

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Cryptosporidium spp., *Giardia* spp. E *Enterocytozoon bieneusi* EM
AVES DAS MICRORREGIÕES DE UBERLÂNDIA E BELO
HORIZONTE, MG, BRASIL**

Maria Júlia Rodrigues da Cunha

Uberlândia
Fevereiro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Cryptosporidium spp., *Giardia* spp. E *Enterocytozoon bieneusi* EM
AVES DAS MICRORREGIÕES DE UBERLÂNDIA E BELO
HORIZONTE, MG, BRASIL**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial a obtenção do título de Doutor.

Maria Júlia Rodrigues da Cunha

Aluna

Prof^ª Dr^a Márcia Cristina Cury

Orientadora

Uberlândia

Fevereiro – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- C972d
2017
- Cunha, Maria Júlia Rodrigues da, 1987
Diagnóstico e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em aves das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, Brasil / Maria Júlia Rodrigues da Cunha. - 2017.
97 p. : il.
- Orientadora: Márcia Cristina Cury.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Cryptosporidium* - Teses. 3. *Giardia* - Teses. 4. Doenças parasitárias - Teses. I. Cury, Márcia Cristina. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.07

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas


Maria Júlia Rodrigues da Cunha

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial a obtenção do título de Doutor.

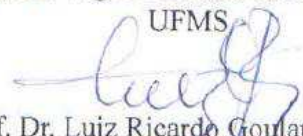
Área de Concentração: Parasitologia

Banca examinadora:


Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares
USP


Prof. Dr. Vagner Ricardo da Silva Fiuza
UFMS


Profa. Dra. Fernanda Rosafinski Moraes
FAMEV/UFU


Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
INGEB/UFU


Profa. Dra. Márcia Cristina Cury – orientadora
ICBIM/UFU

www.imunoparasito.ufu.br - E-mail: coipa@ufu.br - Telefax: (034) 3225-8672
Av. Amazonas, s/n - Bloco 4C, Sala 4C218 - Campus Umuarama
Uberlândia, MG, Brasil - CEP: 38.405-320

Uberlândia
Fevereiro – 2017

Dedicatória

A todas as amigas do laboratório de Parasitologia por fazerem os dias de trabalho mais leves e divertidos.

*Às minhas orientadoras Márcia Cury e Monica Santín,
por acreditarem no meu potencial e investirem na minha
formação acadêmica .*

A minha tia Ana, minha maior incentivadora e exemplo de vida.

*Ao meu pai, Gustavo, por me dar um voto de confiança na
busca dos meus sonhos.*

Pensamento

"Mas você tem que ter horas imperfeitas para ter as perfeitas. Você tem que matar dez horas para que duas vivam. O que você tem que cuidar é para não matar todas as horas, todos os dias."

Charles Bukowski

Agradecimientos

Em primeiro lugar, a todas as amigas do laboratório de Parasitologia, por serem a melhor parte do meu dia. Não teria chegado até aqui não fosse a amizade incondicional de vocês.

À amiga Natália, que esteve sempre ao meu lado durante os seis anos de pós-graduação, me dando suporte nos momentos difíceis e vibrando a cada vitória minha. Essa conquista também é sua.

À minha orientadora e amiga Márcia Cristina Cury, que sempre batalhou pelo sucesso, pessoal e profissional, de suas "filhas científicas". Obrigada pelo voto de credibilidade, por acreditar nesse meu sonho acadêmico e ajudar a torná-lo realidade.

À minha orientadora do exterior, Mônica Santín, por todo carinho, atenção e paciência com que me recebeu em seu laboratório e por todo ensinamento passado nos nove meses de doutorado sanduíche. Espero poder fazer por alguém o que um dia você fez por mim.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Segurança Alimentar do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), pelo acolhimento e atenção que tiveram comigo durante minha passagem por Maryland. USDA forever in my heart.

À todos os proprietários dos locais de estudo onde realizei as coletas de fezes das aves, pela prontidão em ajudar e entusiasmo em poder contribuir com a ciência.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelo conhecimento passado durante as disciplinas e a disponibilidade em ajudar quando mais precisávamos.

A toda equipe do Laboratório de Parasitologia, especialmente, às técnicas Juliana e Elaine, por toda a paciência e presteza.

Às secretarias do PPIPA, Lucélia e Lucileide, pela qualidade dos serviços prestados aos docentes e discentes da pós-graduação.

Aos amigos e familiares, pela compreensão nos momentos em que fui ausente, pois precisava estudar ou fazer experimento. Pelas palavras de incentivo quando eu fraquejava e pela vibração nas vitórias atingidas. Vocês foram fundamentais nessa jornada.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À banca examinadora, pela disponibilidade em participar da defesa da minha tese de doutorado.

Muito obrigada!

Lista de figuras

Figura 1: Diagrama esquemático do fluxograma de etapas do estudo.

Pag. 38

Figura 2: Eletroforese mostrando, aproximadamente, 825 pares pb do gene SSU rDNA de *Cryptosporidium* spp., amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 44

Figura 3: Gel de agarose 1,5% corado com GelRed, mostrando o perfil de restrição do DNA, após digestão com as enzimas *SspI* (amostras 1 a 7) e *VspI* (amostras 1' a 7').

Pag. 46

Figura 4: Eletroforese mostrando, aproximadamente, 900 pb do gene gp60 de *C. meleagridis*, amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 51

Figura 5: Alinhamento dos isolados Cry231UDI e Cry235UDI mostra as diferenças de nucleotídeos nas posições 922 e 1010 das sequências do gene gp60 de *C. meleagridis*.

Pag. 52

Figura 6: Relações filogenéticas dos subtipos de *C. meleagridis*, caracterizados pelo sequenciamento do gene gp60, inferidas pela análise Neighbour-Joining. Valores de bootstrap estabelecidos em 1000 réplicas. Círculos vazios: subtipos identificados em aves; Círculos cheios: subtipos identificados em humanos.

Pag. 52

Figura 7: Eletroforese mostrando, aproximadamente, 300 pb do gene SSU rRNA de *Giardia* spp., amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 53

Figura 8: Eletroforese mostrando, aproximadamente, 390 pares pb do gene ITS de *E. bienersi*, amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014

Pag. 56

Lista de tabelas

Tabela 1: Relação das espécies de *Cryptosporidium* e hospedeiros.

Pag. 8

Tabela 2: Espécies de *Giardia* e assemblages de *G. duodenalis*.

Pag. 13

Tabela 3: Genótipos de *E. bienersi* encontrados em aves.

Pag. 20

Tabela 4: Genes alvos e primers utilizados no diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Enterocytozoon bienersi*.

Pag. 34

Tabela 5: Análise de RFLP-PCR do gene SSU rRNA de várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. (adaptado de Xiao et al., 1999; Xiao et al., 2000, Xiao et al., 2001).

Pag. 35

Tabela 6: Local de coleta de amostras fecais, hospedeiros e número de animais por espécie, obtidas no período de março de 2013 a julho de 2014, nas microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG.

Pag. 40

Tabela 7: Número de animais coletados por local de estudo nas microrregiões de Uberlândia e Minas Gerais, MG.

Pag. 43

Tabela 8: Positividade de *Cryptosporidium* spp. por espécie aviária, encontrada em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 44

Tabela 9: Comparação entre as positivities de *Cryptosporidium* spp. encontradas em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 45

Tabela 10: Positividade de *Cryptosporidium* spp. em aves por local de coleta nas microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG.

Pag. 45

Tabela 11: Resultados do RFLP-PCR e do sequenciamento das amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014, que foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pela nested-PCR.

Pag. 48

Tabela 12: Número de amostras positivas e principais espécies e genótipos de *Cryptosporidium* encontrados em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 50

Tabela 13: Resultados do sequenciamento do gene gp60 de *C. meleagridis* gerados nesse estudo e as sequências referências depositadas no GenBank.

Pag. 51

Tabela 14: Positividade de *Giardia* spp. por espécie aviária, encontrada em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 54

Tabela 15: Comparação entre as positivities de *Giardia* spp. encontradas em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 54

Tabela 16: Positividade de *Giardia* spp. em aves por local de coleta nas microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte.

Pag. 54

Tabela 17: Resultados do sequenciamento das amostras fecais de aves, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014, procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, que foram positivas para *Giardia* spp. pela nested-PCR.

Pag. 55

Tabela 18: Positividade de *E. bieneusi* por espécie aviária, encontrada em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 56

Tabela 19: Comparação entre as positivities de *E. bieneusi* encontradas em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de Março de 2013 a Julho de 2014.

Pag. 57

Tabela 20: Positividade de *E. bieneusi* em aves por local de coleta nas microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG.

Pag. 57

Tabela 21: Número de amostras positivas e genótipos de *E. bieneusi* encontrados nas fezes de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Pag. 58

Tabela 22: Resultados do sequenciamento das amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014, que foram positivas para *E. bieneusi* pela nested-PCR.

Pag. 59

Sumário

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	7
1.2. <i>Giardia</i> spp.....	12
1.3. <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	16
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Comitê de Ética.....	28
4.2. Área de estudo.....	28
4.2.1. Microrregião de Uberlândia.....	28
4.2.2. Microrregião de Belo Horizonte.....	29
4.3. Local de Estudo.....	29
4.3.1. Propriedades particulares.....	29
4.3.2. Comércio aviários.....	30
4.3.3. Falcoaria.....	30
4.3.4. CETAS/IBAMA.....	31
4.3.5. Fragmentos florestais.....	31
4.3.6. Ofícios, autorizações e TCLE.....	31
4.4. População de estudo.....	32
4.5. Coleta de amostras.....	32
4.6. Armazenamento das amostras fecais.....	33
4.7. Extração de DNA.....	33
4.8. Diagnóstico molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Giardia</i> spp. e <i>E. bieneusi</i>	33
4.9. Identificação das espécies de <i>Cryptosporidium</i> pela RFLP.....	35
4.10. Identificação dos genótipos de <i>C. meleagridis</i>	36
4.11. Eletroforese.....	36
4.12. Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento.....	36
4.13. Avaliação, edição e Alinhamento.....	37
4.14. Clonagem.....	37
4.15. Análise estatística.....	37

5. RESULTADOS.....	39
5.1. Amostras coletadas.....	40
5.2. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	43
5.2.1. Positividade de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	43
5.2.2. Identificação das espécies de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	46
5.2.2.1. RFLP-PCR.....	46
5.2.2.2. Sequenciamento.....	47
5.2.3. Subtipagem de <i>C. meleagridis</i>	50
5.3. <i>Giardia</i> spp.....	53
5.3.1. Positividade de <i>Giardia</i> spp.....	54
5.3.2. Identificação das espécies de <i>Giardia</i> spp.....	55
5.4. <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	55
5.4.1. Positividade de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	55
5.4.2. Identificação dos genótipos de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	58
5.5. Sequências depositadas no GenBank.....	60
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
9. ANEXOS.....	93
9.1. Anexo A.....	94
9.2. Anexo B.....	95
9.3. Anexo C.....	96

Resumo

Infecções parasitárias estão entre os problemas sanitários comuns que acometem aves em todo mundo. A identificação de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em aves é relevante, visto que esses animais podem agir como veiculadores dos parasitos para o ser humano, pela contaminação ambiental. O objetivo deste estudo foi determinar a positividade e caracterizar molecularmente as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi* em aves de diferentes locais das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, Brasil. O DNA, extraído diretamente das fezes, foi submetido a reações de nested-PCR para amplificação de fragmentos dos genes SSU rRNA, SSU rRNA e ITS de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi*, respectivamente. Das 255 amostras coletadas, 25 (9,8%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp., duas (0,78%) para *Giardia* spp. e 27 (10,6%) para *E. bieneusi*. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na positividade dos parasitos estudados entre as aves das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte. Análises de RFLP-PCR e sequenciamento identificaram *C. meleagridis* em três galinhas (*Gallus gallus domesticus*), um peru (*Meleagris gallopavo*) e uma codorna (*Coturnix coturnix*) de Uberlândia e em 11 galinhas de Belo Horizonte. *C. baileyi* foi observado em três galinhas e um ganso africano (*Anser Cygnoides*) de Uberlândia e em uma galinha e uma codorna de Belo Horizonte. Genótipo de pato foi identificado em um marreco-mandarim (*Aix galericulata*) de Uberlândia e infecção mista (*C. meleagridis*/*C. baileyi*) foi reportado em uma galinha de Uberlândia. A subtipagem de *C. meleagridis* revelou a presença de três famílias. A família IIIg foi identificada em nove isolados e compreendeu 4 subtipos, sendo dois subtipos novos e dois, anteriormente, reportados. A família IIIb foi observada em dois isolados, abrangendo dois subtipos diferentes, já relatados na literatura. A família IIIa foi encontrada em um isolado, cujo subtipo foi considerado inédito. As amostras sequenciadas para *Giardia* spp., de uma galinha e de um tucano (*Ramphastos toco*), ambos provenientes de Uberlândia, foram classificadas como *Giardia duodenalis* assemblage A. Para *E. bieneusi*, o sequenciamento identificou genótipo D em oito galinhas, uma codorna e um ganso-africano de Uberlândia e em cinco galinhas de Belo Horizonte. A amostra de uma galinha d'Angola (*Numida meleagris*) proveniente de Uberlândia apresentou o genótipo Tipo IV. O genótipo Peru6 foi observado em um faisão (*Phasianus colchicus*) e em dois Pombos-domésticos (*Columba livia*) de Belo Horizonte. O genótipo Peru11 foi identificado em quatro galinhas de Uberlândia e em quatro galinhas de Belo Horizonte. A presença de espécies/genótipos de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi*, considerados zoonóticos, em animais desse estudo, pode gerar impacto negativo na saúde pública.

Abstract

Parasitic infection is among the most common health problems that affect birds worldwide. The identification of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in birds is relevant because these animals can act as disseminators of these parasites to humans through environmental contamination. The aim of this research was to determine the prevalence and perform molecular characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and *E. bieneusi* species/genotypes in feces from several microregions of Uberlândia and Belo Horizonte, MG, Brazil. The DNA extracted directly from feces was submitted to nested-PCR analysis for amplification of fragments of the SSU rDNA of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. and of the ITS gene of *E. bieneusi*. Out of 255 samples collected, 25 (9.8%) were positive for *Cryptosporidium* spp., two (0.78%) for *Giardia* spp. and 27 (10.6%) for *E. bieneusi*. There was no significant difference in the prevalence of parasites studied among birds from the microregions of Uberlândia and Belo Horizonte. RFLP-PCR and sequencing analysis have identified *C. meleagridis* in three chickens (*Gallus gallus domesticus*), one turkey (*Meleagris gallopavo*) and one quail (*Coturnix coturnix*) from Uberlândia and in 11 chickens from Belo Horizonte. *C. baileyi* was observed in three chickens and one swan goose (*Anser Cygnoides*) from Uberlândia and in one chicken and one quail from Belo Horizonte. The duck genotype was identified in one Mandarin duck (*Aix galericulata*) and mixed infection (*C. meleagridis*/*C. baileyi*) was reported in one chicken from Uberlândia. *C. meleagridis* subtyping revealed the presence of three subtype families. The subtype Family IIIg was identified in nine isolates and comprised four distinct subtypes, two novel and two previously reported. The subtype family IIIb was observed in two isolates comprising two different subtypes that have been previously reported. The subtype Family IIIa was found in one isolate that represented a novel subtype. The sequenced samples for *Giardia* spp. from one chicken and one toucan (*Ramphastos toco*), both from Uberlândia, were classified as *Giardia duodenalis* assemblage A. For *E. bieneusi*, sequencing identified genotype D in eight chickens, one quail and one swan goose from Uberlândia and in five chickens from Belo Horizonte. The helmeted guineafowl (*Numida meleagris*) sample from Uberlândia presented the TypeIV genotype. Peru6 was observed in one pheasant (*Phasianus colchicus*) and in two pigeons (*Columba livia*) from Belo Horizonte. The Peru 11 genotype was identified in four chickens from Uberlândia and in four chickens from Belo Horizonte. The existence of zoonotic species/genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and *E. bieneusi* in the animals of this study may have a negative impact on public health.

Introdução

Cryptosporidium spp., *Giardia* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* são patógenos ubíquos no ambiente, capazes de desenvolver infecções gastrointestinais no homem e em outros animais (XIAO et al., 2015). Nos Estados Unidos, entre os anos de 2000 a 2008, ocorreram 9,4 milhões de casos de gastroenterites, sendo *Cryptosporidium* e *Giardia duodenalis* os principais agentes etiológicos dessas enfermidades (KEISER; UTZINGER, 2009). No Brasil, surtos de diarreia em crianças e em indivíduos imunodeprimidos são, frequentemente, relacionados a esses parasitos (BRANTLEY et al., 2003; GONÇALVES et al., 2006).

A presença das formas infectantes desses patógenos em fontes de água e alimento representa séria ameaça à saúde pública, visto que esses parasitos têm causado diversos surtos de origem hídrica e alimentar (KARANIS et al., 2007). Em países desenvolvidos, foram relatados, pelo menos, 191 casos de surtos de transmissão hídrica por protozoários (XIAO et al., 2015). De 2004 a 2010, 46,7% dos surtos ocorreram no continente Australiano, 30,6% na América do Norte e 16,5% na Europa (XIAO et al., 2015). Em países em desenvolvimento, os casos de infecção parasitária por transmissão hídrica ou alimentar são pouco documentados, entretanto, a alta positividade de doenças gastrointestinais nesses países sugere problemas na segurança alimentar (XIAO et al., 2015).

