realizado por Tyzzer no ceco de frangos (TYZZER, 1929). Posteriormente, uma nova espécie de *Cryptosporidium*, foi observada em amostras de fezes diarreicas de perus, corados pelo método Mac. Neal, denominada *C. Meleagridis* (SLAVIM, 1955).

Cryptosporidium baileyi foi descrito a partir de isolados do parasita localizado na bursa de Fabricius de galinhas (CURRENT, 1986).

Pavlassek em 1999, descreveu *Cryptosporidium galli* no proventrículo de galinhas, sendo este re-descrito, por RYAN e colaboradores (2003), com o auxílio de técnicas moleculares e dados biológicos.

Os relatos de cryptosporidiose em humanos ocorreram no ano de 1976, em que uma criança imunocompetente apresentava quadros de diarreia aguda intermitente, e um adulto com diarreia persistente que estava sendo tratado com drogas imunossupressoras. Quadros de cryptosporidiose em humanos começaram a ter maior importância com a disseminação do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (FAYER,2010).

2.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Cryptosporidium spp. são protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Esporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina, Família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1984), contendo um único gênero, o *Cryptosporidium* (FAYER,1986). Entretanto, após a realização de análises filogenéticas alguns autores discordaram dessa classificação taxonômica, pois acreditam que este protozoário tenha mais afinidade com a Classe Gregarinas do que com os coccídeos. Atualmente, já foram descritas mais de 20 espécies diferentes de *Cryptosporidium*. O quadro 1 elucida as espécies atualmente descritas, e ainda fornece informações quanto aos hospedeiros suscetíveis (incluindo a possibilidade de transmissão zoonótica), e a localização do parasita dentro do hospedeiro (SLAPETA, 2013)

As principais diferenças observadas entre o *Cryptosporidium* e os demais coccídeos são: sua localização na célula hospedeira, que não é intracelular típica, porém, forma um vacúolo parasitóforo extracitoplasmático com comunicação intracelular, desta forma caracterizado como intracelular-extracitoplasmático; infecta uma gama extensa de hospedeiros; resistente a diversos agentes antimicrobianos e também pela ocorrência da auto-infecção, durante ciclo vital, uma vez que 20% dos oocistos formados apresentam parede fina que se rompem na luz intestinal e infectam células antes da excreção com as fezes (CARRENO, 1999; CLODE,2015).

Quadro 1 – Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas.

Espécie	Hospedeiro/ localização	Referência
<i>C. andersoni</i>	Bovinos (AB)	Lindsay et al., 2000
<i>C. bovis</i>	Bovinos (ID)	Fayer et al., 2005
<i>C. ryanae</i>	Bovinos (D*)	Fayer et al., 2008
<i>C. canis</i>	Caninos (ID)	Fayer et al., 2001
<i>C. felis</i>	Felinos (ID)	Iseki, 1987
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al., 2002
	Camundongos, Bovinos e	
<i>C. parvum</i>	Humanos (ID)	Tizzer, 1912
<i>C. viatorum</i>	Humanos (D*)	Elwin et al., 2012
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, Humanos (ID)	Fayer et al., 2010
<i>C. meleagridis</i>	Aves e Humanos (ID)	Slavim, 1955
<i>C. baileyi</i>	Aves (B, TR, C)	Current et al., 1986
<i>C. galli</i>	Aves (P)	Pavlašec, 1999; Ryan, 2003
<i>C. suis</i>	Suínos (ID, IG)	Ryan et al., 2004
<i>C. muris</i>	Roedores (E)	Tizzer, 1910
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al., 1971
<i>C. serpentis</i>	Lagartos e Serpentes (E)	Brownstein et al., 1977; Levine, 1980
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos (E, ID)	Koudela & Modry, 1998
		Alvarez - Pelletier et al., 2004 & Sitjà-Bobadilla, 2002
<i>C. molnari</i>	Peixes (E)	
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos (D*)	Fayer e Santin, 2009
<i>C. cuniculis</i>	Coelhos (D*)	Robson et al., 2010
	Canguru vermelho (<i>macropus rufus</i>)	
<i>C. fayeri</i>		Ryan et al., 2008

Localização do parasita no hospedeiro: A- Abomaso; B- bursa de Fabrícus; C-cloaca; D*-desconhecido; ID-intestino delgado; IG- intestino grosso; P- Proventrículo. (Adaptado de XIAO 2004; SMITH et al., 2007 ; RYAN et al., 2014).

2.3 CICLO BIOLÓGICO

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são patógenos que infectam e se desenvolvem nas microvilosidades das células epiteliais dos tratos gastrointestinal, respiratório e urinário, sendo que o sítio de predileção varia de acordo com a espécie do *Cryptosporidium* (GOODWIN, 1989; SMITH, 2007).

Os oocistos esporulados podem ser eliminados nas fezes ou diretamente do trato respiratório de um hospedeiro infectado, por meio da contaminação ambiental, pela água (de consumo ou recreação), alimentos e fômites. Os oocistos podem ser ingeridos ou inalados por hospedeiros susceptíveis, nos quais ocorre a excitação e liberação de quatro esporozoítos, e estes vão se aderir na superfície das células epiteliais dos tratos gastrointestinal e respiratório, onde serão englobados pelas microvilosidades formando um vacúolo parasitóforo (localização intracelular e extracitoplasmática). Ocorrendo assim a diferenciação dos

esporozoítos em trofozoítos, iniciando um processo de reprodução assexuada, a merogonia (GOODWIN,1989; SRETER, VARGA 1999; SMITH,2007).

Durante a merogonia é originado os merontes tipo I, com oito merozoítos em seu interior. Estes merozoítos são capazes de infectar novas células e originar os merontes tipo II, contendo quatro merozoítos em seu interior. Merozoítos de segunda ou terceira geração se diferenciam em estágios sexuais, microgametócitos e macrogametócitos (SMITH,2007).

Após a fecundação dos macrogametócitos pelos microgametócitos, ocorre o desenvolvimento dos oocistos, com quatro esporozoítos no seu interior, este vai se diferenciar em dois tipos de oocistos, sendo eles oocistos de parede fina (20%) e (80%) de parede espessa. Os oocistos de parede fina existem no trato gastrointestinal ou respiratório, onde pode se iniciar o ciclo de autoinfecção. Os oocistos de parede espessa são eliminados nas fezes na forma infectante, sendo estes altamente resistentes em condições ambientais (GOODWIN,1989; SRETER, VARGA 1999; SMITH,2007).

O ciclo de vida do *C. baileyi* possui um terceiro tipo de meronte, o meronte tipo III, e seus merozoítos vão penetrar enterócitos e se desenvolvem em estágios sexuais (FAYER, 1986; GOODWIN, 1989).

2.4 ESPÉCIE EM AVES

Atualmente as três espécies reconhecidas de *Cryptosporidium* que infectam as aves são: *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* (RYAN, 2010).

C. meleagridis, foi descrito por SLAVIN (1955), após ser encontrado diferentes estágios de desenvolvimento no intestino delgado de perus, e tem sido encontrado parasitando diversas aves e mamíferos (SRETER, VARGA 2000). Os oocistos são ovalados, medem aproximadamente 4,5x4,0 µm, não sendo possível sua diferenciação morfométrica com o *Cryptosporidium parvum* (XIAO et al,2004). Análises moleculares em isolados de perus e um papagaio, baseados nos genes SSU rRNA, HSP70, COWP, e actina, demonstraram a singularidade genética do *C. meleagridis* (XIAO et al,2004). Estudos utilizando a infecção experimental, tem demonstrado a capacidade dos oocistos *C. meleagridis* em infectar frangos, patos, perus, bezerros, suínos, coelhos e ratos (AKYOSHI et al.,2003; SILVERLAS et al.,2012).

O *C. meleagridis* é considerado o terceiro *Cryptosporidium* mais comum a causar infecção em seres humanos (XIAO et al,2004; XIAO et al.,2012; SILVERLAS et al.,

2012). Em alguns países como a Tailândia e Peru, ele é o responsável por 10% a 20 % das infecções de *Cryptosporidium* em humanos (WANG et al.,2014). Estudos realizados em uma propriedade rural na Suécia comprovaram a transmissão zoonótica de *C. meleagridis*, por meio da comparação de análises filogenéticas, a partir de três amostras de galinha e uma de ser humano, onde as quatro amostras analisadas foram idênticas (SILVERLAS et al., 2012). Em um estudo realizado por Akyoshi e colaboradores foi possível observar que a taxa de infectividade e a virulência do *C. meleagridis* de isolados de humanos, em mamíferos foi semelhante às taxas *C. parvum* sendo capaz de infectar camundongos, suínos e bovinos (AKYOSHI et al.,2003).

C.baileyi é a espécie de *Cryptosporidium* mais comum em aves, sendo descrita em uma gama de hospedeiros (RYAN et al.,2010). Os oocistos medem aproximadamente 6,2 x 4,6 µm, sendo eles maiores e mais alongados que o *C. meleagridis* (XIAO et al, 2004). Altas taxas de morbidade e mortalidade são frequentes em infecções respiratórias em frangos de corte, principalmente em animais jovens (RYAN et al., 2010).

C. galli foi descrito pela primeira vez por Pavlasek (1999), porém com o auxílio de dados moleculares e biológicos foi re-descrito posteriormente (Ryan et al., 2003). Os oocistos são maiores do que os de outras espécies medindo aproximadamente 8,25x 6,3 µm (XIAO et al,2004). Estes infectam o proventrículo de uma grande variedade de hospedeiros, entre eles galinha, calopsita e curió (RYAN et al., 2003). Esta espécie pode ter sido em descoberta em 1990, no proventrículo, de um “Finch firetail” (diamante australiano) que apresentava quadro de diarreia aguda, e foi denominado *Cryptosporidium blagburn* para espécies infectantes de pássaros. Porém análises moleculares recentes do SSU rRNA, HSP70 e actina loci revelou que *C. galli* e *C. blagburn* são a mesmas espécies (RYAN ET AL., 2010).

Além das três espécies reconhecidas de *Cryptosporidium* nas aves, *C. meleagridis*, *C. galli* e *C. baileyi*, novos genótipos foram encontrados em diversas espécies de aves, incluindo patos, gansos e avestruz (RYAN et al., 2003; NG et al., 2006; RYAN, 2010; FAYER 2010).

2.5 PATOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS EM AVES

A presença do *Cryptosporidium* no trato gastrointestinal pode causar diarreia, distensão abdominal e gases pelo acúmulo de conteúdo intestinal, letargia e diminuição do ganho de peso corporal. No entanto, na maioria dos indivíduos as infecções são assintomáticas (SMITH, 2007). Em casos clínicos, a patogênese da criptosporidiose é relacionada à invasão e a lise dos enterócitos, hipertrofia das células das criptas intestinais, com infiltração de células inflamatórias, atrofia das microvilosidades e das vilosidades (SRÉTER, VARGA, 1999). Em indivíduos imunodeficientes a infecção é frequentemente crônica e eventualmente pode ser letal (XIAO, 2004).

A infecção por *C. baileyi* pode resultar em hiperplasia ou hipertrofia de células epiteliais da Bursa de Fabricius, causando imunossupressão e um aumento da mortalidade em frangos (SRÉTER; Varga 2000; XIAO, 2004).

A doença respiratória pode ser causada pelo *C. meleagridis*, porém é frequentemente associada ao *C. baileyi*, e pode ser observada em duas formas: a mais frequente é a forma mais grave, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em aves. Os sinais clínicos consistem em sinusite, depressão, tosse, espirros, dispneia, acúmulo de muco nas cavidades ocular e nasal, traqueia pulmões e sacos aéreos. Nas aves afetadas severamente é possível observar a presença de exsudato mucocelular no lúmen dos órgãos do trato respiratório, hepatomegalia e esplenomegalia (SRÉTER, VARGA, 1999; XIAO, 2004). O *C. baileyi* no trato urinário pode levar quadro clínico inaparente, e durante a necropsia é possível observar hiperplasia das células do epitélio renal e nefrite purulenta (XIAO, 2004).

2.6 POTENCIAL ZOONÓTICO

Cinco espécies de *Cryptosporidium* são consideradas as principais responsáveis pelas infecções em seres humanos: *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. felis* (XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2015). *C. meleagridis* tem uma ampla gama de hospedeiros, é a terceira espécie mais prevalente em humanos, sendo o agente responsável por 10% a 20 % dos casos de criptosporidiose em humanos (SILVERLAS et al., 2012).

Cryptosporidium é de ocorrência mundial, sendo considerado como uma das principais causas de diarreia em crianças e em indivíduos infectados com o vírus do HIV (MBAE et.al, 2015). Em crianças, a diarreia é aguda, e em indivíduos imunossuprimidos pelo

vírus HIV ou em indivíduos severamente desnutridos ela é crônica (CARVALHO-COSTA et al., 2007).