Existem muitas fontes de contaminação ambiental por esses patógenos. Descargas de águas residuais em águas de superfície podem causar acúmulo de cistos, oocistos e esporos em fontes de água potável. Além disso, vários animais podem propagar e disseminar os parasitos no ambiente pelas fezes. De acordo com Graczyk et al. (2008), aves domésticas e silvestres são capazes de eliminar cistos, oocistos e esporos nas fezes e passá-los mecanicamente para fontes de água e alimento.

Evidências consideráveis indicam que as aves têm papel importante no ciclo de transmissão de parasitoses. De acordo com Graczyk et al. (2008), aves migratórias voam em bando e percorrem grandes distâncias, contribuindo para a disseminação ambiental de agentes infecciosos. Muitas espécies aviárias, especialmente as aquáticas, tem o hábito de reproduzir e defecar em fontes de água (GRACZYK et al., 2008). Alguns trabalhos demonstram que as aves são capazes de eliminar altas concentrações de oocistos de *Cryptosporidium*, cistos de *Giardia* e esporos de microsporídeos nas fezes (GRACZYK et al., 1998; KUHN et al., 2002; KASSA et al., 2004).

Infecções por *Cryptosporidium*, *Giardia* e *E. bieneusi* também podem gerar perdas econômicas na indústria avícola. A diarreia presente nas infecções causadas por

esses parasitos pode levar ao baixo rendimento de crescimento e produtividade de aves domésticas (OLSON et al., 2004).

1.1. *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. é protozoário do filo Apicomplexa, capaz de parasitar microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal e respiratório de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, outros mamíferos, peixes, aves, répteis e anfíbios (PENG et al., 2003; OLSON et al., 2004).

Por muito tempo, *Cryptosporidium* spp. foi considerado parasito intracelular obrigatório que se replicava apenas no interior de um hospedeiro e que os oocistos liberados nas fezes poderiam sobreviver, mas não se multiplicar no ambiente (FAYER, 2008). Entretanto, novas descobertas biológicas e moleculares, incluindo a capacidade em completar o ciclo na ausência de um hospedeiro e a produção de novos estágios extracelulares, transferiram *Cryptosporidium* de Coccidia para uma nova subclasse, Cryptogregarina (LEANDER, 2008; TEMPLETON et al., 2010; RYAN et al., 2016). Baseando-se em características moleculares, epidemiológicas e morfológicas, até o momento, 31 espécies e diversos genótipos de *Cryptosporidium* são reconhecidos (Tabela 1).

O ciclo de vida do parasito é monoxênico com padrão semelhante a de outros coccídios entéricos. Os oocistos esporulados, contendo 4 esporozoítos, são eliminados nas fezes ou em secreções respiratórias (nas aves) e após ingestão e/ou inalação, os esporozoítos são liberados, parasitando as células epiteliais do trato gastrointestinal (ou trato respiratório). Dentro das células, ocorre reprodução assexuada (merogonia) seguida de reprodução sexuada (gametogonia). Após fertilização dos macrogametas (gameta feminino) pelos microgametas (gameta masculino) é formado o zigoto e finalmente, o oocisto (XIAO E RYAN, 2015). De acordo com Xiao e Ryan (2015), cerca de 20% dos oocistos produzidos apresentam parede delgada, podendo desencistar no trato digestivo do hospedeiro e levar à auto-infecção.

Tabela 1: Relação das espécies de *Cryptosporidium* e hospedeiros.

Espécie	Hospedeiro	Referência
<i>C. parvum</i>	Bovinos, ovinos, caprinos, equinos, humanos	Tyzzer, 1912
<i>C. ubiquitum</i>	Ovinos, cervos, roedores, primatas	Fayer et al., 2010
<i>C. muris</i>	Roedores	Tyzzer, 1907
<i>C. proliferans</i>	Roedores	Kváč et al., 2016
<i>C. rubeyi</i>	Esquilos	Li et al., 2015
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	Lindsay et al., 2000
<i>C. hominis</i>	Humanos	Morgan-Ryan et al., 2002
<i>C. canis</i>	Cães	Fayer et al., 2001
<i>C. felis</i>	Felinos	Iseki, 1979
<i>C. bovis</i>	Bovinos	Fayer et al., 2005
<i>C. ryanae</i>	Bovinos	Fayer et al., 2008
<i>C. suis</i>	Suínos	Ryan et al., 2004
<i>C. wrairi</i>	Suínos	Vetterling et al., 1971
<i>C. tyzzeri</i>	Mamíferos	Ren et al., 2012
<i>C. viatorum</i>	Humanos	Elwin et al., 2012
<i>C. scrofarum</i>	Suínos	Kvac et al., 2013
<i>C. erinacei</i>	Equinos, ouriços	Kvac et al., 2014
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos	Fayer; Santín, 2009
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos	Robinson et al., 2010
<i>C. fayeri</i>	Marsupiais	Ryan et al., 2008
<i>C. macropodum</i>	Marsupiais	Power; Ryan, 2008
<i>C. meleagridis</i>	Aves	Slavin, 1955
<i>C. baileyi</i>	Aves	Current et al., 1986
<i>C. galli</i>	Aves	Ryan et al., 2003
<i>C. avium</i>	Aves	Holubová et al., 2016
<i>C. varanii</i>	Répteis	Koudela; Modry, 1998
<i>C. serpentis</i>	Répteis	Levine, 1980
<i>C. fragile</i>	Anfíbios	Jirku et al., 2008
<i>C. molnari</i>	Peixes	Alvarez-Pollitero; Sitjà-Bobadilla, 2002
<i>C. huwi</i>	Peixes	Ryan et al., 2015
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes	Alvarez-Pellitero et al., 2004

Fonte: XIAO; RYAN, 2015

Os oocistos eliminados no meio externo são infectantes, pois saem esporulados e se disseminam no ambiente com facilidade, podendo ser encontrados em fontes de água potável, redes de esgoto, lagos usados para recreação e até mesmo em alimentos (CURRENT et al., 1986; SRÉTER; VARGA, 2000). Além disso, são bastante resistentes às condições ambientais adversas, podendo se manter viáveis por longos períodos, principalmente em ambientes de temperatura e umidade elevadas (CURRENT et al., 1986; SRÉTER; VARGA, 2000).

A transmissão ocorre, preferencialmente, pela via fecal-oral, sendo a água a principal rota de transmissão em países industrializados (XIAO E RYAN, 2015). Vários surtos de criptosporidiose associados a água de consumo e recreacional foram relatados nos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, França, Austrália e Japão (FAYER, 2004; KARANIS et al., 2007; SEMENZA; NICHOLS, 2007; BALDURSSON E KARANIS, 2011). Entretanto, a transmissão da criptosporidiose pelo alimento não

está clara. Utilizando oocistos de *Cryptosporidium* isolados de frutas, verduras e frutos do mar, estudos epidemiológicos tem falhado em demonstrar associação de infecções por *Cryptosporidium* spp. e hábitos de higiene alimentar (ROBERTSON; GJERDE, 2001; PEREIRA et al., 2002; FAYER et al., 2004; BUDU-AMOAKO et al., 2011).

Infecções por *Cryptosporidium* são, geralmente, localizadas no estômago, intestino e dutos biliares (XIAO; RYAN, 2015). Em aves e em indivíduos imunodeficientes (HIV positivos, transplantados, pacientes submetidos à quimioterapia, etc) o trato respiratório também pode ser acometido (XIAO; RYAN, 2015). Nos indivíduos imunocompetentes a infecção é auto-limitante, sendo a diarreia o principal sinal clínico observado (XIAO; RYAN, 2015). A infecção é importante em crianças, pois acredita-se que a imunidade dessas contra a doença é temporária ou incompleta (CAMA et al., 2008). Os sintomas da criptosporidiose em crianças incluem diarreia, dor abdominal, náuseas, vômitos, dor-de-cabeça, fadiga e febre (XIAO E RYAN, 2015). A infecção em indivíduos imunocomprometidos é, frequentemente, associada a diarreia crônica grave, levando, em alguns casos, à morte do paciente (MANABE et al., 1998; HUNTER; NICHOLS, 2002).

O diagnóstico comum para *Cryptosporidium* spp. é o encontro e identificação de oocistos nas fezes do hospedeiro por microscopia óptica. Vários métodos de coloração ácido-resistentes são empregados, sendo o Ziehl-Neelsen modificado (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981) metodologia recomendada, pois facilita a visualização dos oocistos, que adquirem coloração rósea em contraste com o fundo verde. Contudo, algumas amostras podem conter artefatos com tamanho e formato similares ao do parasito e se mostrar álcool-ácido-resistentes, dificultando o diagnóstico (RAMIREZ; SREEVATSAN, 2006). Métodos moleculares são amplamente empregados na detecção e caracterização genética de *Cryptosporidium* spp., sendo a PCR em associação ao RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e ao sequenciamento, as metodologias, frequentemente, utilizadas (BAROULDI et al., 2013).

Em estudos de biologia molecular, a escolha da região correta do DNA é fundamental. Geralmente, um gene completo ou parte dele é escolhido para análise, dependendo do objetivo da pesquisa. Para *Cryptosporidium*, o gene que codifica a subunidade 18S do rRNA é o locus de escolha quando se pretende confirmar a presença do DNA desse protozoário (XIAO E RYAN, 2015). Esta região é conservada

e de menor polimorfismo, o que possibilita a identificação do parasito (XIAO E RYAN, 2015). Já o gene da Glicoproteína de 60 kDa (gp60) por apresentar alto polimorfismo intraespecífico é utilizado na subtipagem de *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. cuniculis*. (PENG et al., 2003; XIAO et al., 2004; YANG et al., 2016).

Em aves, até o momento, quatro espécies de *Cryptosporidium* foram identificadas, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. galli* e *C. avium*.

Tyzzer (1907), o autor do primeiro relato de infecção por *Cryptosporidium* em camundongos, também foi o pioneiro nos estudos desse parasito em aves. Porém, foi em 1955, que Slavin encontrou um parasito estruturalmente similar no intestino delgado de perus e o nomeou *C. meleagridis*.

C. meleagridis foi detectado em quatro ordens de aves, com infecções ocorrendo, preferencialmente, em Galliformes. Esse protozoário é considerado patógeno humano emergente, sendo a terceira espécie de *Cryptosporidium* mais comum em seres humanos (XIAO; FAYER, 2008; NAKAMURA; MEIRELES, 2015). Utilizando o sequenciamento do gene gp60, sete famílias (IIIa-IIIg) de *C. meleagridis* foram isoladas em amostra de humanos e de aves (STENSVOLD, 2014). A extremidade 5' desse locus contém uma região de repetições em tandem de número variável de trinucleotídeos que codificam o aminoácido serina (TCA/TCG/TCT) (STENSVOLD et al., 2014). A quantidade dessas repetições irá determinar os subtipos de cada família (STENSVOLD et al., 2014). Dessa forma, a nomenclatura dos subtipos de *C. meleagridis* começa com a designação da família (IIIa a IIIg), seguido pelo número de repetições de TCA (representada pela letra A), TCG (representada pela letra G) e TCT (representada pela letra T) (SULAIMAN et al., 2005). Algumas famílias também possuem uma ou mais repetições da sequência ACATCA (representado pela letra R) imediatamente após a repetição dos trinucleotídeos (SULAIMAN et al., 2005).

C. baileyi é a espécie comumente encontrada em aves, sendo primeiramente descrita em frangos de granja por Current et al. (1986). Essa espécie é responsável por relatos de doenças clínicas e subclínicas em mais de 12 ordens aviárias, com maior frequência em aves da ordem Galliformes (NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

Em relação a *C. galli*, o primeiro relato foi realizado por Pavlásek (1999), o qual se baseou em diferenças biológicas para descrever a espécie. Posteriormente, o parasito foi descrito novamente utilizando-se ferramentas moleculares (RYAN et al., 2003). Essa espécie se desenvolve nas células epiteliais do proventrículo das aves, com

altas taxas de morbidade e mortalidade e foi identificada em diversas espécies aviárias, principalmente àquelas pertencentes às ordens Psittaciformes e Passeriformes (PAVLÁSEK, 2001; NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

Além das quatro espécies reconhecidas, diversos genótipos de *Cryptosporidium* foram descritos no mundo, incluindo os genótipos aviários I-VI, genótipos de ganso I-V, genótipo de marreco-preto-americano e o genótipo de pato (NAKAMURA E MEIRELES, 2015; CHELLADURAI et al., 2016). Em estudo recente, Holubová et al. (2016), descreveram as características morfológicas, biológicas e moleculares do genótipo aviário V e propuseram o nome da espécie de *C. avium*. Os autores verificaram haver especificidade aviária em relação a esse parasito, a qual foi comprovada por infecções experimentais e naturais.

A espécie zoonótica, *C. parvum*, comumente relatada em mamíferos, é, esporadicamente, encontrada em aves. A infectividade dessa espécie em galinhas foi comprovada por Lindsay et al. (1987) e Palkovič e Maroušek (1989) que observaram sinais clínicos após a inoculação intra-traqueal de oocistos. Entretanto, de acordo com os autores, a colonização do parasito limitou-se ao trato respiratório e baixa quantidade de oocistos foram produzidas (LINDSAY et al., 1987; PALKOVIČ E MAROÚŠEK, 1989).

A criptosporidiose em aves se manifesta em duas formas clínicas principais. A forma respiratória, causada por *C. baileyi*, leva ao acometimento dos trato respiratório superior e inferior, gerando sinais clínicos de tosse, espirros, dispneia e conjuntivite (SRÉTER; VARGA, 2000). A forma gastrointestinal, causada por *C. meleagridis* e *C. galli*, acomete as glândulas salivares e esofágicas, proventrículos, intestino delgado, ceco, colo, cloaca e bursa de Fabricius (LINDSAY; BLAGBURN, 1990; FAYER et al., 2000). Os sinais clínicos comuns são a letargia, diarreia, perda de peso e de pigmentação das penas. Como ocorre invasão da mucosa, lesões, como atrofia das microvilosidades e hipertrofia das criptas, podem ser observadas (SRÉTER; VARGA, 2000).

Criptosporidiose é uma das doenças parasitárias mais prevalentes em aves domésticas e silvestres (NAKAMURA; MEIRELES, 2015). Esta infecção foi relatada em mais de 30 espécies aviárias em todos os continentes, com positividade variando de 0,8 a 44,4% (RYAN 2010; NAKAMURA; MEIRELES, 2015). No Brasil, a positividade de *Cryptosporidium* spp. varia de 4,86% em aves de cativeiro a 44,4% em avestruzes (NAKAMURA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008).

O encontro de *C. parvum* em aves, indica que esse grupo animal pode ser importante fonte de infecção para o ser humano pela contaminação ambiental por oocistos (SRÉTER; VARGA, 2000). Essa espécie foi relatada em aves domésticas e aquáticas da Costa do Marfim, Estados Unidos e Hungria (GRACZYK et al. 1998; ZHOU et al., 2004; McEVOY; GIDDINGS, 2009; PLUTZER; TOMOR, 2009; BERRILI et al., 2012). No Brasil, *C. parvum* foi identificado em aves de cativeiro (NAKAMURA et al., 2009; GOMES et al., 2012).

1.2. *Giardia* spp.

Giardia spp. é parasito encontrado no intestino delgado de mamíferos, roedores, aves, répteis e anfíbios, sendo, atualmente um dos organismos mais estudados do mundo, possivelmente pelo seu forte potencial zoonótico (THOMPSON, 2004).

O Gênero *Giardia* está taxonomicamente inserido no Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida, Subordem Diplomonadina, Família Hexamitidae (THOMPSON, 2004).

A taxonomia das espécies de *Giardia* é controversa e objeto de intensos debates entre os pesquisadores, resultando em nomenclatura confusa e com diferentes nomes sendo usados para a mesma espécie (MONIS et al., 2009). O conceito de rígida especificidade de hospedeiros, proposto por Hegner (1922) dominou a taxonomia da giardiase por vários anos. Foram descritas 51 espécies de *Giardia*, incluindo 30 em mamíferos, das quais duas eram de humanos, 14 em aves, quatro em anfíbios, duas em répteis e uma em peixe (THOMPSON; MONIS, 2012). A maioria dos pesquisadores concordava que essa ideia era insustentável e eram a favor da existência de variabilidade de espécies de *Giardia*, que não são rigorosamente específicas aos hospedeiros (THOMPSON et al., 1993).

Em 1952, Filice propôs, de acordo com as características morfológicas, três espécies de *Giardia*, sendo *G. duodenalis* (sinonímia *G. lamblia*, *G. intestinalis*) a que acometeria grande quantidade de mamíferos, inclusive o homem; *G. muris* parasitando camundongos; e *G. agilis* acometendo anfíbios (FAUBERT, 2000; ADAM, 2001). Posteriormente, com o avanço das técnicas de microscopia, a descrição ultraestrutural dos trofozoítos permitiu a descrição de três novas espécies, denominadas *Giardia psitacci* (ERLANDSEN; BEMRICK, 1987) parasitando periquitos, *Giardia ardeae*

(ERLANDSEN et al., 1990) em garças e *Giardia microti* em roedores do campo e do rato almiscarado (MONIS et al., 2003).

Com o desenvolvimento das pesquisas, sabe-se que *G. duodenalis* apresenta grande variabilidade genética, demonstrada por critérios fenotípicos e genotípicos (THOMPSON et al., 2000; CACCIÒ; RYAN, 2008). A partir desses estudos, observou-se que os isolados desse parasito, recuperados de humanos e de outros mamíferos podem ser divididos em oito principais genótipos (assemblages), demoninados de A, B, C, D, E, F, G e H (MONIS et al., 2003; ELEGIO-GARCIA et al., 2005; VOLOTÃO, et al., 2007).

As seis espécies de *Giardia* e os genótipos de *Giardia duodenalis* descritos estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2: Espécies de *Giardia* e assemblages de *G. duodenalis*.

Espécies	Principais hospedeiros	Referência
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Kunstler, 1882
<i>G. ardeae</i>	Garças	Noller, 1920
<i>G. microti</i>	Roedores do campo e ratos almirados	Benson, 1908
<i>G. muris</i>	Roedores	Benson, 1908
<i>G. psittaci</i>	Periquitos	Erlandsen; Bemrick, 1987
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos	Davaine, 1875
Assemblage A	Humanos, primatas, ruminantes domésticos e selvagens, alpacas, suínos, cavalos, cães domésticos e selvagens, gatos, furão, roedores, marsupiais, outros mamíferos	
Assemblage B	Humanos, primatas, gados, cães, cavalos, coelhos, castores, roedores silvestres	
Assemblage C	Cães domésticos e selvagens	
Assemblage D	Cães domésticos e selvagens	
Assemblage E	Ruminantes domésticos, suínos	
Assemblage F	Gatos	
Assemblage G	Camundongos, ratos	
Assemblage H	Focas	

Fonte: FENG e XIAO, 2011

Alguns genótipos, especialmente, o sub-grupo I da assemblage A e, em menor proporção a assemblage B, possuem potencial zoonótico, o que explica a importância da caracterização genotípica, para que possam estabelecer os papéis do homem e dos animais na transmissão da giardíase (PLUTZER et al., 2010). Por outro lado, as assemblages C, D, E e F parecem ser genótipos-específicos (PLUTZER et al., 2010).

Giardia apresenta dois estágios bem definidos no ciclo de vida, o cisto e o trofozoíto. O cisto, forma infectante e de resistência, apresenta espessa parede celular,

axonemas, fragmentos do disco ventral e quatro núcleos, sendo encontrado em fezes formadas (CACCIÒ; LALLE, 2015). O trofozoíto, forma vegetativa do parasito, apresenta dois núcleos de tamanhos iguais na parte anterior, um disco ventral, dois corpos medianos e quatro pares de flagelos (CACCIÒ E LALLE, 2015).

A forma cística, após ingerida, rompe as paredes sob a ação do baixo pH gástrico e de enzimas pancreáticas, promovendo a saída do excizoíto, que se multiplicará e dará origem a quatro trofozoítos (CACCIÒ; LALLE, 2015). Estes, aderem à mucosa intestinal e sob condições favoráveis, iniciam o processo de reprodução assexuada, multiplicando-se por divisão binária e utilizando nutrientes presentes na mucosa e lúmen intestinal (BARR et al., 1994; THOMPSON, 2004). Não há invasão celular, entretanto, o citoesqueleto e, especialmente, o disco ventral desempenham papel fundamental na sobrevivência do organismo no intestino do hospedeiro (ADAM, 2001). Completando o ciclo, o encistamento promove a sobrevivência do parasito nas condições adversas do meio (FARTHING, 1996).

A transmissão acontece pela via fecal-oral, sendo as fontes de água recreacional e de consumo responsáveis pela maioria dos surtos de giardíase registrados em países industrializados (CACCIÒ; SPRONG, 2011). O maior surto de giardíase aconteceu na Noruega em 2004, com o vazamento de esgoto em uma área residencial, deixando 1300 pessoas infectadas (NYGARD et al. 2006). O papel dos alimentos na transmissão da giardíase não é bem-entendido, uma vez que o processo de extração dos cistos do protozoário dos alimentos é, tecnicamente, desafiador (SMITH et al., 2007). Entretanto, grande variedade de frutas, verduras e frutos do mar foram identificados naturalmente contaminados com cistos de *Giardia* (SMITH et al., 2007; LEAL et al. 2013).

O curso clínico da infecção é amplo e pode variar desde a ausência de sintomas (giardíase assintomática) até a giardíase aguda ou crônica (FARTHING, 1997). O principal sintoma é a diarreia, mas flatulência, cólica abdominal, náuseas, vômito e perda de peso também podem ser observados (FARTHING, 1997). Esses sintomas estão relacionados à danos na mucosa intestinal, incluindo atrofia das vilosidades e microvilosidades (ADAM, 2001). Sintomas graves são observados em crianças, especialmente em países subdesenvolvidos, onde a giardíase é associada ao retardo do crescimento e do desenvolvimento, precárias funções cognitivas e efeitos nocivos sobre o estado nutricional (BERKMAN et al., 2002). A giardíase não é listada como

infecção oportunista, pois sintomas prolongados não são observados e a terapia independe do estado imune do paciente (CACCIÒ; LALLE, 2015).

Quanto aos métodos parasitológicos de diagnóstico, o mais utilizado é o método de flutuação em sulfato de zinco a 33% (FAUST et al., 1939), pois é eficiente, prático e rápido. Mas, resultados negativos são comuns devido à dificuldade para visualizar o parasito e à eliminação intermitente de cistos, o que leva à necessidade de técnicas alternativas.

A utilização de anticorpos monoclonais em técnicas de imunofluorescência direta e ensaio imunoenzimático (ELISA) podem ser empregados, contudo, possuem valor epidemiológico limitado, especialmente em termos de fonte de infecção (O'HANDLEY, 2002). Dessa forma, as técnicas moleculares, particularmente a PCR, têm auxiliado a identificação e caracterização das espécies de *Giardia*, possibilitando o diagnóstico e o reconhecimento de variantes intra-específicas (CACCIÒ, et al., 2002; THOMPSON, 2004).

Em estudos de caracterização molecular de *Giardia* spp., o gene que codifica a subunidade 18S do rRNA é o mais utilizado quando se pretende diferenciar as espécies de *Giardia* e assemblagens de *G. duodenalis*, por se tratar de uma região conservada. Entretanto, a genotipagem utilizando os genes β -giardin (*bg*), glutamato desidrogenase (*gdh*) e triosefosfato isomerase (*tpi*), fornece informações detalhadas dos subgrupos dos genótipos de *G. duodenalis*. Esses genes possuem sequências polimórficas capazes de diferenciar os genótipos de forma precisa (CACCIÒ, et al., 2002).

Esse protozoário é organismo bem-estudado em mamíferos, entretanto, o conhecimento em aves é limitado. Duas espécies são reconhecidas como agentes etiológicos da giardíase aviária em todo mundo, *G. ardeae* e *G. psittaci* (McROBERTS et al., 1996).

G. ardeae foi primeiramente descrita por Noller em 1920, em uma Garça-real-europeia. Posteriormente, Erlandsen et al. (1990), utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), caracterizaram, em Garça-azul-grande, um parasito similar ao encontrado por Noller e o nomeou de *G. ardeae*. Erlandsen e Benrick (1987), pela MEV, observaram a ausência dos flagelos ventrolaterais em trofozoíto procedente de Piriquito-Australiano, denominando-a de *G. psittaci*.

Aves com giardíase podem manifestar apatia e anorexia e exibir sinais de desidratação, má-absorção e perda de peso associada à diarreia (FILIPPICH et al., 1998). Infecções crônicas podem se apresentar na forma de diarreia recorrente e perda

de peso (FILIPPICH et al., 1998). A patogênese não está claramente compreendida, mas observa-se atrofia e danos nas microvilosidades intestinais. Estas alterações estão correlacionadas com deficiências enzimáticas na borda em escova, diminuindo a digestão e absorção de nutrientes, incluindo as dissacaridases, gorduras e vitaminas, que retornam à normalidade quando a infecção é debelada (BURET et al., 1991). Em algumas aves, infiltração de células inflamatórias foram observadas (FORSHAW et al., 1992).

O parasito é encontrado em aves do mundo todo, sendo identificado em aves aquáticas e em Psitacídeos nos Estados Unidos e Austrália (ERLANDSEN et al., 1991; FILIPPICH et al., 1998; GRACZYK et al., 1998; FRANSSEN et al. 2000). Na Europa, a positividade varia de 2,1% em aves silvestres a 24% em aves domésticas (PLUTZER; TOMOR, 2009; REBOREDO-FERNADEZ et al., 2015). A maior positividade do parasito nesses animais foi reportada na Costa do Marfim, com 58% de galinhas infectadas (BERRILI et al. 2012). No Brasil, existe apenas um estudo recente que identificou 1,2% de *Giardia* em aves de cativeiro (da CUNHA et al., 2016^a).

Cistos de *G. duodenalis* podem ser encontrados em aves, tornando este parasito organismo de potencial zoonótico. Somente as assemblages A e B de *G. duodenalis* foram identificadas, até o momento, em diferentes espécies aviárias procedentes da Espanha, Polônia, Itália, Costa do Marfim, Hungria e Brasil (MAJEWSKA, 2009; PLUTZER; TOMOR, 2009; BERRILI et al., 2012; PAPINI et al., 2012; REBOREDO-FERNADEZ et al., 2015; CANO et al., 2016; da CUNHA et al., 2016^a).

1.3. *Enterocytozoon bieneusi*

Microsporidia é um grupo diverso de parasitos intracelulares obrigatórios no qual incluem mais de 1200 espécies (MATHIS et al., 2005). Este grupo possui ampla diversidade de hospedeiros vertebrados e invertebrados, incluindo peixes, aves, répteis e mamíferos (SANTIN, 2015).

As espécies de microsporidia mais comuns em humanos são *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis* e *Encephalitozoon hellem*. Dessas, *E. bieneusi* é a mais frequentemente diagnosticada no mundo, sendo considerado patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos (LOBO et al., 2012). Além de humanos, esse parasito foi relatado em vários animais silvestres e domésticos, ressaltando a importância dos reservatórios animais na epidemiologia desse parasito (SANTIN, 2015).

A taxonomia do filo Microsporidia é problemática desde a descoberta. Análises moleculares iniciais, do gene 18S rDNA, indicaram que o filo poderia representar uma das primeiras linhagens eucariontes divergentes (VOSSBRINCK et al., 1987). Entretanto, análises filogenéticas subsequentes, utilizando vários genes, mostraram a origem fúngica dos microsporídeos (FISCHER; PALMER, 2005; CAPELLA-GUTIERREZ et al., 2012).

O esporo é a fase infectante de *E. bienersi*, sendo a única forma viável fora da célula hospedeira. Morfologicamente, são ovais, pequenos (0,5 x 1,5 µm) e envolvidos por uma camada de glicoproteína. No interior do esporo há o citoplasma que é o material infectante, com um único núcleo (WASSON; PEPER, 1999; KEELING; FAST, 2002). Possuem um aparelho de extrusão composto por disco de ancoragem, tubo polar e polarplasto permitindo que o esporo penetre e infecte a célula hospedeira (RIJPSTRA et al., 1998). Assim como outras células procariontes, possuem pequenos ribossomos, entretanto estão ausentes a mitocôndria, complexo de Golgi e peroxissomos (SANTIN, 2015). Os esporos do parasito são eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados e são resistentes no meio ambiente (SANTIN, 2015).

O ciclo de vida de *E. bienersi* inicia-se com a ingestão dos esporos pelo hospedeiro (animal ou humano). Esses, utilizando os tubos polares, infectam o citoplasma e o núcleo da célula hospedeira iniciando o crescimento, a divisão do parasito e o desenvolvimento do aparelho de extrusão. Núcleos individuais com tubos polares amadurecem e transformam-se em esporoblastos, que se desenvolvem em esporos maduros, os quais são excretados nas fezes podendo infectar outros hospedeiros (AKIYOSHI et al., 2009).

Infecções por *E. bienersi* são, geralmente restritas ao trato gastrointestinal, principalmente jejuno e duodeno (SANTIN, 2015). Em indivíduos imucompetentes a infecção é auto-limitante. A diarreia é o principal sinal clínico, embora os mecanismos que levam a esse quadro não tenham sido determinados (SANTIN, 2015). Esse parasito é reconhecido como patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos (AKINBO et al., 2012). Nesses pacientes, os sintomas clássicos são diarreia persistente, dor abdominal, febre, perda de peso e, em casos graves, pode levar à morte (ESPERN et al., 2007; AKINBO et al., 2012).

A transmissão ocorre pela via fecal-oral tanto para o homem como para os animais (DIDIER et al., 2004; GALVÁN-DIÁZ et al., 2014; SANTÍN, 2015). A identificação de esporos de *E. bienersi* em fontes de água, sugere que essa possa ser

importante veículo de transmissão deste parasito para o homem e para outros animais (GALVÁN et al., 2013; GUO et al., 2014). Além disso, *E. bienersi* foi identificado em alimentos frescos, como framboesa, broto de feijão e alface na Polônia (JEDRZEJEWSKI et al., 2007) e foi responsável por um surto de origem alimentar de microsporidiose na Suécia (DECRAENE et al., 2012).

O diagnóstico convencional por microscopia bem como, métodos microscópicos de fluorescência têm sido imprecisos e de difícil execução, pois dependem da experiência do examinador e devido ao tamanho diminuto da forma evolutiva encontrada nas fezes (esporos com 0,5 x 1,5 µm). Ensaio sorológicos para *E. bienersi*, ainda, não estão disponíveis comercialmente (SAK et al., 2010).

Diante dessas limitações, métodos moleculares como Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) têm sido utilizados em pesquisas, para identificação de *E. bienersi*. A técnica possui alta sensibilidade e é capaz de identificar espécies e genótipos, mesmo em níveis baixos de infecção (MUNGTHIN et al., 2005; RINDER et al., 1998).

Embora, o entendimento da epidemiologia seja limitado, fontes potenciais de infecção para homem e animais estão sendo identificadas pelos métodos moleculares. Nesse sentido, a genotipagem é ferramenta útil nas investigações epidemiológicas e tem mostrado que alguns genótipos de *E. bienersi* estão associados apenas a humanos, enquanto outros, infectam humanos e animais (CAMA et al., 2007; SANTIN; FAYER, 2011). Para a tipagem de *E. bienersi*, técnicas moleculares são empregadas, sendo o Espaçador Transcrito Interno Ribossomal (ITS), a região de escolha dos pesquisadores (SANTIN, 2015).

Atualmente, cerca de 204 genótipos de *E. bienersi* foram identificados, baseados na análise da região ITS, incluindo 52 em humanos, 34 zoonóticos e 106 hospedeiros-específicos (SANTIN, 2015). Além disso, vários genótipos foram identificados na água, sendo os hospedeiros desconhecidos (SANTIN, 2015).

Informações desse microsporídeo em aves são escassas, com o primeiro relato nesses animais e o primeiro em não mamíferos, detectado em frangos de corte de baixo peso em um abatedouro na Alemanha (REETZ et al., 2002). Desde então, foram reportados apenas quatro estudos de *E. bienersi* em aves domésticas, nos quais três casos foram em galinhas procedentes do Peru, China e Brasil e um caso em avestruz, na Espanha (FENG et al., 2011; GALVAN-DIAZ et al., 2014; LI et al., 2014; da CUNHA et al., 2016b). No único estudo realizado no Brasil com aves domésticas,

15,9% das galinhas provenientes de diferentes mercados aviários mostraram-se positivas para o parasito (da CUNHA et al., 2016b).

E. bieneusi também foi reportado em aves das ordens Anseriformes, Columbiformes, Gruiformes, Passeriformes, Psittaciformes e Falconiformes na Espanha, Portugal, Abu Dhabi, República Checa, Brasil, Iran e China (HARO et al., 2005, 2006; LOBO et al., 2006, MÜLLER et al., 2008; KASICKOVÁ et al., 2009; LALLO et al., 2012; PIRESTANI et al., 2013; ZHAO et al., 2016). Em estudo realizado com aves não domésticas no Brasil, Lallo et al. (2012), identificaram 24,5% de pombos e aves exóticas infectadas por este parasito. Nos estudos acima citados, a maioria dos animais infectados era aparentemente saudável, servindo como reservatório assintomático e fonte de contaminação ambiental (SANTIN, 2015).

Embora exista um número limitado de isolados de *E. bieneusi* que foram molecularmente caracterizados, genótipos zoonóticos foram documentados em aves de alguns países do mundo, indicando que esse grupo animal pode ser fonte de infecção para os humanos (Tabela 3). Bern et al. (2005) observaram relação entre infecção com genótipo Peru6 e contato de pacientes HIV positivos com patos e galinhas durante investigação em hospitais do Peru. No Brasil, os genótipos zoonóticos Tipo IV, D, EbpA, Peru6 e Peru11 foram relatados em aves domésticas e silvestres (Tabela 3). Entretanto, nem todos os genótipos de *E. bieneusi* encontrados em aves possuem potencial zoonótico. Alguns deles foram reportados apenas em aves, sendo considerados hospedeiro-específicos. Esses já foram documentados no Irã, China e Espanha, porém no Brasil, não há registros de genótipos específicos de aves.

Tabela 3: Genótipos de *E. bieneusi* encontrados em aves.