Um estudo em uma propriedade rural na Suécia comprovou através da análise da sequência do gene SSU e HSP70 a transmissão zoonótica do *C. meleagridis* de galinhas a um ser humano (SILVERLÅS et al 2012).

Diversos surtos têm sido relatados em seres humanos, tendo como principal fonte de infecção, a água (XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2015). Isto pode ser explicado pela resistência dos oocistos nas etapas de tratamento, pequeno tamanho do oocisto, elevado número de oocistos excretados por hospedeiros infectados, baixa dose necessária para a infecção, a redução ou ausência de especificidade de hospedeiro. Águas residuais e de escoamento de indústrias que manipulam produtos de origem animal, propriedades agropecuárias, assim como animais domésticos e selvagens, pássaros ou mamíferos, podem contaminar a água de consumo humano e serem consideradas fontes de infecção do parasita ao homem (O'DONOGHUE, 1995; CURRENT; GARCIA, 1991; KARANIS et al., 2007).

2.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nenhum estudo relativo a ocorrência de *Cryptosporidium* em *Z. auriculata* foi realizado até o presente momento. A criptosporidiose é uma doença zoonótica, que possui as aves como fonte de infecção. Com o advento das técnicas de biologia molecular, inúmeras possibilidades de análises tornaram-se possíveis, o que era impossível por meio de análises morfo-métricas de oocistos. Através da análise de sequências de nucleotídeos é possível determinar a espécie do parasito encontrado e inferir se ele poderá ou não causar a infecção numa determinada espécie.

REFERÊNCIAS

- AKIYOSHI, D.E.; DILO, J.; PEARSON, C.; CHAPMAN, S.; TURNWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different hosts. *Infection and Immunity*.v.71, p. 1828-1832, 2003.
- CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v.85, p.899–904, 1999.
- CARVALHO-COSTA, F.A.; GONÇALVES, A.Q.; LASSANCE, S.L.; ALBUQUERQUE, J.P.G.L.; BÓIA, M.N. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v40(3), p.346-348, 2007.
- CURRENT, W.L.; UPTON, S.J.; HAYNES, T.B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**, v.33, p.289-296, 1986.
- CURRENT, W.L.; GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, p.325-358, 1991.
- FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v.124, p.90–97, 2010.
- FAYER, R.; UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiology Review**, v.50, p. 458-483, 1986.
- GOODWIN, M.A. *Cryptosporidium* in birds: a review. **Avian Pathology**, v.18, p.365-384, 1989.
- KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, p. 1–38, 2007.
- LI N, XIAO L, WANG L, ZHAO S, ZHAO X, et al. (2012). Molecular Surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* by Genotyping and Subtyping Parasites in Wastewater. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 6(9): e1809. doi:10.1371/journal.pntd.0001809

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. Cryptosporidiosis in birds. In: Dubey, J.P., Speer, C.A., FAYER, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis in Man and Animals*. **CRC Press, Inc., Boca Raton**, p. 133–148, 1990.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v.3, p.233-244, 2003.

MURTON, R.K.; BUCHER, E.H.; NORES, M.; GOMEZ, E.; REARTES, J. The ecology of the Eared Dove (*Zenaida auriculata*) in Argentina. **Condor**. v.76, p.80-88, 1974.

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

O'DONOGHUE, P. J. Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium* **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1379–1413, 1999.

Pavlassek, I. 1999. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environments. *Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek.* 3:290-301.

QUAH, J.X.; AMBU, S.; LIM, Y.A.L.; MAHDY, M.A.K.; MAK, J.W. *Cryptosporidium parvum* from avian hosts. **Parasitology**, v.138, n.5, p.573-577, 2011.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v124, p. 113-120, 2010.

RYAN, U., HIJAWI, N., New developments in *Cryptosporidium* research, **International Journal for Parasitology**, v45, p 367-373, 2015.

RYAN, U.M.; XIAO, L. Avian cryptosporidiosis. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. **CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton**, p.395–418, 2008.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I.M.; MONIS, P.; LAL, A.A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A Redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlassek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **The Journal of Parasitology**, v.89, n.4, p.809-813, 2003.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 249-53, 2010.

SHIBATTA, O. A.; GALVES, W.; CARMO, W. P. D. do; LIMA, I. P. de; LOPES, E. V., MACHADO, R. A. A fauna de vertebrados do *campus* da Universidade Estadual de Londrina, região norte do estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.30, n.1, p.3-26, 2009.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVERLÅS, C., MATTSSON, J. G., INSULANDER, M. AND LEBBAD, M. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. **International Journal for Parasitology** v. 42, p. 963–967, 2012

SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? **International Journal of Parasitology**, v. 43, p. 957–970, 2013.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis*. **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 zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 29 – 40, 2007.

SOUZA, E.A.; TELINO-JÚNIOR, W.R; NASCIMENTO, J.L.X.; LYRA-NEVES, R.M.; JÚNIOR, S.M.A.; FILHO, C.L.; NETO, A.S. Estimativas populacionais de avoantes *Zenaida auriculata* (Aves Columbidae, DesMurus, 1847) em colônias reprodutivas no Nordeste do Brasil. **Ornithologia**. v.2, p.28-33, 2007.

SRÉTER, T.; VARGA, I. *Cryptosporidiosis in birds* - A review. **Veterinary Parasitology**, v.87, p.261-279, 1999.

TAMURA, K. et al. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution:30 2725-2729.**, 2013.

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 spp nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medicine Research**, v.23, p.487-509, 1910.

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

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

UPPAL, B. et al. A comparison of nested PCR assay with conventional techniques for diagnosis of intestinal cryptosporidiosis in AIDS cases from northern India. **Journal of parasitology research**, v. 2014, p. 706105, jan. 2014.

WANG, L.; XUE, X.; LI, J.; ZHOU, Q.; YU, Y.; DU, A. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. **Parasite Journal**, 2014a. DOI: 10.1051/parasite/2014035

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

WIKIAVES. **Mapa de registro da espécie pomba-de-bando (*Zenaida auriculata*)**. 2011. Disponível em: < http://wikiaves.com.br/mapaRegistros_pomba-de-bando&b=1>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, v124, p 80-89, 2010.

XIAO, L.; RYAN, U. M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current opinion in infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 483–90, out. 2004.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência e caracterizar geneticamente o *Cryptosporidium* spp. em pombos da espécie *Z. auriculata*, capturados na cidade de Londrina, Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar as espécies de *Cryptosporidium* a partir do sequenciamento genético das amostras positivas.

Determinar a filogenia com as sequências obtidas e comparar com outros isolados caracterizados no GenBank.

4 ARTIGO – OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP EM POMBOS (*ZENAIDA AURICULATA*) DO MUNICÍPIO DE LONDRINA, PARANÁ.

4.1 RESUMO

Cryptosporidium é um protozoário que parasita diversas espécies incluindo o homem. Existem várias espécies de *Cryptosporidium*, porém, nas aves às espécies mais comuns são *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium galli*. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp em pombos da espécie *Zenaida auriculata* naturalmente infectados, capturados no município de Londrina, Paraná. Para isso, foram capturados 198 pombos de ambos os sexos da espécie *Z. auriculata* em armadilhas, na zona urbana, e zona rural de Londrina. Para detecção de *Cryptosporidium* spp. nas fezes a Nested – PCR foi realizada. Dos 198 animais estudados, 30 animais apresentavam-se positivos (15,1%) e outros 168 negativos (84,9%) na n-PCR. Destas amostras positivas 15 foram sequenciadas e suas espécies determinadas. A maioria das amostras foi positiva para *C. meleagridis* (13/15 ou 86,7%) e 2/15 (13,3%) *C. galli*. A presença de amostras positivas para *C. meleagridis* e *C. galli* ressalta a importância deste trabalho, pois até o momento este é o primeiro a descrever a presença de *Cryptosporidium* nas fezes da espécie *Z. auriculata*. Podemos observar também a relevância para saúde pública devido ao potencial zoonótico do *C. meleagridis* e o caráter sinantrópico de *Z. auriculata*.

Palavras-chave: Pombos, Epidemiologia, *Criptosporidiose*, Apicomplexa

ARTICLE – OCCURRENCE AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP IN DOVES (*ZENAIDA AURICULATA*) FROM LONDRINA CITY, PARANA STATE.

4.2 ABSTRACT

Cryptosporidium is a protozoan parasite with wide range hosts, including man. There are several species of *Cryptosporidium*, however the only species in birds are *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium galli*. The aim of the present study was to verify the occurrence of *Cryptosporidium* spp in dove species (*Zenaida auriculata*), naturally infected, trap captured in Londrina, Parana State. For this, 196 animals of both sexes were obtained. For the detection of *Cryptosporidium* spp. in feces, a Nested - PCR was performed. Thirty animals (15.3%) were considered positive in n-PCR. From positive, the samples 15 were successfully sequenced and their species were determined. Most samples were positive for *C. meleagridis* 13/15 (86.7%) and 2/15 (13.3%) *C. galli*. The presence of positive samples for *C. meleagridis* and *C. galli* emphasize the importance of this work, because so far this is the first study to describe the presence of *Cryptosporidium* in feces of *Z. auriculata*. We also note the importance to public health due to the zoonotic potential of *C. meleagridis* and synanthropic character of *Z. auriculata*.

Keywords: Pigeons, Nested-PCR, Cryptosporidiosis, Eared dove

4.3 INTRODUÇÃO

Cryptosporidium é um protozoário que parasita mamíferos, incluindo o homem, répteis, aves, roedores e peixes (MONIS, THOMPSON, 2003). É transmitido por via fecal – oral, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos, causando uma infecção gastrointestinal (MONIS, THOMPSON, 2003).

Este protozoário tem distribuição mundial e já foi descrito em 95 países (FAYER et al.,1998). A primeira descrição de *Cryptosporidium* em aves foi realizada por Tizzer em 1929, no epitélio de galinhas jovens (SRETER ,1999). Nas aves domésticas e selvagens a criptosporidiose está entre as principais causas de infecção parasitária, sendo relatada em mais de 30 espécies de aves em todo o mundo (O` DONOGHUE, 1999; FAYER, 2010; RYAN, 2010). A criptosporidiose nas aves pode se manifestar com sinais clínicos entéricos, respiratórios ou renais (RYAN, 2010), sendo que em caso de surto o mais comum é que apenas uma forma da doença se manifeste (LINDSAY E BLAGBURN,1990). As três espécies reconhecidas de *Cryptosporidium* que possuem as aves como hospedeiro definitivo são: *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* (RYAN,2010).

O *Cryptosporidium* é considerado uma das principais causas de diarreia em crianças e em indivíduos infectados com o vírus do HIV (MBAE et.al, 2015). Cinco espécies de *Cryptosporidium* são consideradas as principais responsáveis pelas infecções em seres humanos: *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. felis* (XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2015). *C. meleagridis*, é a única espécie de *Cryptosporidium* conhecido por infectar aves e mamíferos e é responsável por aproximadamente 10% da criptosporidiose humana em algumas áreas do Peru e Tailândia (WANG et al., 2014b).

O pombo *Zenaida auriculata*, popularmente conhecido como amargosinha ou pomba-de-bando, comum em centros urbanos e nas áreas rurais, poderia atuar como hospedeiro de *Cryptosporidium* ou como transportador mecânico de oocistos (Nakamura et al, 2009; QUAH et al, 2011). Em Londrina o crescimento populacional descontrolado desta ave tem causado preocupações relacionadas à transmissão de doenças à saúde humana e animal (SHIBATTA et. al., 2009).

Diversas técnicas de biologia molecular são utilizadas no diagnóstico da criptosporidiose, dentre elas a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Trata-se de uma técnica específica que permite a identificação de espécies e subtipos de *Cryptosporidium* spp. sendo importante identificar as vias de transmissão e os genótipos de potencial zoonótico (XIAO, 2010).

O objetivo deste estudo foi caracterizar molecularmente a infecção por *Cryptosporidium* spp. em pombos da espécie *Z. auriculata*, capturados na cidade de Londrina, Paraná.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Local e população de estudo

O município de Londrina localiza-se no norte do Estado do Paraná, a 369 km da capital Curitiba, situado entre 23°08'47" e 23°55'46" Sul e entre 50°52'23" e 51°19'11" Oeste (IBGE, 2010).

Um total de 196 pombos de ambos os sexos da espécie *Zenaida auriculata* em armadilhas tipo arapuca (com iscas), sendo que todos os animais capturados foram utilizados, no período de setembro de 2010 a junho de 2014. As aves foram capturadas em quatro regiões da cidade: 137 aves em uma indústria receptora de grãos, 35 campus da Universidade Estadual de Londrina, 15 em uma fazenda de gado leiteiro na região peri-urbana e 9 em uma cooperativa receptora de grãos. O presente estudo encontra-se aprovado no IBAMA SISBIO N. 16428-1 e no CEEA (UEL) N. 70//2008.