Genótipo (sinônimo)	Ordem da ave (espécie)	País	Referência
A*	<u>Psittaciformes</u> (<i>Agapornis roseicollis</i> , <i>Agapornis personata</i> , <i>Amazona leucocephala</i> , <i>Melopsittacus undulatus</i> , <i>Nymphicus hollandicus</i> , <i>Myiopsitta monachus</i> , <i>Alisterus scapularis</i> , <i>Polytelis swainsonii</i> , <i>Pyrrhura sp.</i> , <i>Platycercus elegans</i> , <i>Platycercus eximius</i>) <u>Passeriformes</u> (<i>Serinus canaria</i> , <i>Temenuchus pagodarum</i>) <u>Columbiformes</u> (<i>Ocyphaps lophotes</i>)	República Checa	Kasicková et al., 2009
TipoIV*	<u>Struthioniformes</u> (<i>Struthio camelus</i>) <u>Galliformes</u> (<i>Gallus gallus</i>)	Espanha Brasil	Galvan-Diaz et al., 2014 da Cunha et al., 2016b
Peru6*	<u>Psittaciformes</u> (<i>Agapornis sp.</i>) <u>Columbiformes</u> (<i>Columba livia</i>) <u>Galliformes</u> (<i>Gallus gallus</i>) <u>Gruiformes</u> (<i>Grus japonensis</i>) <u>Anseriformes</u> (<i>Anas platyrhynchos</i> , <i>Anser domestica</i>)	Portugal, China Brasil China	Lobo et al., 2006; Zhao et al., 2016 da Cunha et al., 2016b Zhao et al., 2016
D* (CebC, Peru 9, PigEBITS9, PtEbVI, WL8)	<u>Falconiformes</u> (<i>Falco sp.</i>) <u>Columbiformes</u> (<i>Columba livia</i>) <u>Galliformes</u> (<i>Gallus gallus</i>) <u>Gruiformes</u> (<i>Grus japonensis</i> , <i>Grus grus</i>)	Abu Dhabi Iran Brasil China	Müller et al., 2008 Pirestani et al., 2013 da Cunha et al., 2016b Zhao et al., 2016
Peru8*	<u>Galliformes</u> (<i>Gallus gallus</i>)	Peru	Feng et al., 2011

Continua.

Tabela 3: Continuação

Genótipo (sinônimo)	Ordem da ave (espécie)	País	Referência
EbpA*	<u>Psittaciformes</u>	Brasil	Lallo et al., 2012
(F)	(<i>Amazona aestiva</i> , <i>Melopsittacus undulatus</i>)		
	<u>Passeriformes</u>		
	(<i>Sicalis flaveola</i>)		
	<u>Columbiformes</u>		
	(<i>Columba livia</i>)		
	<u>Psittaciformes</u>	República Checa	Kasickova et al., 2009
	(<i>Agapornis fischeri</i> , <i>Agapornis nigrigenis</i> , <i>Agapornis cana</i> , <i>Agapornis personata</i> , <i>Melopsittacus undulatus</i> , <i>Aratinga acuticaudata</i> , <i>Aratinga mitrata</i> , <i>Aratinga auricapilla</i> , <i>Barnardius zonarius</i> , <i>Cyanoramphus novaezelandiae</i> , <i>Nandayus nenday</i> , <i>Neophema splendida</i> , <i>Neophema pulchella</i> , <i>Polytelis alexandrae</i> , <i>Poicephalus senegalus</i> , <i>Psittacus erithacus</i> , <i>Pyrrhura sp.</i> , <i>Platycercus elegans</i> , <i>Platycercus eximius</i> , <i>Platycercus caledonicus</i>)		
	<u>Columbiformes</u>		
	(<i>Geopelia cuneata</i>)		
	<u>Gruiformes</u>	China	Zhao et al., 2016
	(<i>Grus vipio</i>)		
J*	<u>Galliformes</u>	Alemanha	Reetz et al., 2002
(BEB1, CebB, PtEbX)	(<i>Gallus gallus</i>)		
	<u>Columbiformes</u>	Iran	Pirestani et al., 2013
	(<i>Columba livia</i>)		
PtEbII*	<u>Psittaciformes</u>	Portugal	Lobo et al., 2006
(Peru6-var)	(<i>Psittacus erithacus</i>)		
	<u>Columbiformes</u>		
	(<i>Columba livia</i>)		
Henan-IV*	<u>Galliformes</u>	China	Li et al., 2014
	(<i>Gallus gallus</i>)		
M	<u>Columbiformes</u>	Iran	Pirestani et al., 2013
	(<i>Columba livia</i>)		
CC-1	<u>Galliformes</u>	China	Li et al., 2014
	(<i>Gallus gallus</i>)		
Col01	<u>Columbiformes</u>	Espanha	Haro et al., 2005
	(<i>Columba livia</i>)		
Col02	<u>Columbiformes</u>	Espanha	Haro et al., 2006
	(<i>Columba livia</i>)		
Col03	<u>Columbiformes</u>	Espanha	Haro et al., 2006
	(<i>Columba livia</i>)		

Continua.

Tabela 3: Continuação

Genótipo (sinônimo)	Ordem da ave (espécie)	País	Referência
Col04	<u>Columbiformes</u> (<i>Columba livia</i>)	Espanha	Haro et al., 2006
Col05	<u>Columbiformes</u> (<i>Columba livia</i>)	Espanha	Haro et al., 2006
Peru11 [*] (Peru 12)	<u>Galliformes</u> (<i>Gallus gallus</i>)	Brasil	da Cunha et al., 2016b
BEB6 [*]	<u>Anseriformes</u> (<i>Anas platyrhynchos</i> , <i>Anser domestica</i>)	China	Zhao et al., 2016
CHN-B1	<u>Gruidiformes</u> (<i>Grus leucogeranus</i>)	China	Zhao et al., 2016
CHN-B2	<u>Anseriformes</u> (<i>Anas platyrhynchos</i>)	China	Zhao et al., 2016
CHN-B3	<u>Anseriformes</u> (<i>Anser domestica</i>)	China	Zhao et al., 2016

^{*} Genótipos encontrados em humanos

Justificativa

Infecções parasitárias estão entre os problemas sanitários comuns em aves silvestres e domésticas. Produzem impactos econômicos na indústria avícola e influenciam na ecologia, evolução e conservação das espécies. Representam, também, ameaça à saúde pública, visto que as aves podem agir como veiculadoras de infecção para o ser humano por meio da contaminação ambiental de fontes de água de consumo e recreacional.

Dentre os parasitos considerados de fácil disseminação ambiental por hospedeiros aviários destacam-se *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi*. Nos últimos anos, esses patógenos foram relatados como agentes etiológicos causadores de surtos epidêmicos de transmissão hídrica, podendo as aves ter importância epidemiológica na disseminação ambiental de oocistos, cistos e esporos. Mas, apesar de serem considerados potenciais veiculadoras de doenças, poucos estudos descrevem o papel desses animais na cadeia de transmissão dos parasitos.

O setor avícola está em crescente avanço no Brasil, possuindo destaque como importante atividade econômica. Atualmente, o país está entre o três maiores produtores de carne de frango do mundo e lidera o ranking mundial na exportação de frango. Esse crescimento tem como consequência a ampliação dos sistemas produtivos, nos quais são necessários aumentar a concentração de animais nos criadouros. Isso gera condições para que patógenos de fácil dispersão e infecção sejam transmitidos para todo plantel.

Nesse sentido, parasitos como *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi* passam a ter importância, pois podem levar à redução da capacidade produtiva pela atuação direta no organismo do hospedeiro ou pela ação oportunista. Portanto, é essencial maior conhecimento e atenção aos parasitos que impactam negativamente no rendimento de aves de produção. Estudos que abordem a ecologia, epidemiologia e o potencial zoonóticos de espécies/genótipos são fundamentais para se ter embasamento na elaboração de estratégias de benfeitorias na saúde pública, de planos de manejos adequados que visem diminuir perdas econômicas na indústria avícola e na conservação e manutenção das espécies aviárias.

Objetivos

3.1. Objetivo geral

Determinar a positividade e caracterizar molecularmente as espécies e ou genótipos de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em diferentes espécies aviárias nas microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar a positividade dos parasitos estudados entre as microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte;
- Determinar as espécies de *Cryptosporidium* encontradas nas aves estudadas, por meio de análises de RFLP-PCR e sequenciamento;
- Determinar os subtipos de *C. meleagridis*, caso essa espécie seja encontrada;
- Determinar as espécies de *Giardia* encontradas nas aves estudadas, pelo sequenciamento;
- Determinar as assemblages de *Giardia duodenalis*, caso essa espécie seja encontrada.
- Determinar os genótipos de *Enterocytozoon bieneusi* encontrados nas aves estudadas, pelo sequenciamento;
- Em caso de infecções mistas, identificar, por meio da clonagem, os genótipos presentes nas amostras.
- Verificar se os isolados encontrados em aves de diferentes habitats possuem potencial zoonóticos.

Material e Métodos

4.1. Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), sob o protocolo número 151/13 (Anexo A).

4.2. Área de Estudo

4.2.1. Microrregião de Uberlândia

A microrregião de Uberlândia localiza-se do lado oeste do estado de Minas Gerais. Pertencente à mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, possui população estimada, pelo IBGE em 2012, de 838.094 habitantes, divididos em dez municípios, com área total de 18.790Km². Apresenta temperatura média de 23,1°C e índice pluviométrico de 1500 a 1600 mm.

A região é caracterizada por vegetação sob domínio do Cerrado (*lato sensu*), que atualmente está restrito a pequenas reservas isoladas, tendo no entorno atividades agropecuárias e reflorestamento (ARAÚJO et al., 1997). O clima é classificado como tropical de altitude, do tipo Aw, segundo Köppen, apresentando nítida sazonalidade, com chuvas de outubro a abril e seca de maio a setembro (ROSA et al., 1991).

A avifauna presente na microrregião é rica, sendo encontradas espécies de diversas ordens, como: Anseriformes, Podicipediformes, Pelecaniformes, Ciconiiformes, Falconiformes, Charadriiformes, Columbiformes, Psittaciformes, Cuculiformes, Strigiformes, Caprimulgiformes, Apodiformes, Piciformes e Passeriformes (MARÇAL JUNIOR et al., 2009).

O setor avícola de Uberlândia é representativo em termos econômicos e sociais, possuindo dezenas de granjas tecnificadas de criação confinada. Mas, nos últimos anos a procura por galinhas caipiras criadas à solta tem aumentado na região. Segundo dados da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (Emater), Uberlândia possui, pelo menos, 40 criadores de galinha caipira, sendo 20 para animais de corte e 20 para produção de ovos (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2016). Além disso, a cidade conta com a participação de pequenos agricultores, que criam galinhas e outras aves domésticas para consumo próprio e comercialização informal.

4.2.2. Microrregião de Belo Horizonte

A microrregião de Belo Horizonte pertence à mesorregião metropolitana de Belo Horizonte. A população foi estimada, pelo IBGE, em 2006 em 4.867.529 habitantes, sendo dividida em 24 municípios com área total de 5.819, 855 km².

A Região localiza-se na transição entre os Domínios da Mata Atlântica, que se estende até a parte leste da Cadeia do Espinhaço e os Domínios do Cerrado (MEYER et al., 2004). O clima é classificado como tropical de altitude, do tipo CW_a, segundo Köppen, com inverno seco e verão chuvoso (MEYER et al., 2004).

A avifauna da microrregião é rica, sendo encontradas espécies de várias ordens, como: Passeriformes, Tinamiformes, Accipitriformes, Caprimulgiformes, Columbiformes, Suliformes, Pelecaniformes, Gruiformes, Coraciiformes, Podicipediformes, Anseriformes e Charadriiformes (VASCONCELOS et al., 2013; RODRIGUEZ; MICHELIN, 2005).

No cenário da avicultura de Minas Gerais, a grande Belo Horizonte possui destaque na venda de frangos vivos, abatidos e de ovos. O número de granjas de aves criadas em modelo semi-intensivo tem crescido e se revelado alternativa para os pequenos produtores e produtores independentes. Várias cidades próximas à capital, como Jaboticatubas, Ribeirão das Neves e Pará de Minas tem investido na produção dessa modalidade, sendo o mercado central, localizado na capital um dos lugares de comercialização de galinhas e aves exóticas para alguns produtores.

4.3. Local de estudo

Para determinação dos locais onde seriam coletados as amostras fecais, médicos veterinários foram contactados para que fornecessem contatos de proprietários de comércio aviários, propriedades particulares e falcoarias. Também foram contactados centros de triagem de animais silvestres e pesquisadores da UFU que trabalham com captura de aves silvestres para estudos ecológicos.

4.3.1. Propriedades particulares

Foram convidadas a participar da pesquisa, propriedades particulares (fazendas, chácaras e residências urbanas) que possuíam aves domésticas e silvestres criadas à solta ou em cativeiro.

Nas propriedades onde as aves domésticas eram criadas à solta, essas ficavam em contato direto com outros animais domésticos, como bovinos, suínos, equinos e

cães. Se alimentavam de grãos fornecidos pelos proprietários, insetos capturados do chão e bebiam água de torneira ou de poças formadas pela água da chuva. Em outras propriedades, as aves eram criadas de modo intensivo, sendo alocadas em recintos de alvenaria, sem contato com outros animais. Os recintos eram higienizados de três a quatro vezes na semana e as aves eram alimentadas com grãos e ração e tomavam água da torneira sem filtragem prévia. Aves silvestres também foram encontradas nessas propriedades, sendo coletado material fecal das mesmas. Nesse caso, de acordo com os responsáveis, a higienização das gaiolas e viveiros era realizada diariamente e o alimento fornecido era a base de frutas, sementes e água da torneira. Os proprietários negaram a vermifugação dos animais.

4.3.2. Comércio aviários

Foram selecionados, aleatoriamente, comércio aviários informais que comercializam aves domésticas e exóticas. Nesses locais, geralmente, as aves são alocadas em gaiolas individuais, porém, em alguns casos, um pequeno número de animais eram colocados juntos em uma única gaiola grande. De acordo com os responsáveis, as gaiolas eram higienizadas diariamente e as aves se alimentam de frutas, ração e água da torneira. Os proprietários negaram a vermifugação dos animais ou não souberam informar.

4.3.3. Falcoaria

No estudo, foi incluída, uma escola de falcoaria localizada na cidade de Uberlândia, MG. O local cria e treina animais de rapina de diversas espécies para controle de aves em aeroportos e outras empresas que necessitam de ambiente limpo.

Regularmente, as aves são soltas, por curtos períodos de tempo, para caçar e, em seguida, retornam ao encontro dos seus treinadores. Na falcoaria, as aves são mantidas em gaiolas individuais, higienizadas diariamente, ou presas em troncos de madeira. Os animais recebem como alimentação, carne fresca e água da torneira e são vermifugados caso alguma parasitose seja diagnosticada por exames laboratoriais, após passarem por consulta veterinária.

4.3.4. O Centro de Triagem de Animais Silvestres/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

O CETAS de Belo Horizonte, MG, é empreendimento autorizado pelo IBAMA que tem por finalidade receber, identificar, marcar, triar, avaliar, recuperar, reabilitar e destinar animais silvestres provenientes de ação de fiscalização, resgate ou entrega voluntária.

Ao chegarem ao CETAS, os animais silvestres tem a espécie identificada, são avaliados por médicos veterinários e biólogos e, posteriormente, vermifugados. Em caso de alguma alteração clínica ou ferimento, são tratados e quando curados são destinados a soltura. Nos casos em que o animal não possuir condições de ser solto na natureza, este será destinado para zoológicos, mantenedores ou criadouros científicos cadastrados.

No CETAS, as aves sadias são alocadas em viveiros de acordo com a espécie. Os animais doentes são mantidos em quarentena, em gaiolas individuais. Os viveiros e as gaiolas são higienizados diariamente e os animais recebem como alimentação, frutas, ração e água da torneira.

4.3.5. Fragmentos florestais

Foram realizadas coletas em aves silvestres de vida livre em parceria com a Professora Doutora Celine Melo do Instituto de Biologia da UFU. Os animais foram capturados em quatro áreas de florestas estacionais semidecíduais no Triângulo Mineiro: Mata da Fazenda Água Fria, localizada no município de Araguari; Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, localizada no município de Perdizes; Mata da Fazenda Irara e Mata da Fazenda São José, ambas localizadas no município de Uberlândia.

4.3.6. Ofícios, autorizações e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Para realização das coletas no CETAS/IBAMA em Belo Horizonte, o coordenador do órgão, Dr. Daniel Vilela, foi contactado e um ofício foi direcionado ao superintendente do IBAMA/MG para formalizar o pedido de coleta das amostras fecais (ANEXO B).

Os responsáveis pelas propriedades particulares, comércios aviários e falcoaria, antes do início do trabalho, foram contactados para autorização da coleta das fezes dos animais e assinaram TCLE (ANEXO C).

A captura de animais silvestres foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), sob autorização de número 17264, em nome da Professora Doutora Celine Melo (registro Sisbio: 359076).

4.4. População de estudo

Foram incluídas nesta pesquisa, quaisquer aves, independente de idade, sexo, espécie, origem ou condições de saúde do animal. Durante os dias de realização das coletas de fezes, os animais não receberam nenhum tipo de fármaco antiparasitário.