4.4.2 Coleta de amostras

Os animais capturados foram eutanasiados em câmara de CO₂. O trato gastrointestinal foi retirado, aberto e o conteúdo intestinal foi coletado, armazenado em microtubos e mantidos em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

4.4.3 Extração de DNA

Para a realização da extração de DNA, as fezes foram submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento, as amostras foram congeladas a -80°C e aquecidas 30°C em banho seco, e em seguida, para cada 50µl de fezes da amostra foi adicionado 1mL Tris – EDTA (TE). Este conteúdo foi centrifugado (4000xg durante 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado na centrifugação foi submetido a extração com Kit comercial Nucleospin Tissue® Macherey - Nagel.

4.4.4 Protocolo de Reação Em Cadeia Da Polimerase (PCR)

Os produtos da extração foram submetidos à técnica de Nested – PCR do gene 18S rRNA em triplicata, utilizando-se de primers específicos para gênero *Cryptosporidium*, segundo XIAO et al. (1999). Na primeira reação, os seguintes *primers* foram utilizados: Fw1: TTCTAGAGCTAATACATGCG e Rv2: CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA. Na segunda reação, os *primers* continham as seguintes sequências: Fw3: GGAAGGGTTGTATTTATTAGAT e Rv4: AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA. Após a amplificação da segunda reação para obtenção de um fragmento de 825pb do DNA do *Cryptosporidium* spp.

As reações foram realizadas em um volume de 25 µl contendo: 1 x PCR buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de DNTP, 0,2 µM de cada primer, 2 U de Platinum Taq (Invitrogen®), 2,5 µl de DNA e H₂O mili-Q estéril.

Na primeira e segunda reação, os mesmos ciclos de tempo e temperatura foram utilizados: Incubação inicial 95°C por 5 minutos, desnaturação 94°C por 45 segundos, anelamento 55°C por 45 segundos, síntese 72°C por 1 minuto e extensão final 72°C por 5 minutos. A desnaturação, anelamento e síntese repetem - se 34 vezes antes do passo de extensão final.

A visualização do resultado da PCR foi feita em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR® Safe (DNA Gel Stain; Invitrogen, Brasil), e visualizado por luz ultravioleta e fotodocumentados usando o programa LPix Imagem ST (Loccus Biotecnologia).

4.4.5 Sequenciamento Genético e Árvore filogenética

Os Amplicons sintetizados durante a Nested-PCR foram submetidos à purificação por meio do kit comercial QIAquick gel extraction kit (Invitrogen). Após a purificação, foram submetidos ao sequenciamento genético utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), através do ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os dados obtidos após o sequenciamento permitiram comparações entre amplicons complementares de uma mesma amostra, o que permitiu a construção de sequencias consensus que foram comparadas com sequencias depositadas no GenBank por meio do programa Blastn, para determinação de espécies.

O alinhamento das sequências foi realizado no software Bioedit Sequence Alignment Editor 7.2.5, incluindo amostras de referência para os parasitos *C. meleagridis* (AF180339.1), *C. galli* (GU734647.1), *C. baileyi* (AJ276096.2) e *Eimeria tenella* (DQ640011.1).

Por meio dos consensus, com a utilização do software MEGA6 (TAMURA et al., 2013), foi construída a árvore filogenética comparando os isolados obtidos e outros isolados cujas sequências estão depositadas no GenBank. Os parâmetros utilizados para a construção da árvore filogenética foi Kimura 2- parâmetros da distância (KIMURA, 1980). As análises estatísticas de árvores filogenéticas foram determinadas pelo método *bootstrap* em 1000 repetições.

4.4.6 Análise Estatística

Os resultados foram comparados de acordo com as variáveis sexo e local de captura utilizando o teste de qui-quadrado com intervalo de confiança de 95%, utilizando o Programa OpenEpi 3.03a. Um $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

4.5 RESULTADOS

Dos 196 animais analisados, 30 (15,3%) foram positivos na n-PCR. Todas as amostras positivas na PCR, 30/198 (15,1%), foram enviadas para o sequenciamento, porém quinze delas não foram sequenciadas devido à baixa qualidade do DNA. As outras quinze foram sequenciadas e suas espécies determinadas. Treze amostras (87%) foram positivas para *C. meleagridis* e duas (13%) para *C. galli*.

As análises filogenéticas (Figura 3) das sequências *consensus* obtidas neste estudo concordaram com resultados obtidos nas comparações com a ferramenta Blastn. Foram encontrados dois grupamentos de espécies que podem ser observados na tabela 1, sendo que 13 amostras se agruparam com a sequência padrão *C. meleagridis* (AF180339.1), com similaridade genética de 99% a 100%, 2 amostras se agruparam com *C. galli* (GU734647.1), com 99% de similaridade e nenhuma com *C. baileyi* (AJ276096.2).

Figura 3 – Árvore filogenética de sequências do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* de aves da espécie *Zenaida Auriculata* deste estudo e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank.

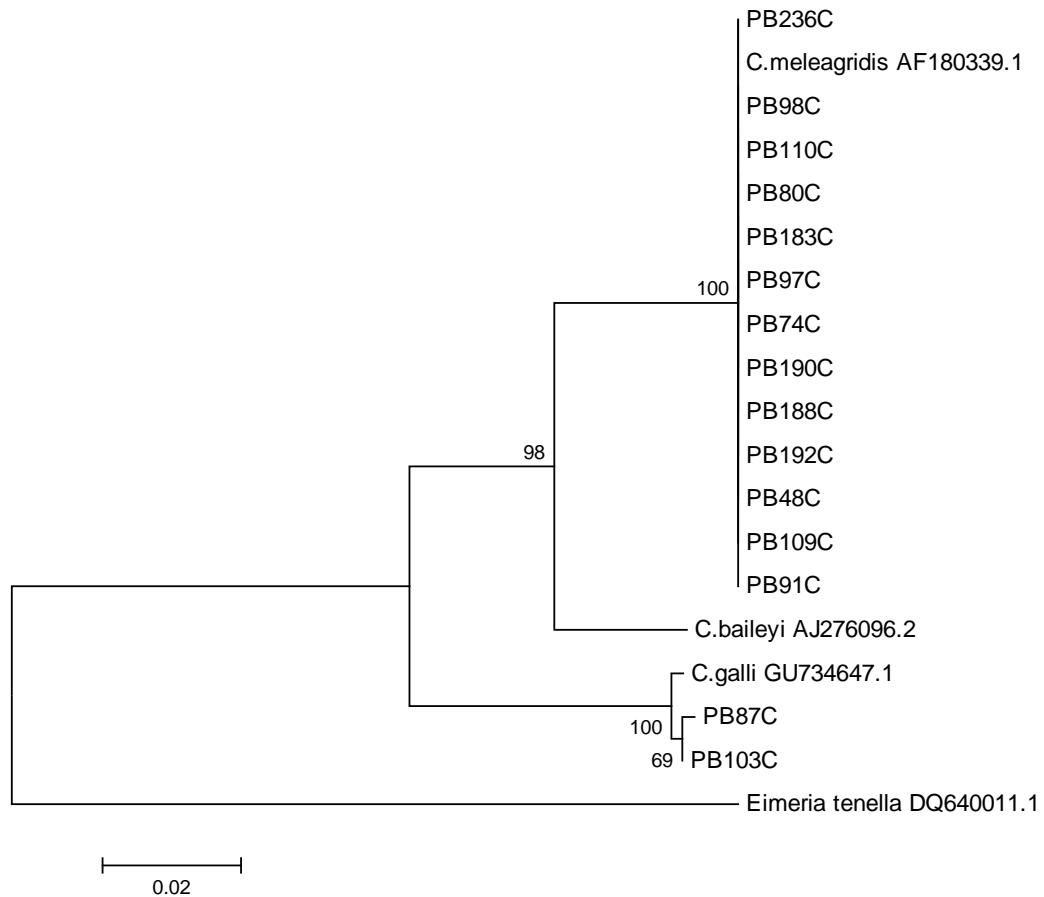


Tabela 1 – Avaliação do grau de similaridade das amostras obtidas neste estudo comparadas com sequencias previamente depositadas no GenBank.

Animal	Descrição	Query cover	Identidade	Número de acesso*
Pombo 48	<i>C. meleagridis</i>	100%	100%	KT151551.1
Pombo 74	<i>C. meleagridis</i>	100%	100%	KT151551.1
Pombo 80	<i>C. meleagridis</i>	100%	100%	KT151551.1
Pombo 87	<i>C. galli</i>	100%	99%	KT151553.1
Pombo 91	<i>C. meleagridis</i>	100%	100%	KT151551.1
Pombo 97	<i>C. meleagridis</i>	100%	99%	KT151551.1
Pombo 98	<i>C. meleagridis</i>	100%	99%	KT151551.1
Pombo 103	<i>C. galli</i>	100%	99%	KT151553.1
Pombo 109	<i>C. meleagridis</i>	100%	100%	KT151551.1
Pombo 110	<i>C. meleagridis</i>	100%	100%	KT151551.1
Pombo 183	<i>C. meleagridis</i>	100%	100%	KT151551.1
Pombo 188	<i>C. meleagridis</i>	100%	100%	KT151551.1
Pombo 190	<i>C. meleagridis</i>	100%	99%	KT151551.1
Pombo 192	<i>C. meleagridis</i>	100%	100%	KT151551.1
Pombo 236	<i>C. meleagridis</i>	100%	99%	KT151551.1

*Número de acesso das sequencias no GenBank.

Os resultados da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. associada com os locais de captura das aves, estão apresentados na tabela 2. Observou-se uma positividade de 69,9% na cooperativa 1, 17,86% no Campus da Universidade Estadual de Londrina, 7,65 % em uma pequena propriedade de leite, e na Cooperativa 2 não foram verificados animais positivos (0%). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao local de captura dos animais e positividade para *Cryptosporidium* spp.

Tabela 2 – Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em pombos (*Zenaida auriculata*) segundo os locais de captura, Londrina/PR, de setembro de 2010 até junho de 2014.

	N	POS	%	NEG	%	X ²	p
Coop.1	137	26	69,90	111	56,63265	5,581	0.1339
UEL	35	2	17,86	33	16,83673		
Leite	15	2	7,65	13	6,632653		
Coop.2	9	0	0,00	9	4,591837		
Total	196	30		166			

N – Número de animais; POS- Positivos; NEG- Negativos; X² – Análise de qui-quadrado

Foi observado que há um número maior de fêmeas da espécie *Zenaida auriculata* em relação a presença de machos desta mesma espécie nos locais de captura, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), estes resultados são demonstrados na tabela 3.

Tabela 3 – Presença de machos e fêmeas de pombos (*Zenaida auriculata*) em diferentes locais de captura, em Londrina/PR, de setembro de 2010 até junho de 2014.

	M	%local	%total	F	%local	%total	Total	X ²	p
Coop.1	70	51,09	35,71	67	48,91	34,18	137	4,354	0.2257
UEL	11	31,43	5,61	24	68,57	12,24	35		
Leite	7	46,67	3,57	8	53,33	4,08	15		
Coop.2	4	44,44	2,04	5	55,56	2,55	9		
Total	92		46,94	104		53,06	196		

N – Número de animais; M- Machos; F- Fêmeas; % local- local de captura; X² – Análise de qui-quadrado

Dos 196 animais analisados, 30 (15,3%) foram positivos na n-PCR. Destes animais, 10 são machos e 20 fêmeas, a positividade de *Cryptosporidium* separadas por locais de captura estão detalhados na tabela 4. Foi encontrado um maior número de machos e fêmeas positivas na Cooperativa, pois este foi o local onde houve o maior número capturas (137 pombos), isso provavelmente está associado ao fato desta cooperativa atuar como beneficiadora de grãos disponibilizando grande oferta de alimentos para os animais.

Tabela 4 - Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em pombos (*Zenaida auriculata*) segundo o sexo e os diferentes locais de captura, em Londrina/PR, de setembro de 2010 até junho de 2014.

	N	POS M	% local	% total	POS F	% local	% total	NEG M	% local	% total	NEG F	% local	% total	X ²	p
UEL	35	0	0,00	0,00	2	5,71	1,02	15	42,86	21,87	27	77,14	13,78	-	-
Coop.1	137	9	6,57	3,35	17	12,41	8,67	61	44,53	22,72	50	36,50	25,51		
Leite	15	1	6,67	3,40	1	6,67	0,51	6	40,00	20,41	7	46,67	3,57		
Coop.2	9	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	4	44,44	22,68	5	55,56	2,55		
Total	196	10		5,10	20		10,20	82		41,84	89		45,41		

N – Número de animais; POS- Positivos; NEG- Negativos; M- Machos; F- Fêmeas; % local- local de captura; X² - Análise de qui-quadrado

4.6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a ocorrência de *Cryptosporidium* nas fezes de pombos *Z. auriculata*, pois os demais estudos encontrados na literatura, apresentam resultados para *Cryptosporidium*, porém pesquisados em outras espécies de aves.