4.5. Coleta das amostras

No momento da coleta, as amostras foram coletadas de modo individual. Nos locais em que as aves viviam em recintos/gaiolas separadas não houve necessidade de interferir. Porém, em alguns locais, algumas aves conviviam em um único espaço, havendo necessidade de separá-las para obtenção da amostra. Para isso, foram adquiridas gaiolas, as quais eram previamente higienizadas e desinfetadas com hipoclorito. As aves eram alocadas, individualmente, nas gaiolas até a defecação, sendo soltas ou voltando para o alojamento de origem, logo em seguida. As fezes frescas foram retiradas da porção superior do bolo fecal, do piso das gaiolas e depositadas em tubos de poliestileno identificados (espécie, família ou gênero, número correspondente do indivíduo, local de coleta e número da coleta). As fezes das aves de grande porte (Avestruz, Emu e pavão) foram coletadas diretamente do chão, logo após os animais defecarem.

Para captura das aves presentes nos fragmentos florestais, foram utilizadas redes de neblina, expostas em trilhas entre 06:30h e 16:00h. As redes foram checadas em intervalos de, aproximadamente, 30 minutos. As aves eram retiradas e acomodadas em sacos de tecidos, de onde eram retiradas as fezes dos animais.

Foi padronizado que, apenas uma amostra fecal por ave seria coletada, pois não seria possível identificar as aves criadas à solta nas coletas subsequentes, devido a

rotatividade nos comércios aviários e ao hábito de vida livre dos animais capturados nos fragmentos florestais.

Os tubos contendo as fezes foram armazenados em caixa térmica contendo gelo e transportados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia para processamento.

4.6. Armazenamento das amostras fecais

No Laboratório de Parasitologia da UFU, as amostras fecais foram mantidas a -20° C até o momento da extração de DNA, por no máximo, 14 dias após as coletas.

4.7. Extração de DNA

O DNA foi extraído diretamente das fezes utilizando “kit” comercial QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), com pequenas modificações das instruções do fabricante. Foram acrescentados 0,3 gramas de pérolas de zircônia (Stratech Scientific, Luton, United Kingdom) à 0,2 gramas de fezes com o tampão de lise do “kit”, com posterior agitação vigorosa, após aquecimento à 95°C (McLAUHLIN et al., 1997). Essa modificação foi realizada com o intuito de facilitar o rompimento dos cistos, oocistos e esporos dos parasitos. O DNA foi eluído em 150 µL de tampão, a fim de aumentar a quantidade de DNA recuperado, e armazenado em freezer a -20°C. As amostras de DNA foram enviadas ao “Environmental Microbial and Food Safety Laboratory” do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), localizado em Beltsville, no estado americano de Maryland, para realização das análises moleculares.

4.8. Diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Enterocytozoon bieneusi*

Reações de PCR para o diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* (SSU rRNA), *Giardia* (SSU rRNA) e *E. bieneusi* (SSU rRNA, ITS, and LSU rRNA) foram utilizadas de acordo com as metodologias previamente descrita por Xiao et al. (1999); Hopkins et al. (1997) e Appelbee et al., (2003) e Buckholt et al. (2002), respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Genes alvos e primers utilizados no diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Enterocytozoon bieneusi*.

Parasito	Reação	Gene	Primer	Sequência	Tamanho	Referência
<i>Cryptosporidium</i>	Nested PCR	SSU rRNA	CryF	TTCTAGAGCTAATACATGCG	1325 pb	Xiao et al. (1999)
			CryR	CCCATTTCCTTCGAAACAGGA		
			AL3032	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	825 pb	
			AL1598	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		
<i>Giardia</i>	Nested PCR	SSU rRNA	GiaF	AAGTGTGGTGCAGACGGACTC	500 pb	Appelbee et al. (2003)
			GiaR	CTGCTGCCGTCCTTGATGT		
			RH11	CATCCGGTCGATCCTGCC	300 pb	Hopkins et al. (1997)
			RH4	AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG		
<i>E. bieneusi</i>	Nested PCR	SSU rRNA, ITS e LSU rRNA	EBITS3	GGTCATAGGGATGAAGAG	435 pb	Buckholt et al. (2002)
			EBITS4	TTCGAGTTCCTTCGCGCTC		
			EBITS1	GCTCTGAATATCTATGGCT	390 pb	
			EBITS2	ATCGCCGACGGATCCAAGTG		

pb: pares de base

Todas as reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 µL. Para *Cryptosporidium* spp. foi utilizada solução contendo tampão 1X composto de Tris-HCl 10 mM, pH= 8,3 e KCl 50 mM, 6 mM de MgCl₂ (3mM na segunda amplificação), 0,2 mM de cada um dos quatro nucleotídeos, 0,04 pmol de cada iniciador, 2,5 U de *Taq* DNA Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 5 µL de cada amostra de DNA. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C (3 min) e de 35 ciclos térmicos para desnaturação a 94°C (45s), anelamento a 55°C (45s) e extensão a 72°C (60s), seguida de uma extensão final de 72°C (7 min). Os produtos amplificados na primeira etapa foram utilizados como molde para uma segunda amplificação pela nested-PCR, realizada nas mesmas condições descritas para a primeira etapa de amplificação, diferindo apenas no tempo da extensão a 72° que foi de 40 segundos.

Nas reações de PCR para *Giardia* spp. foram utilizadas soluções possuindo tampão 1X composto de Tris-HCl 10 mM, pH= 8,3 e KCl 50 mM, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol de cada primer, 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), 2,5 U de *Taq* DNA Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 5 µL de cada amostra de DNA. O programa da primeira amplificação consistiu de desnaturação inicial a 96°C (2 min), 35 ciclos térmicos para desnaturação a 96°C (45s), anelamento a 58°C (30s) e extensão a 72°C (45s), seguida de uma extensão final de 72°C (4 min). As condições da segunda amplificação diferiram apenas na temperatura do anelamento (55°C).

Para *E. bieneusi*, foi utilizada solução contendo tampão 1X composto por 1,5 mM de MgCl₂, 50mM de KCl e 20mM Tris-HCl (pH=9), 0,2 mM de cada dNTP, 1 pmol de cada primer, 2,5 µL de BSA (0,1 g/10 mL), 2,5 U de *Taq* (MP Biomedicals, Solon, OH) e 5 µL de cada amostra de DNA. O programa da primeira amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C (3 min), 35 ciclos térmicos para desnaturação a 94°C (30s), anelamento a 57°C (30s) e extensão a 72°C (40s), seguida de uma extensão final de 72°C (10 min). As condições da segunda amplificação diferiram na quantidade de ciclos (30) e na temperatura de anelamento (55°C).

Controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações.

4.9. Identificação das espécies de *Cryptosporidium* pela de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP-PCR)

Para determinação da espécie de *Cryptosporidium*, os produtos secundários da nested-PCR foram digeridos com dez unidades das endonucleases *SspI* e *VspI* (New England BioLabs), de acordo com as orientações do fabricante. Após a digestão, 25 µL de cada produto digerido foram diluídos em 5 µL de tampão da amostra 5x (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol, 25% de Ficoll 400) e aplicados em gel de agarose a 2%. A análise visual dos produtos da nested-PCR clivados com as enzimas de restrição foi seguida como demonstrado na tabela 5:

Tabela 5: Análise de RFLP-PCR do gene SSU rRNA de várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. (adaptado de Xiao et al., 1999; Xiao et al., 2000, Xiao et al., 2001).

Espécie	Hospedeiro	<i>SspI</i> (pb)	<i>VspI</i> (pb)
<i>C. parvum</i> bovino A	Bovinos	11, 12, 108, 254, 449	102, 104/628
<i>C. parvum</i> bovino B	Bovinos	9, 119, 254, 449	102, 104, 625
<i>C. hominis</i> *	Humanos	11, 12, 111, 254, 449	70, 102, 104, 561
<i>C. parvum</i> monkey	Macacos	11, 109, 254, 461	70, 102, 104, 559
<i>C. parvum</i> mouse	Ratos	11, 12, 112, 254, 449	102, 104, 175, 457
<i>C. parvum</i> ferret	Ferret	11, 12, 111, 254, 449	102, 104, 174, 457
<i>C. meleagridis</i>	Peru	11, 108, 254, 449	102, 104, 171, 456
<i>C. wrairi</i>	Porquinho da Índia	11, 109, 254, 449	102, 104, 628
<i>C. andersoni</i> / <i>C. muris</i>	Bovinos	385, 448	102, 731
<i>C. serpentis</i>	Serpentes	14, 33, 370, 414	102, 729
<i>C. bailyei</i>	Galinha	254, 572	102, 104, 620
<i>C. felis</i>	Gato	15, 33, 390, 426	102, 104, 182, 476
<i>C. canis</i> **	Cão	20, 33, 105, 254, 417	94, 102, 633

**C. parvum* genótipo humano (*C. hominis*).

***C. parvum* genótipo dog (*C. canis*)

4.10. Identificação dos genótipos de *C. meleagridis*

As amostras positivas para *C. meleagridis* pelas análises de RFLP e/ou pelo sequenciamento dos produtos de PCR do gene SSU rRNA foram submetidas a subtipagem utilizando-se o gene da glicoproteína de 60-kDa (gp60) como alvo.

As reações de nested-PCR foram realizadas utilizando-se os primers CRSout115F (GATGAGATTGTCGCTCGTTATC) e CRSout1328R (AACCTGCGGAACCTGTG-3=) para a primeira amplificação e ATGFmod (GAGATTGTCGCTCGTTATCG) e GATR2 (GATTGCAAAAACGGAAGG) para a segunda amplificação de acordo com a metodologia proposta por Stensvold et al. (2014). Os produtos obtidos nas primeira e segunda etapas tinham tamanho aproximado de 1100 e 900 pb, respectivamente. As reações de nested-PCR foram realizadas em volume final de 50 µL contendo tampão 1X composto de Tris-HCl 10 mM, pH= 8,3 e KCl 50 mM, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 pmol de cada primer, 2,5 µL de BSA (0,1 g/10 mL), 2,5 U de *Taq* (MP Biomedicals, Solon, OH) e 5 µL de cada amostra de DNA. As condições térmicas das reações incluíam desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos (primeira reação) ou 58°C por 30 segundos (segunda reação) e 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos.

4.11. Eletroforese

Os produtos das reações de PCR e nested-PCR foram submetidos à eletroforese no sistema QIAxcel Advanced (Qiagen, Valencia, California).

4.12. Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento

Todos os produtos de PCR positivos foram purificados utilizando enzima ExoSAP-IT (USB Corporation; Cleveland, OH) e sequenciados nas duas direções utilizando os primers da reação secundária, em analisador de ácidos nucleicos ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O volume final da reação foi de 10µL e continha, além dos primers, o reagente BigDye terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit.

4.13. Avaliação, edição e Alinhamento

As sequências obtidas de cada sentido foram alinhadas, examinadas e comparadas com sequências disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando o programa SeqMan™ (DNASTar Inc., Madison, Wisconsin) para determinar as espécies, genótipos e subtipos dos parasitos. Para a nomenclatura dos genótipos de *E. bieneusi* foi utilizado sistema de nomenclatura proposto por Santín e Fayer (2009).

A análise filogenética foi realizada usando “Neighbour-Joining” (NJ) implementada no programa MEGA v.7.0 e os valores de “bootstrap” foram calculados pela análise de 1000 réplicas.

4.14. Clonagem

Para os casos em que foram detectadas infecções mistas foram realizadas clonagens de acordo com a metodologia proposta por Santín et al. (2011). Os produtos da PCR foram clonados utilizando o kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os transformantes foram selecionados a partir de cada amostra e amplificados pela PCR, usando os iniciadores M13 senso (GTAAAACGACGGCCAG) e antisenso (CAGGAAACAGCTATGAC). Após desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, foram realizados 35 ciclos térmicos, consistindo em desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 40 segundos. A extensão final ocorreu a 68°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram sequenciados em ambas as direções, utilizando-se até oito clones de cada amostra.

Diagrama esquemático das etapas do trabalho está demonstrado na Figura 1.

4.15. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Nas comparações das positividade dos parasitos entre as cidades de Uberlândia e Belo Horizonte foi usado teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

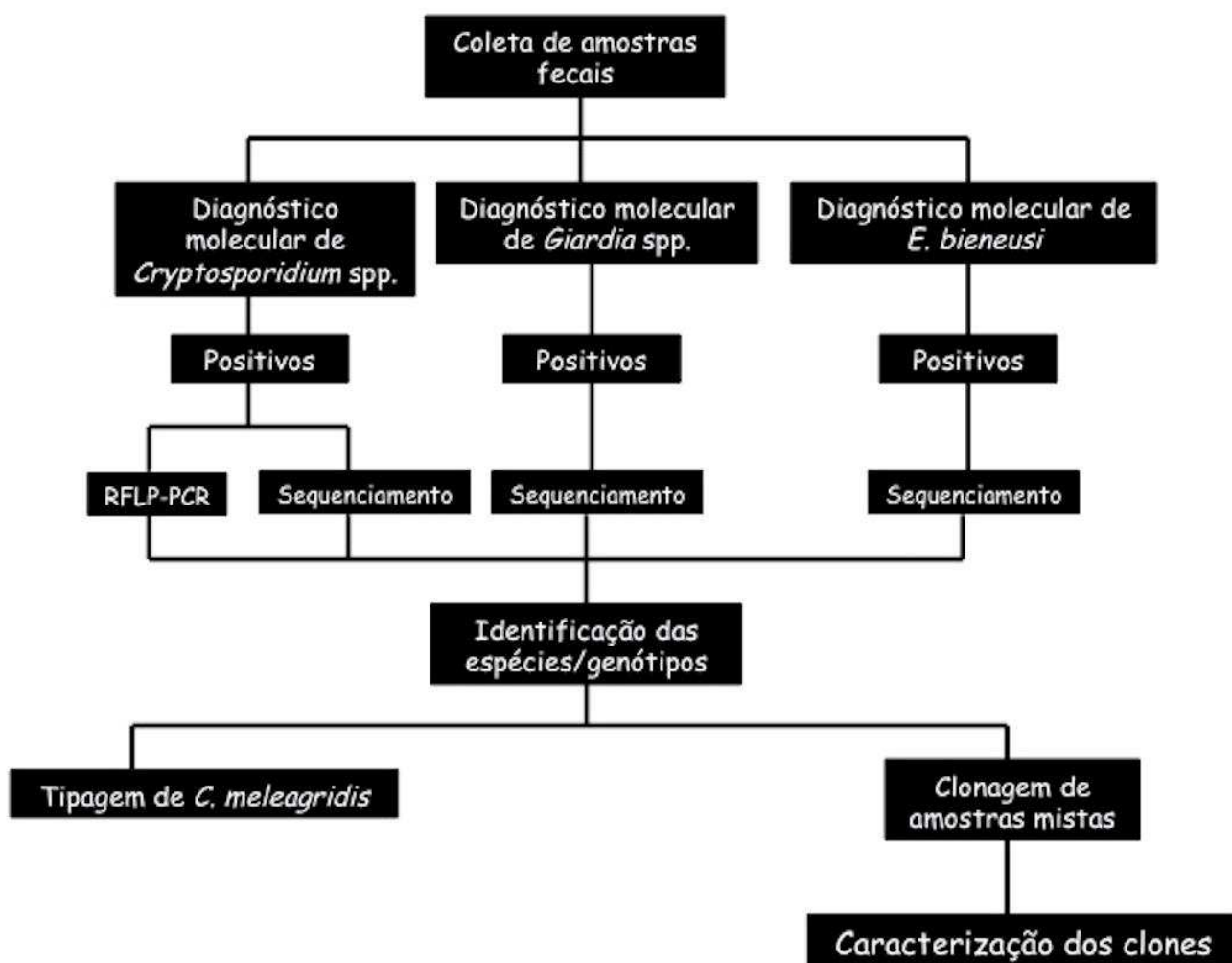


Figura 1: Diagrama esquemático do fluxograma de etapas do estudo.

Resultados

5.1. Amostras coletadas

Foram coletadas 255 amostras de fezes de aves pertencentes a 44 espécies diferentes, em 17 meses de coleta (março de 2013 a julho de 2014). Em Uberlândia, 139 amostras de fezes foram colhidas de aves pertencentes a 29 espécies de 17 famílias em 6 propriedades particulares, 9 comércios aviários, uma falcoaria e nos fragmentos florestais (Tabela 6). Em Belo Horizonte, foram coletadas 116 amostras de aves pertencentes a 25 espécies de 9 famílias em 2 propriedades particulares, 2 comércios aviários e no CETAS/IBAMA (Tabela 6). O número de animais coletados por local de estudo está representado na tabela 7.

Tabela 6: Local de coleta de amostras fecais, hospedeiros e número de animais por espécie, obtidas no período de março de 2013 a julho de 2014, nas microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG.