Estudo realizado com aves domésticas comerciais e silvestres de vida livre e cativo, por meio da técnica n-PCR, após o isolamento e caracterização genética observou nove amostras positivas para *C. galli*, uma Genótipo I, doze para Genótipo II e cinco para genótipo III, com prevalência de 6,3% (27/430) de *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais (NG et al., 2006). O presente estudo obteve resultado semelhante ao sequenciar *C. galli* nas fezes de *Zenaida auriculata*, essa similaridade pode ser justificada pelo fato desta espécie de *Cryptosporidium* ser comum em aves.

Nakamura et al., (2009) em levantamento epidemiológico da criptosporidiose em aves (galinha doméstica e diferentes espécies de aves silvestres) mantidas em cativeiro no Brasil de várias regiões geográficas, por meio da técnica de PCR, encontraram prevalência de 4,86% (47/966). Ao realizarem um segundo levantamento epidemiológico da criptosporidiose somente em aves silvestres, utilizando a mesma técnica de diagnóstico, observaram prevalência de 10,13% (104/1027) (Nakamura et al., 2014). Os resultados obtidos por este autor em ambos os estudos supracitados diferem dos encontrados no presente trabalho provavelmente por diferenças de hábitos comportamentais e alimentares entre Passeriformes, Psitaciformes e Galiformes e Columbiformes estudados em nosso trabalho.

Em trabalho semelhante com aves silvestres mantidas em cativeiro Sevá et al. (2010), por meio de exames coproparasitológicos, observaram a prevalência de 8,64% (41/474) de *Cryptosporidium* spp. As amostras positivas nos coproparasitológicos foram submetidas à técnica de PCR, sendo 40 amostras positivas. Destas 30 amostras foram sequenciadas, sendo 96,66 (29/30) positiva *C. galli* e 3,34% (1/30) *C. baileyi*.

Wang et al., (2010) ao utilizar amostras de frangos de corte, galinha poedeira e patos em Pequim, China, avaliaram 2579 amostras de fezes, sendo 8 granjas de patos e 46 de galinhas poedeiras e frangos de corte. Após a análise genética foi observado uma positividade de *C. baileyi* em 15 propriedades de frangos e em 4 propriedades de patos, e uma positividade de *C. meleagridis* em 3 propriedades de frangos .

Quah et al. (2011) registraram prevalência de 10% (9/90) para *Cryptosporidium* spp. em amostras fezes de 37 espécies de aves no Zoológico Nacional de Kuala Lumpur na Malásia.

Na Argélia, Baroudi et al. (2013) por meio técnico de n-PCR encontraram uma prevalência de 34% (26/90) de *Cryptosporidium* em amostras de fezes diarreicas de frangos de corte e 44% (25/57) em perus. Após a caracterização genotípica observou-se 51 amostras positivas de perus e galinhas para *C. meleagridis*, 5 amostras de *C. baileyi* e uma amostras de frango de corte apresentou coinfeção dessas espécies.

Wang et al. (2014a) em estudo realizado em sete regiões de uma província na China, analisando 385 amostras de fezes de frango de corte coletadas diretamente das bandejas das gaiolas, observaram positividade de 9,9 % (38/385) por meio da técnica de n-PCR, com taxa de infecção das diferentes regiões variando de 2,3 % a 16,9%. Após análise genética foi observado positividade de 86,8 % (33/38) de *C. baileyi* em todas as regiões, 5,3% (2/38) de *C. meleagridis* e 7,9% (3/38) Genótipo II aviário.

Li et al. (2015), avaliaram a prevalência de *Cryptosporidium* em pombos doméstico, foram analisadas 244 amostras de quatro propriedades distintas de quatro regiões de uma província no Sul da China. Por se tratar de propriedades comerciais os animais eram mantidos em gaiolas em grupos de três animais. A prevalência global de infecção por *Cryptosporidium* spp. em pombos por meio da técnica de n-PCR foi 0,82 % (2/244). Semelhante ao nosso estudo após análises genéticas foram encontradas duas espécies sendo *C. baileyi* e *C. meleagridis*. A diferença da prevalência observada provavelmente se deve ao fato dos animais analisados no presente estudo serem animais de vida livre, apresentando hábitos alimentares distintos dos mantidos em cativeiro.

O presente trabalho observou *C. meleagridis* em 13 amostras do sequenciamento. Esta espécie de *Cryptosporidium* é considerada uma das principais responsáveis pelas infecções em seres humanos assim como *C. parvum*, *C. hominis* *C. canis* e *C. felis* (XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2015). *C. meleagridis* tem uma ampla gama de hospedeiros, é a terceira espécie mais prevalente em humanos, sendo o agente responsável por 10% a 20 % dos casos de criptosporidiose em humanos (SILVERLAS et al., 2012; WANG et al., 2014b).

Estudos realizados em uma propriedade rural na Suécia comprovou a transmissão zoonótica de *C. meleagridis*, por meio da comparação de análises filogenéticas, a partir de três amostras de galinha e uma de ser humano, onde as quatro amostras analisadas

foram idênticas (SILVERLAS et al., 2012). Desta forma as fezes de *Zenaida auriculata* pode representar um potencial zoonótico dentro da cadeia de transmissão da criptosporidiose humana.

4.7 CONCLUSÃO

A presença de amostras positivas para *Cryptosporidium spp.* identificadas como *C. meleagridis* e *C. galli* em nosso trabalho, ressalta a importância do mesmo, pois até o momento este é o primeiro a relatar a presença de *Cryptosporidium spp.* nas fezes da espécie *Z. auriculata* através da técnica de PCR.

Podemos observar a relevância para saúde pública devido ao potencial zoonótico do *C. meleagridis* e o caráter sinantrópico de *Z. auriculata*. Esta espécie de ave serve como importante indicador biológico, ressaltando a importância dos estudos de monitoramento e ocorrência de diferentes parasitas com potencial zoonótico nesta espécie.

REFERÊNCIAS

- AKIYOSHI, D.E.; DILO, J.; PEARSON, C.; CHAPMAN, S.; TURNWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different hosts. **Infection and Immunity**.v.71, p. 1828-1832, 2003.
- BAROUDI D, KHELEF D, GOUCEM R, ADJOU KT, ADAMU H, ZHANG H, XIAO L. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. **Veterinary Parasitology**, 196(3–4), 334–340, 2013.
- CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v.85, p.899–904, 1999.
- CARVALHO-COSTA, F.A.; GONÇALVES, A.Q.; LASSANCE, S.L.; ALBUQUERQUE, J.P.G.L.; BÓIA, M.N. Detection of *Cryptosporidium* spp. and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v40(3), p.346-348, 2007.
- CURRENT, W.L.; UPTON, S.J.; HAYNES, T.B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**, v.33, p.289-296, 1986.
- CLODE, P.L.; KOH, W.H.; THOMPSON, R.C.A. Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*? **Trends Parasitology**, p.1-11, 2015.
- CURRENT, W.L.; GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, p.325-358, 1991.
- FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v.124, p.90–97, 2010.
- FAYER, R.; UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiology Review**, v.50, p. 458-483, 1986.
- GOODWIN, M.A. *Cryptosporidium* in birds: a review. **Avian Pathology**, v.18, p.365-384, 1989.

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

LI N, XIAO L, WANG L, ZHAO S, ZHAO X, et al. (2012). Molecular Surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* by Genotyping and Subtyping Parasites in Wastewater. **PLoS Negl Trop Dis** 6(9): e1809. doi:10.1371/journal.pntd.0001809

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. Cryptosporidiosis in birds. In: Dubey, J.P., Speer, C.A., FAYER, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis in Man and Animals*. **CRC Press, Inc., Boca Raton**, p. 133–148, 1990.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v.3, p.233-244, 2003.

MURTON, R.K.; BUCHER, E.H.; NORES, M.; GOMEZ, E.; REARTES, J. The ecology of the Eared Dove (*Zenaida auriculata*) in Argentina. **Condor**. v.76, p.80-88, 1974.

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

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

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

O'DONOGHUE, P. J. Isolation, propagation and characterization of *Cryptosporidium* **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1379–1413, 1999.

Pavlassek, I. 1999. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environments. **Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek.** 3:290-301.

QUAH, J.X.; AMBU, S.; LIM, Y.A.L.; MAHDY, M.A.K.; MAK, J.W. *Cryptosporidium parvum* from avian hosts. **Parasitology**, v.138, n.5, p.573-577, 2011.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v124, p. 113-120, 2010.

RYAN, U., HIJJAWI, N., New developments in *Cryptosporidium* research, **International Journal for Parasitology**, v45, p 367-373,2015.

RYAN, U.M.; XIAO, L. Avian cryptosporidiosis. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. **CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton**, p.395–418, 2008.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I.M.; MONIS, P.; LAL, A.A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A Redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **The Journal of Parasitology**, v.89, n.4, p.809-813, 2003.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 249-53, 2010.

SHIBATTA, O. A.; GALVES, W.; CARMO, W. P. D. do; LIMA, I. P. de; LOPES, E. V., MACHADO, R. A. A fauna de vertebrados do *campus* da Universidade Estadual de Londrina, região norte do estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.30, n.1, p.3-26, 2009.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVERLÅS, C., MATTSSON, J. G., INSULANDER, M. AND LEBBAD, M. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. **International Journal for Parasitology** v. 42, p. 963–967, 2012

SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? **International Journal of Parasitology**, v. 43, p. 957–970, 2013.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis*. **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 zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 29 – 40, 2007.

SOUZA, E.A.; TELINO-JÚNIOR, W.R; NASCIMENTO, J.L.X.; LYRA-NEVES, R.M.; JÚNIOR, S.M.A.; FILHO, C.L.; NETO, A.S. Estimativas populacionais de avoantes *Zenaida auriculata* (Aves Columbidae, DesMurus, 1847) em colônias reprodutivas no Nordeste do Brasil. **Ornithologia**. v.2, p.28-33, 2007.

SRÉTER, T.; VARGA, I. *Cryptosporidiosis in birds - A review*. **Veterinary Parasitology**, v.87, p.261-279, 1999.

TAMURA, K. et al. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution:30 2725-2729.**, 2013.

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 spp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medicine Research**, v.23, p.487-509, 1910.

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

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

UPPAL, B. et al. A comparison of nested PCR assay with conventional techniques for diagnosis of intestinal cryptosporidiosis in AIDS cases from northern India. **Journal of parasitology research**, v. 2014, p. 706105, jan. 2014.

WANG, R., JIAN, F., SUN, Y., HU, Q., ZHU, J., WANG, F., NING, C., ZHANG, L., XIAO, L. Large-scale survey of *Cryptosporidium* spp. in chickens and Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Henan, China: prevalence and molecular characterization. **Avian Pathol.** 39, 447–451, 2010.

WANG, L.; XUE, X.; LI, J.; ZHOU, Q.; YU, Y.; DU, A. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. **Parasite Journal**, 2014a. DOI: 10.1051/parasite/2014035

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

WIKIAVES. **Mapa de registro da espécie pomba-de-bando (*Zenaida auriculata*)**. 2011. Disponível em: < http://wikiaves.com.br/mapaRegistros_pomba-de-bando&b=1>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, v124, p 80-89, 2010.

XIAO, L.; RYAN, U. M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current opinion in infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 483–90, out. 2004.

APÊNDICE A

Aceite do Comitê de Ética em Experimentação Animal

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 70/2008

Londrina, 10 de setembro de 2008.

Prezado Pesquisador

O CEEA/UEL, reunido aos 09 de setembro do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização genética de isolados de *Toxoplasma gondii* de pombas (*Zenaida auriculata*) do município de Londrina, Paraná**", registrado no CEEA sob o nº 35/08, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

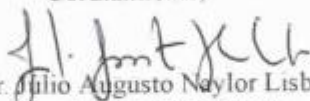
Serão utilizados 384 pombos capturados em praças públicas do município de Londrina e 768 camundongos adultos procedentes do Biotério central da UEL.

Tendo em vista o grande número de pombos capturados e o ineditismo e a complexidade desse procedimento, o CEEA/UEL sugere que outras investigações relevantes sejam realizadas aproveitando material biológico colhido desses animais.

Cumpre orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,



Prof. Dr. Julio Augusto Naylor Lisboa
Coordenador do CEEA/UEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. João Luis Garcia
Coordenador do Projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16428-1	Data da Emissão: 14/07/2008 10:12	Data de Validade: 14/07/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2509292	Nome: João Luis garcia	CPF: 605.644.319-15
Título do Projeto: Caracterização genética de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de Pombas (<i>Zenaida auriculata</i>) do município de Londrina, Paraná.		
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Londrina		CNPJ: 78.640.489/0001-53

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/citias . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	LONDRINA	PR	Universidade Estadual de Londrina	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Zenaida auriculata
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Zenaida auriculata
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Zenaida auriculata (*Qtde: 384)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes, Ectoparasita, Sangue, Fragmento de tecido/orgão
2	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta (Arpucas-Armadas Isca)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual de Londrina	Pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 83582191



Página 1/2