Local		Espécie	Família	Nome popular	Nº animais
Uberlândia	Propriedade particular 1	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	10
		<i>Pavo cristatus</i>	Phasianidae	Pavão	1
		<i>Meleagris gallopavo</i>	Phasianidae	Peru	1
		<i>Struthio camelus</i>	Struthionidae	Avestruz	2
		<i>Anser cygnoides</i>	Anatidae	Ganso-africano	2
		<i>Anas querquedula</i>	Anatidae	Marreco	1
		<i>Aratinga leucophthalma</i>	Psittacidae	Maritaca	1
		<i>Melopsittacus undulatus</i>	Psittacidae	Periquito-australiano	1
	Propriedade particular 2	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	5
	Propriedade particular 3	<i>Agapornis roseicollis</i>	Psittacidae	Agapornis	1
		<i>Agapornis nigrigenis</i>	Psittacidae	Agapornis	1
		<i>Nymphicus hollandicus</i>	Cacatuidae	Calopsita	3
		<i>Ramphastos toco</i>	Ramphastidae	Tucano	1
	Propriedade particular 4	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	4
		<i>Coturnix coturnix</i>	Phasianidae	Codorna	1
		<i>Aratinga leucophthalma</i>	Psittacidae	Maritaca	1
	Propriedade particular 5	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	11
		<i>Coturnix coturnix</i>	Phasianidae	Codorna	1
	Propriedade particular 6	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	5

Continua.

Tabela 6: Continuação

Local		Espécie	Família	Nome popular	Nº animais
Uberlândia	Comércio aviário 1	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	6
		<i>Cairina moschata</i>	Anatidae	Pato-mudo-branco	2
	Comércio aviário 2	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	4
		<i>Numida meleagris</i>	Numididae	Galinha d'Angola	2
		<i>Anser cygnoides</i>	Anatidae	Ganso-africano	1
		<i>Aix galericulata</i>	Anatidae	Marreco-mandarim	1
		<i>Anas Platyrhynchos</i>	Anatidae	Pato-real	1
		<i>Cairina moschata</i>	Anatidae	Pato-mudo-branco	1
	Comércio aviário 3	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	11
		<i>Numida meleagris</i>	Numididae	Galinha d'Angola	1
		<i>Cairina moschata</i>	Anatidae	Pato-mudo-branco	1
	Comércio aviário 4	<i>Serinus canarius</i>	Fringillidae	Canário-belga	8
	Comércio aviário 5	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	8
		<i>Coturnix coturnix</i>	Phasianidae	Codorna	1
	Comércio aviário 6	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	2
		<i>Coturnix coturnix</i>	Phasianidae	Codorna	1
		<i>Numida meleagris</i>	Numididae	Galinha d'Angola	1
	Comércio aviário 7	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	2
		<i>Coturnix coturnix</i>	Phasianidae	Codorna	1
	Comércio aviário 8	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	2
		<i>Aix galericulata</i>	Anatidae	Marreco-mandarim	1
		<i>Callonetta leucophrys</i>	Anatidae	Marreco-de-coleira	1
	Comércio aviário 9	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	4
	Falcoaria	<i>Tyto alba</i>	Tytonidae	Suindara	2
		<i>Bubu virginianus</i>	Strigidae	Jucurutu	1
		<i>Falco femoralis</i>	Falconidae	Falcão-de-coleira	6
		<i>Buteo albicaudatus</i>	Accipitridae	Gavião-de-rabo-branco	1
	Fragmentos florestais	<i>Myiothlypis flaveola</i>	Parulidae	Canário-do-mato	8
		<i>Basileuterus hypoleucus</i>	Parulidae	Pula-pula-de-barriga-branca	2
		<i>Cyclarhis gujanensis</i>	Vireonidae	Pitiguari	1
		<i>Conopophaga lineata</i>	Conopophagidae	Chupa-dente	1
		<i>Thamnophilus pelzeni</i>	Thamnophilidae	Choca-do-planalto	1

Continua.

Tabela 6: Continuação

Local		Espécie	Família	Nome popular	Nº animais
Belo Horizonte	Propriedade particular 7	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	5
		<i>Phasianus colchicus</i>	Phasianidae	Faisão	7
		<i>Pavo cristatus</i>	Phasianidae	Pavão	2
		<i>Dromaius novaehollandiae</i>	Dromaiidae	Emu	2
		<i>Pyrrhura perlata</i>	Psittacidae	Triba-de-barriga-vermelha	3
		<i>Psittacula krameri</i>	Psittacidae	Periquito-de-colar	4
		<i>Pionus menstruus</i>	Psittacidae	Maritaca-de-cabeça-azul	1
		<i>Pyrrhura cruentata</i>	Psittacidae	Tiriba-grande	1
		<i>Aratinga jandaya</i>	Psittacidae	Jandaia-verdadeiro	2
		<i>Ara chloropterus</i>	Psittacidae	Arara-vermelha	1
		<i>Pyrrhura roseifrons</i>	Psittacidae	Tiriba-de-cabeça-vermelha	1
		<i>Amazona aestiva</i>	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	2
	Propriedade particular 8	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	29
		<i>Numida meleagris</i>	Numididae	Galinha d’Angola	1
	Comércio aviário 10	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	13
		<i>Phasianus colchicus</i>	Phasianidae	Faisão	2
		<i>Cairina moschata</i>	Anatidae	Pato-mudo-branco	2
		<i>Anas querquedula</i>	Anatidae	Marreco	1
		<i>Columba livia</i>	Columbidae	Pombo-doméstico	2
	Comércio aviário 11	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galinha	10
		<i>Phasianus colchicus</i>	Phasianidae	Faisão	1
		<i>Sporophila caerulescens</i>	Thraupidae	Coleirinho	2
		<i>Sicalis flaveola</i>	Thraupidae	Canário-chapinha	2
		<i>Serinus canarius</i>	Fringillidae	Canário-belga	2
		<i>Melopsittacus undulatus</i>	Psittacidae	Piriquito-australiano	1
		<i>Anser Cygnoides</i>	Anatidae	Ganso-africano	1
	CETAS/IBAMA	<i>Amazona aestiva</i>	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	3
		<i>Aratinga leucophthalma</i>	Psittacidae	Maritaca	1
		<i>Saltator similis</i>	Thraupidae	Trinca-ferro	9
		<i>Schistochlamys ruficapillus</i>	Thraupidae	Bico-de-veludo	1
		<i>Saltatricula atricollis</i>	Thraupidae	Bico-de-pimenta	1
		<i>Ramphastos toco</i>	Ramphastidae	Tucano	1
Total					255

Tabela 7: Número de animais coletados por local de estudo nas microrregiões de Uberlândia e Minas Gerais, MG.

Local		Nº de animais (%)
Uberlândia	Propriedade particular 1	19 (7,4)
	Propriedade particular 2	5 (1,1)
	Propriedade particular 3	6 (2,3)
	Propriedade particular 4	6 (2,3)
	Propriedade particular 5	12 (4,7)
	Propriedade particular 6	5 (1,1)
	Comércio aviário 1	8 (3,1)
	Comércio aviário 2	10 (3,9)
	Comércio aviário 3	13 (5,1)
	Comércio aviário 4	8 (3,1)
	Comércio aviário 5	9 (3,5)
	Comércio aviário 6	4 (1,6)
	Comércio aviário 7	3 (1,2)
	Comércio aviário 8	4 (1,6)
	Comércio aviário 9	4 (1,6)
	Falcoaria	10 (3,9)
	Fragmentos florestais	13 (5,1)
Total		139 (54,5)
Belo Horizonte	Propriedade particular 7	31 (12,1)
	Propriedade particular 8	30 (11,8)
	Comércio aviário 10	20 (7,8)
	Comércio aviário 11	19 (7,4)
	CETAS/IBAMA	16 (6,3)
Total		116 (45,5)
Total Uberlândia + Belo Horizonte		255

5.2. *Cryptosporidium* spp.

5.2.1. Positividade de *Cryptosporidium* spp.

Do total das 255 amostras coletadas, 25 (9,8%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. após análise pela nested-PCR (Figura 2 e Tabela 8).

Das aves procedentes de Uberlândia (n=139), 13 (9,35%), pertencentes às famílias Phasianidae (*Gallus gallus domesticus*, *Meleagris gallopavo* e *Coturnix coturnix*) e Anatidae (*Anser Cygnoides* e *Aix galericulata*) foram positivas para o parasito (Tabela 8). Das aves de Belo Horizonte (n=116), 12 (10,34%), pertencentes à família Phasianidae (*Gallus gallus domesticus*) foram positivas (Tabela 8). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na positividade de *Cryptosporidium* spp. entre as aves de Uberlândia e Belo Horizonte (p=0,83) (Tabela 9).

Como pode ser observado na tabela 10, a positividade variou de 0 a 33,33% nos diferentes locais de coletas das amostras fecais.

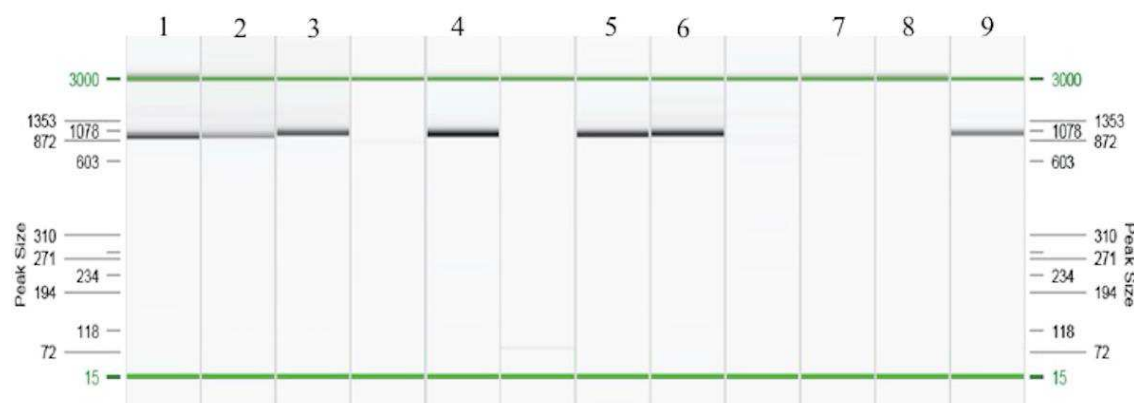


Figura 2: Eletroforese mostrando, aproximadamente, 825 pares pb do gene SSU rDNA de *Cryptosporidium* spp., amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014. Linhas 1 a 6: Amostras positivas para *Cryptosporidium* spp.; Linha 7: Controle negativo da PCR 1; Linha 8: Controle negativo da PCR 2; Linha 9: Controle positivo (*C. muris*).

Tabela 8: Positividade de *Cryptosporidium* spp. por espécie aviária, encontrada em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Local	Hospedeiro	Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)
Uberlândia	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	74	8	10,81
	Peru (<i>Meleagris gallopavo</i>)	1	1	100
	Codorna (<i>Coturnix coturnix</i>)	5	2	40
	Marreco-mandarim (<i>Aix galericulata</i>)	2	1	50
	Ganso-africano (<i>Anser Cygnoides</i>)	3	1	33,33
	24 Outras espécies	54	0	0
Belo Horizonte	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	57	12	21,05
	25 outras espécies	59	0	0
Total		255	25	9,8

Tabela 9: Comparação entre as positivities de *Cryptosporidium* spp. encontradas em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Local	Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)	p-valor
Uberlândia	139	13	9,35	0,83
Belo Horizonte	116	12	10,34	
Total	255	25	9,8	

Tabela 10: Positividade de *Cryptosporidium* spp. em aves por local de coleta nas microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG.

Local		Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)
Uberlândia	Propriedade particular 1	19	2	10,53
	Propriedade particular 2	5	0	0
	Propriedade particular 3	6	0	0
	Propriedade particular 4	6	0	0
	Propriedade particular 5	12	2	16,67
	Propriedade particular 6	5	0	0
	Comércio aviário 1	8	1	12,5
	Comércio aviário 2	10	1	10
	Comércio aviário 3	13	4	30,77
	Comércio aviário 4	8	0	0
	Comércio aviário 5	9	2	22,22
	Comércio aviário 6	4	0	0
	Comércio aviário 7	3	1	33,3
	Comércio aviário 8	4	0	0
	Comércio aviário 9	4	0	0
	Falcoaria	10	0	0
	Fragmentos florestais	13	0	0
Belo Horizonte	Propriedade particular 7	31	0	0
	Propriedade particular 8	30	9	30
	Comércio aviário 10	20	2	10
	Comércio aviário 11	19	1	5,26
	CETAS/IBAMA	16	0	0
Total		255	25	9,8

5.2.2. Identificação das espécies de *Cryptosporidium* spp.

5.2.2.1. RFLP-PCR

Análises de RFLP-PCR dos produtos dos fragmentos do gene SSU rDNA identificaram a presença de duas espécies nas amostras positivas, *C. meleagridis*, cujas leituras foram próximas a 108pb, 254pb e 449 pb, com a enzima *SspI* e 102(104)pb, 171 pb e 456pb com a enzima *VspI* e *C. baileyi*, com leituras aproximadas de 254pb e 572pb com a enzima *SspI* e 102(104)pb, 171pb e 456pb com a enzima *VspI* (Figura 3).

C. meleagridis foi identificado em quatro galinhas (*Gallus gallus domesticus*), um Peru (*Meleagris gallopavo*) e uma codorna (*Coturnix coturnix*) em Uberlândia e em nove galinhas em Belo Horizonte (*Gallus gallus domesticus*) (Tabela 11). *C. baileyi* foi encontrado em três galinhas (*Gallus gallus domesticus*), um ganso-africano (*Anser Cygnoides*), um marreco-mandarim (*Aix galericulata*) e uma codorna (*Coturnix coturnix*) em Uberlândia e em uma galinha (*Gallus gallus domesticus*) em Belo Horizonte (Tabela 11). Em três amostra positivas pela nested-PCR, os padrões de restrição enzimática das amostras mostraram-se indeterminados, ou seja, distintos dos padrões de referência.

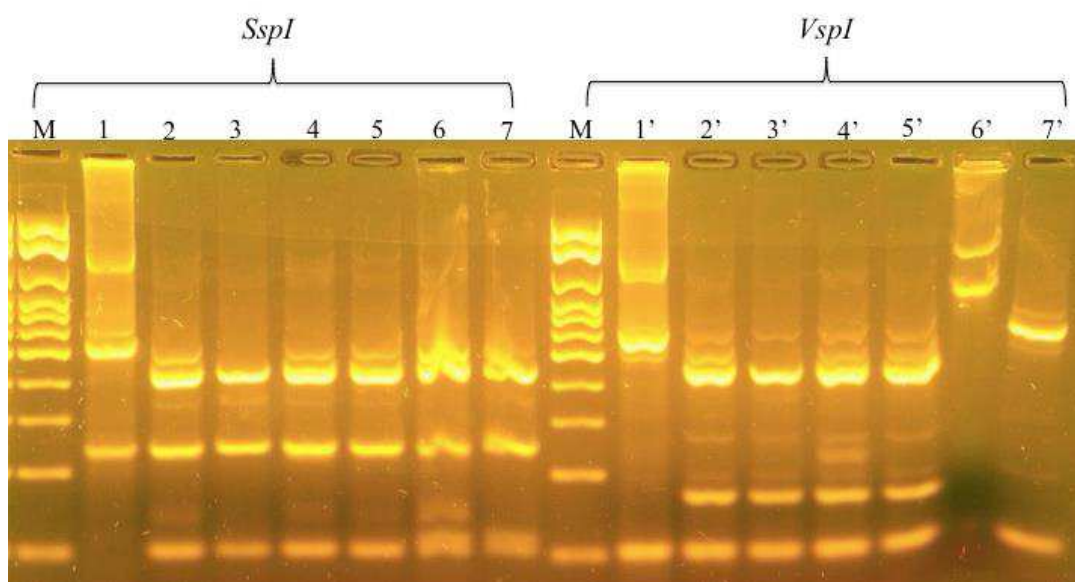


Figura 3: Gel de agarose 1,5% corado com GelRed, mostrando o perfil de restrição do DNA, após digestão com as enzimas *SspI* (amostras 1 a 7) e *VspI* (amostras 1' a 7'). M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base; 1 e 1': amostra positiva para *C. baileyi* 2 (2'), 3 (3'), 4 (4') e 5 (5'): amostras positivas para *C. meleagridis*; 6 (6') e 7 (7'): Controle positivo (*C. parvum*).

5.2.2.1. Sequenciamento

Das 25 amostras positivas pela nested-PCR, 24 foram sequenciadas com sucesso (Tabela 11). Os resultados das análises das sequências do gene SSU rRNA foram semelhantes aos padrões obtidos pela RFLP-PCR, com algumas diferenças. A sequência do isolado Cry100UDI, quando comparada a outras sequências disponíveis no GenBank, foi caracterizada como genótipo de pato (Tabela 11). Os isolados Cry238UDI e Cry68UDI que, mostraram padrões de restrição indeterminados na RFLP-PCR, foram identificados como *C. meleagridis* (Tabela 11). Os produtos amplificados do isolado Cry112UDI não produziram sequência legível. A sequência do isolado Cry194UDI apresentou infecção mista, havendo necessidade de realizar clonagem, cujo resultado demonstrou a presença de *C. meleagridis* e *C. baileyi* na amostra (Tabela 9). As sequências obtidas nesse estudo exibiram 100% de similaridade com as sequências referências depositadas no GenBank, com exceção da sequência do Genótipo de pato que apresentou 99% de similaridade (Tabela 11).

Com base nos resultados de sequenciamento dos genes SSU rRNA e gp60, *C. meleagridis* foi a espécie mais prevalente, sendo encontrada em 68% das amostras (17/25), seguida de *C. baileyi* (6/25; 24%) e genótipo de pato (1/25; 4%) (Tabela 12).

Tabela 11: Resultados do RFLP-PCR e do sequenciamento das amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014, que foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pela nested-PCR.

Local		Isolado	Hospedeiro	Resultado RFLP	Resultado BLAST	Sequência referência (similaridade)
Uberlândia	Propriedade particular 1	Cry37UDI	Peru (<i>Meleagris gallopavo</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry35UDI	Ganso africano (<i>Anser Cygnoides</i>)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	AF262324 (100%)
	Propriedade particular 5	Cry194UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	Infecção mista (<i>C. meleagridis</i> / <i>C. baileyi</i>)	AF112574 (100%); AF262324 (100%)
		Cry196UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	AF262324 (100%)
	Comércio aviário 1	Cry6UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	AF262324 (100%)
	Comércio aviário 2	Cry100UDI	Marreco-mandarim (<i>Aix galericulata</i>)	<i>C. baileyi</i>	Genótipo de pato	AY504514 (99%)
	Comércio aviário 3	Cry109UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry111UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
	Comércio aviário 5	Cry112UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	PI*	N/A**	N/A
		Cry113UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	AF262324 (100%)
		Cry206UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry208UDI	Codorna (<i>Coturnix coturnix</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
	Comércio aviário 7	Cry216UDI	Codorna (<i>Coturnix coturnix</i>)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	AF262324 (100%)
Belo Horizonte	Propriedade particular 8	Cry231UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry232UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry233UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)

* Padrão indeterminado de restrição enzimática.

** Não aplicável.

Continua.

Tabela 11: Continuação

Local		Isolado	Hospedeiro	Resultado RFLP	Resultado BLAST	Sequência referência (similaridade)
Belo Horizonte	Propriedade particular 8	Cry234UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry235UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry236UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry237UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry238UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	PI*	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
		Cry251UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
	Comércio aviário 10	Cry61UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	AF262324 (100%)
		Cry68UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	PI*	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)
	Comércio aviário 11	Cry172UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>	AF112574 (100%)

* Padrão indeterminado de restrição enzimática.

** Não aplicável.

Tabela 12: Número de amostras positivas e principais espécies e genótipos de *Cryptosporidium* encontrados em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Local	Nº de amostras positivas	Espécie (n)
Uberlândia	12	<i>C. meleagridis</i> (5), <i>C. baileyi</i> (5) Infecção mista <i>C. meleagridis</i> / <i>C. baileyi</i> (1) Genótipo de ganso I (1)
Belo Horizonte	12	<i>C. meleagridis</i> (11), <i>C. baileyi</i> (1)
Total	25	<i>C. meleagridis</i> (17), <i>C. baileyi</i> (6), Genótipo de pato I (1), infecção mista <i>C. meleagridis</i>/<i>C. baileyi</i> (1)

5.2.3. Subtipagem de *C. meleagridis*

Das 17 amostras positivas para *C. meleagridis* pela RFLP-PCR e/ou nested-PCR, 11 foram subtipadas, com sucesso, pela análise do gene gp60 (Figura 4). Além dessas, a amostra do isolado Cry112UDI, que apresentou padrão de restrição indeterminado pela RFLP-PCR e sequenciamento mal sucedido, também foi submetida a subtipagem, totalizando 12 amostras subtipadas.

O sequenciamento do gene gp60 revelou a presença de três famílias de *C. meleagridis*, IIIa, IIIb e IIIg (Tabela 11). A família IIIg foi identificada em duas e em sete galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de Uberlândia e de Belo Horizonte, respectivamente. A IIIb foi encontrada em uma galinha (*Gallus gallus domesticus*) e uma codorna (*Coturnix coturnix*) de Uberlândia e a IIIa em um Peru (*Meleagris gallopavo*) de Uberlândia (Tabela 13).

A família mais prevalente foi a IIIg, sendo identificada em nove amostras, compreendendo quatro subtipos (IIIgA21G3R1, IIIgA22G3R1, IIIgA24G2R1 e IIIgA25G3R1). Desses, dois são considerados subtipos novos (IIIgA21G3R1/IIIgA25G3R1) e dois já foram reportados na literatura (IIIgA22G3R1/IIIgA24G2R1). Como pode ser visto na figura 5, os dois isolados do novo subtipo IIIgA21G3R1 apresentam 2 nucleotídeos diferentes nas posições 922 e 1010, e foram classificados como diferentes variantes do subtipo e diferenciados por letras minúsculas (a e b) (Figura 4). A família IIIb foi identificada em dois isolados, abrangendo dois subtipos diferentes (IIIbA23G1R1 e IIIbA24G1R1), anteriormente, relatados (Tabela 13). A família IIIa foi encontrada em uma amostra, cujo subtipo foi considerado inédito (IIIaA22G3R1) (Tabela 13).

As sequências dos isolados Cry68UDI, Cry172UDI, Cry206UDI e Cry208UDI, exibiram 99% de similaridade com as sequências referências depositadas no GenBank e CryUDI234, Cry237UDI e Cry251UDI exibiram 98% de similaridade (Tabela 13). A árvore filogenética dos subtipos de *C. meleagridis* encontrados nesse estudo e as sequências referências utilizadas estão demonstradas na figura 6.

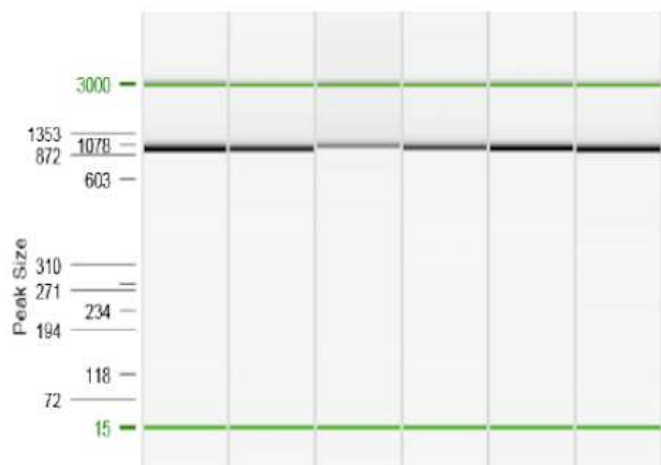


Figura 4: Eletroforese mostrando, aproximadamente, 900 pb do gene gp60 de *C. meleagridis*, amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Tabela 13: Resultados do sequenciamento do gene gp60 de *C. meleagridis* gerados nesse estudo e as sequências referências depositadas no GenBank.

Local		Isolado	Hospedeiro	Resultado BLAST	Sequência referência (similaridade)
Uberlândia	Propriedade particular 1	Cry37UDI	Peru (<i>Meleagris gallopavo</i>)	IIIaA22G3R1	Novo subtipo
	Comércio aviário 3	Cry109UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIgA25G3R1	Novo subtipo
		Cry112UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIgA25G3R1	Novo subtipo
	Comércio aviário 5	Cry206UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIbA24G1R1	KU852729 (99%)
		Cry208UDI	Codorna (<i>Coturnix coturnix</i>)	IIIbA23G1R1	KJ210609 (99%)
Belo Horizonte	Propriedade particular 8	Cry231UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIgA21G3R1a	Novo subtipo
		Cry234UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIgA22G3R1	KU852730 (98%)
		Cry235UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIgA21G3R1b	Novo subtipo
		Cry237UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIgA22G3R1	KU852730 (98%)
		Cry251UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIgA22G3R1	KU852730 (98%)
	Comércio aviário 10	Cry68UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIgA24G2R1	JX878610 (99%)
	Comércio aviário 11	Cry172UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	IIIgA24G2R1	JX878610 (99%)

Cry231UDI_(A21G3R1a)	CAGCTTTATTTCATGATGTAACCTTTTCAATTGAATTTTAAAGTTTAAGAGTTTAAAGA	960
Cry235UDI_(A21G3R1b)	CAGCTTTATTTCATGATGTAACCTTTTCAATTGAATTTTAAAGTTTAAGAGTTTAAAGA	960

Cry231UDI_(A21G3R1a)	ATGATTGCTATGGGAATCTTTCATGCGAATTGCATTGAAGGTTTGTTCATTACATTAA	1020
Cry235UDI_(A21G3R1b)	ATGATTGCTATGGGAATCTTTCATGCGAATTGCATTGAAGGTTTGTTCATTACATTAA	1020

Cry231UDI_(A21G3R1a)	TCAGGACGCCAGTTTACGCTGAAGAATAATTAATTTTAACTCCAGAATTTCTCAC	1080
Cry235UDI_(A21G3R1b)	TCAGGACGCCAGTTTACGCTGAAGAATAATTAATTTTAACTCCAGAATTTCTCAC	1080

Cry231UDI_(A21G3R1a)	AGGTTCCGCAGGTT	1094
Cry235UDI_(A21G3R1b)	AGGTTCCGCAGGTT	1094

Figura 5: Alinhamento dos isolados Cry231UDI e Cry235UDI mostra as diferenças de nucleotídeos nas posições 922 e 1010 das sequências do gene gp60 de *C. meleagridis*.

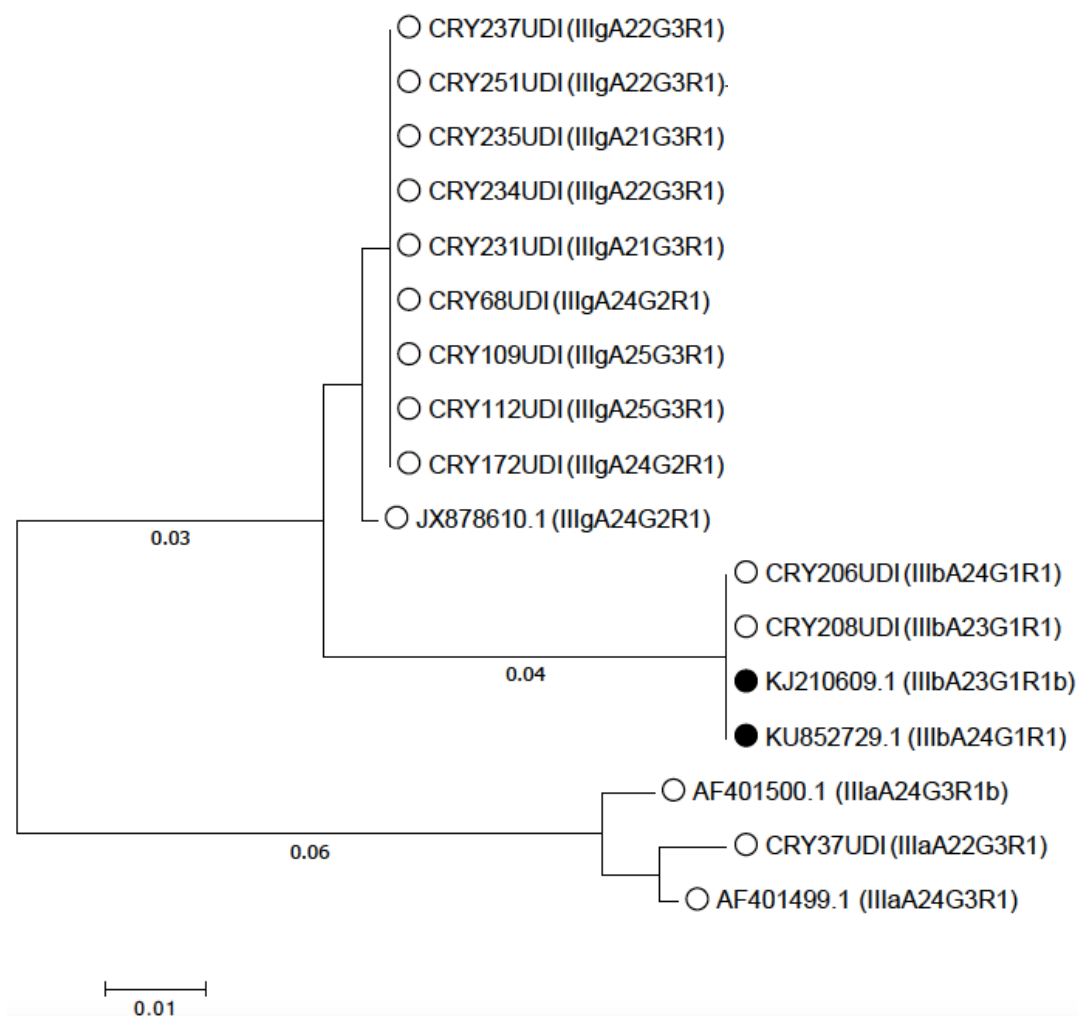


Figura 6: Relações filogenéticas dos subtipos de *C. meleagridis*, caracterizados pelo sequenciamento do gene gp60, inferidas pela análise Neighbour-Joining. Valores de bootstrap estabelecidos em 1000 réplicas. Círculos vazios: subtipos identificados em aves; Círculos cheios: subtipos identificados em humanos.

5.3. *Giardia* spp.

5.3.1. Positividade de *Giardia* spp.

Das 255 amostras coletadas, duas (0,78%) foram positivas para *Giardia* spp. após análise pela nested-PCR (Figura 7 e Tabela 14).

Das aves de Uberlândia (n=139), duas (1,43%), pertencentes às famílias Ramphastidae (*Ramphastos toco*) e Phasianidae (*Gallus gallus domesticus*) foram (Tabela 14). Nenhuma amostra proveniente de Belo Horizonte foi positiva para *Giardia* spp. (Tabela 14). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na positividade de *Giardia* spp. entre as aves de Uberlândia e Belo Horizonte ($p=0,5$) (Tabela 15).

A positividade encontrada nos diferentes locais de coletas das amostras fecais variou de 0 a 25%, como pode ser observado na Tabela 16.

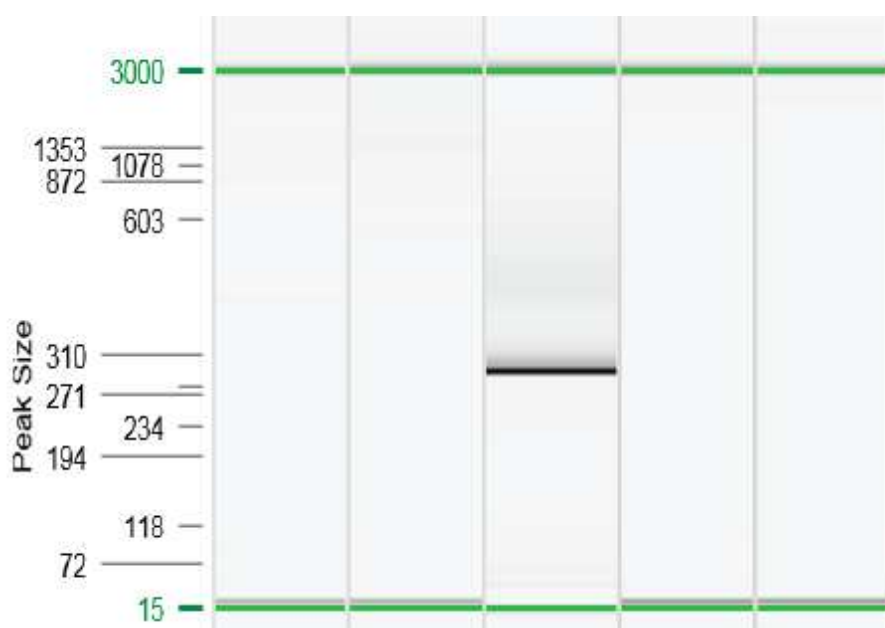


Figura 7: Eletroforese mostrando, aproximadamente, 300 pb do gene SSU rRNA de *Giardia* spp., amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Tabela 14: Positividade de *Giardia* spp. por espécie aviária, encontrada em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Local	Hospedeiro	Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)
Uberlândia	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	74	1	1,35
	Tucano (<i>Ramphastos toco</i>)	1	1	100
	27 outras espécies	64	0	0
Belo Horizonte	26 espécies	116	0	0
Total		255	2	0,78

Tabela 15: Comparação entre as positivities de *Giardia* spp. encontradas em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Local	Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)	p-valor
Uberlândia	139	2	1,44	0,5
Belo Horizonte	116	0	0	
Total	255	2	0,78	

Tabela 16: Positividade de *Giardia* spp. em aves por local de coleta nas microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte.

Local		Total de amostras	Nº de amostras positivas (%)	Positividade (%)
Uberlândia	Propriedade particular 1	19	0	0
	Propriedade particular 2	5	0	0
	Propriedade particular 3	6	1	16,67
	Propriedade particular 4	6	0	0
	Propriedade particular 5	12	0	0
	Propriedade particular 6	5	0	0
	Comércio aviário 1	8	0	0
	Comércio aviário 2	10	0	0
	Comércio aviário 3	13	0	0
	Comércio aviário 4	8	0	0
	Comércio aviário 5	9	0	0
	Comércio aviário 6	4	0	0
	Comércio aviário 7	3	0	0
	Comércio aviário 8	4	0	0
	Comércio aviário 9	4	1	25
	Falcoaria	10	0	0
	Fragmentos florestais	13	0	0

Continua.

Tabela 16: Continuação.

Local		Total de amostras	Nº de amostras positivas (%)	Positividade (%)
Belo Horizonte	Propriedade particular 7	31	0	0
	Propriedade particular 8	30	0	0
	Comércio aviário 10	20	0	0
	Comércio aviário 11	19	0	0
	CETAS/IBAMA	16	0	0
Total		255	2	0,78

5.3.2. Identificação das espécies de *Giardia* spp.

As duas amostras positivas para *Giardia* spp. foram sequenciadas, com sucesso. A análise das sequências do gene SSU rRNA revelou a presença de *G. duodenalis* assemblage A em um Tucano (*Ramphastos toco*) e em uma Galinha (*Gallus gallus domesticus*) (Tabela 17). Não foram observadas infecções mistas na análise das sequências obtidas, sendo que essas exibiram 100% de similaridade com a sequência referência depositada no GenBank (Tabela 17).

Tabela 17: Resultados do sequenciamento das amostras fecais de aves, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014, procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, que foram positivas para *Giardia* spp. pela nested-PCR.

Local		Isolado	Hospedeiro	Resultado BLAST	Sequência referência (similaridade)
Uberlândia	Comércio aviário 9	Giar228UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>G. duodenalis</i> - assemblage A	KF843922 (100%)
	Propriedade particular 3	Giar176UDI	Tucano (<i>Ramphastos toco</i>)	<i>G. duodenalis</i> - assemblage A	KF843922 (100%)

5.4. *Enterocytozoon bienersi*

5.4.1. Positividade de *Enterocytozoon bienersi*

Das 255 amostras coletadas, 27 (10,6%) foram positivas para *E. bienersi* após análise pela nested-PCR (Figura 8 e Tabela 18).

Das aves de Uberlândia (n=139), 15 (10,8%), pertencentes às famílias Phasianidae (*Gallus gallus domesticus* e *Coturnix coturnix*), Numididae (*Numida meleagris*) e Anatidae (*Anser Cygnoides*) foram positivas para o parasito (Tabela 18).

Das aves de Belo Horizonte (n=116), 12 (10,34%) foram positivas e eram pertencentes à família Phasianidae (*Gallus gallus domesticus* e *Phasianus colchicus*) e Columbidae (*Columba livia*) (Tabela 18). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na positividade de *E. bieneusi* entre as aves de Uberlândia e Belo Horizonte ($p=1,0$) (Tabela 19).

Como pode ser observado na tabela 20, a positividade variou de 0 a 80% nos diferentes locais de coletas das amostras fecais.

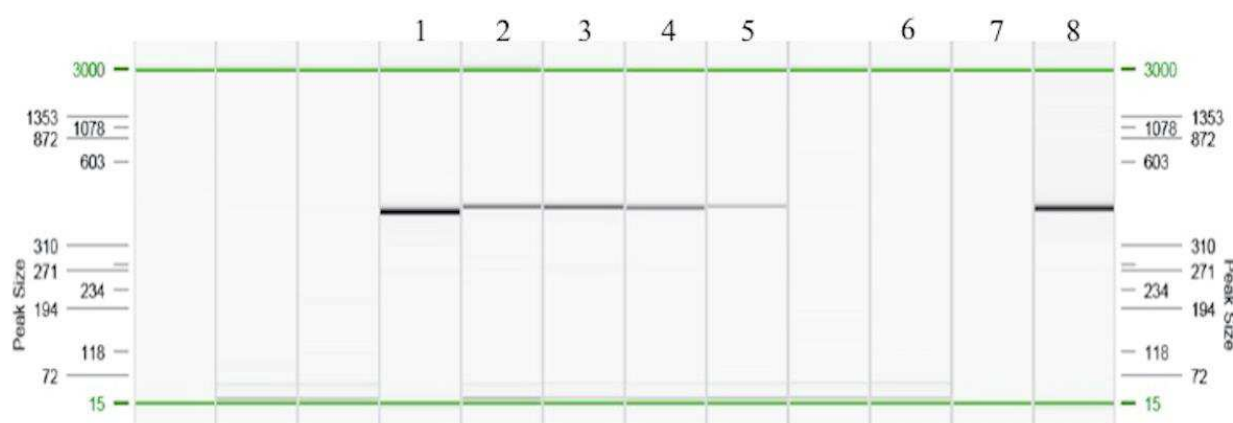


Figura 8: Eletroforese mostrando, aproximadamente, 390 pares pb do gene ITS de *E. bieneusi*, amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014. Linhas 1 a 5: Amostras positivas para *E. bieneusi*; Linha 6: Controle negativo da PCR 1; Linha 7: Controle negativo da PCR 2; Linha 8: Controle positivo (*E. bieneusi* genótipo EbpA).

Tabela 18: Positividade de *E. bieneusi* por espécie aviária, encontrada em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Local	Hospedeiro	Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)
Uberlândia	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	74	12	16,22
	Galinha d'Angola (<i>Numida meleagris</i>)	4	1	25
	Codorna (<i>Coturnix coturnix</i>)	5	1	20
	Ganso-africano (<i>Anser Cygnoides</i>)	3	1	33,33
	25 outras espécies	53	0	0
Belo Horizonte	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	57	9	15,8
	Faisão (<i>Phasianus colchicus</i>)	10	1	10
	Pombo-doméstico (<i>Columba livia</i>)	2	2	100
	23 outras espécies	47	0	0
Total		255	27	10,6

Tabela 19: Comparação entre as positivities de *E. bieneusi* encontradas em amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de Março de 2013 a Julho de 2014.

Local	Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)	p-valor
Uberlândia	139	15	10,8	1,0
Belo Horizonte	116	12	10,34	
Total	255	27	10,6	

Tabela 20: Positividade de *E. bieneusi* em aves por local de coleta nas microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG.

Local		Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)
Uberlândia	Propriedade particular 1	19	1	5,26
	Propriedade particular 2	5	3	60
	Propriedade particular 3	6	0	0
	Propriedade particular 4	6	0	0
	Propriedade particular 5	12	2	16,67
	Propriedade particular 6	5	4	80
	Comércio aviário 1	8	0	0
	Comércio aviário 2	10	3	30
	Comércio aviário 3	13	1	7,7
	Comércio aviário 4	8	0	0
	Comércio aviário 5	9	1	11,11
	Comércio aviário 6	4	0	0
	Comércio aviário 7	3	0	0
	Comércio aviário 8	4	0	0
	Comércio aviário 9	4	0	0
	Falcoaria	10	0	0
	Fragmentos florestais	13	0	0
Belo Horizonte	Propriedade particular 7	31	0	0
	Propriedade particular 8	30	7	23,33
	Comércio aviário 10	20	5	25
	Comércio aviário 11	19	0	0
	CETAS/IBAMA	16	0	0

5.4.2. Identificação dos genótipos de *Enterocytozoon bieneusi*

As 27 amostras positivas para *E. bieneusi* pela nested-PCR foram sequenciadas, com sucesso. A análise das sequências do gene ITS revelou a presença de quatro genótipos diferentes, D, Peru11, Peru6 e TipoIV. O genótipo D foi o mais prevalente (15/27; 55,55%), seguido pelo Peru11 (8/27; 29,63%), Peru6 (3/27; 11,11%) e TipoIV (1/27; 3,7) (Tabela 21). Nenhuma infecção mista foi observada nas sequências obtidas.

O genótipo D foi identificado em oito galinhas (*Gallus gallus domesticus*), uma codorna (*Coturnix coturnix*) e um ganso-africano (*Anser Cygnoides*) de Uberlândia e em cinco galinhas de Belo Horizonte (*Gallus gallus domesticus*) (Tabela 22). A amostra de uma galinha d'Angola (*Numida meleagris*) proveniente de Uberlândia apresentou o genótipo Tipo IV (Tabela 22). O genótipo Peru6 foi observado em um faisão (*Phasianus colchicus*) e em dois Pombos-domésticos (*Columba livia*) de Belo Horizonte (Tabela 22). Por fim, o genótipo Peru11 foi identificado em quatro galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de Uberlândia e em quatro galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de Belo Horizonte (Tabela 22). Todas as sequências obtidas nesse estudo exibiram 100% de similaridade com as sequências referências depositadas no GenBank (Tabela 22).

Tabela 21: Número de amostras positivas e genótipos de *E. bieneusi* encontrados nas fezes de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014.

Local	Nº de amostras positivas	Genótipo (n)
Uberlândia	15	D (10); Peru11 (4), TipoIV (1)
Belo Horizonte	12	D (5); Peru11 (4); Peru6 (3)
Total	27	D (15); Peru11 (8); TipoIV (1); Peru6 (3)

Tabela 22: Resultados do sequenciamento das amostras fecais de aves procedentes das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, coletadas no período de março de 2013 a julho de 2014, que foram positivas para *E. bieneusi* pela nested-PCR.

Local		Isolado	Hospedeiro	Resultado BLAST	Sequência referência (similaridade)
Uberlândia	Propriedade particular 1	Eb48UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
	Propriedade particular 2	Eb91UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
		Eb93UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
		Eb94UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
	Propriedade particular 5	Eb192UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
		Eb193UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
	Propriedade particular 6	Eb221UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Peu11	AY371286 (100%)
		Eb222UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Peu11	AY371286 (100%)
		Eb224UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Peu11	AY371286 (100%)
		Eb225UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Peu11	AY371286 (100%)
	Comércio aviário 2	Eb96UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
		Eb102UDI	Galinha d' Angola (<i>Numida meleagris</i>)	TipoIV	AF242478 (100%)
		Eb98UDI	Ganso-africano (<i>Anser Cygnoides</i>)	D	AF101200 (100%)
	Comércio aviário 3	Eb107UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
	Comércio aviário 5	Eb208UDI	Codorna (<i>Coturnix coturnix</i>)	D	AF101200 (100%)
Belo Horizonte	Propriedade particular 8	Eb230UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
		Eb239UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Peru11	AY371286 (100%)
		Eb243UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Peru11	AY371286 (100%)
		Eb245UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
		Eb249UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
		Eb251UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
		Eb253UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Peru11	AY371286 (100%)
	Comércio aviário 10	Eb54UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Peru11	AY371286 (100%)
		Eb58UDI	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	D	AF101200 (100%)
		Eb63UDI	Faisão (<i>Phasianus colchicus</i>)	Peru6	AY371281 (100%)
		Eb62UDI	Pombo-doméstico (<i>Columba livia</i>)	Peru6	AY371281 (100%)
		Eb67UDI	Pombo-doméstico (<i>Columba livia</i>)	Peru6	AY371281 (100%)

5.5. Sequências depositadas no GenBank

As sequências de *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* e *E. bienersi*, obtidas no presente estudo, foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KT943972 a KT943975 e KY012352 a KY012356. As sequências que ainda não foram depositadas, serão submetidas à medida em que os artigos forem publicados.

Discussão

Cryptosporidium spp., *Giardia* spp., e *Enterocytozoon bieneusi* são parasitos importantes, considerados agentes de infecção em humanos e animais e responsáveis por surtos de gastroenterites transmitidas pela água em todo mundo. (FILIPPICHI et al., 1998; NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009). Esses parasitos possuem grande variedade de reservatórios, podendo estar associados a “habitats” aquáticos e a inúmeras espécies de animais, que propagam e disseminam cistos, oocistos e esporos no meio ambiente, que podem ter potencial zoonótico (GRACZYCK et al., 2008). Vários gêneros e espécies de aves silvestres e domésticas podem eliminar esses patógenos nas fezes, entretanto o papel desses animais na contaminação ambiental não está totalmente esclarecido (GRACZYCK et al., 2008).

As microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, que fizeram parte desse estudo, foram escolhidas por possuírem diversidade de espécies de aves, além de serem consideradas centros com potencial para a avicultura. São grandes pólos econômicos com infraestrutura de qualidade. Entretanto, são áreas que apresentam características geográficas diferentes, o que pode influenciar no comportamento epidemiológico de patógenos. Nesse estudo, ao se comparar os resultados de positividade dos parasitos estudados entre as duas microrregiões, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Ressalta-se que este é o primeiro trabalho em aves que compara a positividade de parasitos de veiculação hídrica e potencial zoonótico entre dois grandes centros. Logo, não se encontra na literatura embasamento científico para explicar o resultado encontrado. Mais estudos epidemiológicos que abordem fatores geográficos são necessários, na tentativa de eluciar os fatores que são importantes para a manutenção e dispersão desses parasitos.

6.1. *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. é parasito reportado em ampla diversidade de hospedeiros aviários no mundo todo (RYAN, 2010; NAKAMURA; MEIRELES, 2015). No Brasil, este protozoário foi identificado em aves domésticas, silvestres (de vida livre e de cativeiro) e exóticas (HUBER et al. 2007; NAKAMURA et al. 2009, 2014; SEVÁ et al. 2011; GOMES et al. 2012; da CUNHA, 2013; HOLSBACK et al. 2013).

A positividade de *Cryptosporidium* spp. encontrada nas aves no presente estudo corrobora com autores de diversos países, incluindo o Brasil que, utilizando ferramentas moleculares, relataram positivities entre 0,7 e 16,13% (SOLTANE et al., 2007;

NAKAMURA et al., 2009; PLUTZER; TOMOR, 2009; WANG et al., 2010; SEVÁ et al., 2011; BERRILI et al., 2012; GOMES et al., 2012; WANG et al., 2012; HOSLBACK et al., 2013; HAMIDINEJAT et al. 2014., NAKAMURA et al., 2014; WANG et al., 2014a; CANO et al., 2016; LI et al., 2016). Entretanto, os resultados encontrados foram consideravelmente menores do que os trabalhos de Kuhn et al. (2002); Gharagozlou et al. (2006); Oliveira et al. (2008) e Baroudi et al. (2013), os quais encontraram positividade entre 27,5 e 49%, utilizando técnicas moleculares e microscópicas. A diferença nos resultados entre esses trabalhos e o presente estudo, pode estar relacionada ao habitat das aves, pois, nas pesquisas citadas, as coletas foram realizadas somente em aves domésticas e aquáticas. O contato próximo das aves domésticas com outros animais domésticos e das aves aquáticas com fontes de água contaminadas, provavelmente, contribuiu para a alta positividade de *Cryptosporidium* spp. nesses trabalhos.

Nesse estudo, a caracterização molecular identificou duas espécies e um genótipo de *Cryptosporidium*, no qual *C. meleagridis* prevaleceu, seguido de *C. baileyi* e genótipo de pato. Os achados desse estudo apresentaram-se diferentes da literatura, pois autores como Plutzer; Karanis (2009), Fayer (2010) e Ryan (2010) encontraram *C. baileyi* como a espécie mais prevalente em aves.

C. meleagridis possui diversidade de hospedeiros aviários, com relatos nas ordens Columbiformes, Galliformes, Passeriformes e Psittaciformes (NAKAMURA; MEIRELES, 2015). De acordo com Nakamura e Meireles (2015), essa espécie de parasito ocorre, preferencialmente, nas aves da ordem Galliformes, corroborando com o presente estudo que encontrou *C. meleagridis* em galinhas, Peru e codorna. Esse protozoário também foi reportado em Galliformes da China, Argélia, Costa do Marfim, Tunísia, Iran e Peru (GHARAGOZLOU et al., 2006; SOLTANE et al., 2007; WANG et al., 2010; WANG et al., 2012; BAROUDI et al., 2013; BERRILI et al., 2013; WANG et al., 2014a,b). No Brasil, estudo relataram *C. meleagridis* em galinhas e aves silvestres (HUBER et al., 2007; NAKAMURA et al., 2009; da CUNHA, 2013).

O encontro de *C. meleagridis* em aves domésticas nesse trabalho, pode representar risco à saúde pública, pois, além das aves, esta espécie foi identificada no homem e em diversos mamíferos, estando associada a manifestações gastrointestinais em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (FAYER, 2010; CHAPPELL et al., 2011). De acordo com Ryan (2010), *C. meleagridis* é patógeno humano emergente, sendo a terceira espécie de *Cryptosporidium* mais comum no homem

(XIAO; FAYER, 2008). Em alguns países como Peru e Tailândia, *C. meleagridis* é responsável por 10 a 20% das infecções por *Cryptosporidium*, com frequência similar àquelas infecções causadas por *C. parvum* (XIAO; FENG, 2008; CHALMERS; GILES, 2010; ELWIN et al., 2012; INSULANDER et al., 2013). No Brasil, essa espécie foi relatada em indivíduos HIV positivos do estado de São Paulo (ARAÚJO et al., 2008).

Ao contrário de *C. meleagridis*, *C. baileyi* tem especificidade por hospedeiros aviários, sendo relatada em 12 ordens aviárias (Anseriformes, Cathartiformes, Charadriiformes, Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Passeriformes, Piciformes, Psittaciformes, Strigiformes e Struthioniformes), ocorrendo, preferencialmente, nas da ordem Galliformes (NAKAMURA; MEIRELES, 2015). Está frequentemente associado à criptosporidiose respiratória, com alta morbidade e mortalidade em aves, especialmente em frangos de corte (SRÉTER; VARGA, 2000).

Neste estudo, *C. baileyi* foi observado em aves domésticas da ordem Galliformes (galinhas e codorna) e em uma ave aquática da ordem Anseriformes (ganso-africano). Casos de infecção de aves domésticas e aquáticas por *C. baileyi* são bem documentados, sendo relatadas ocorrências em várias localidades, incluindo Brasil. (HUBER et al., 2007; CARDOZO et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009; NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

Nesse trabalho, também foi identificado o genótipo de pato em um marreco-mandarim. Esse genótipo foi primeiramente descrito por Morgan et al. (2001), em fezes de pato-preto. Posteriormente, foi relatado em dois estudos nos Estados Unidos (JELLISON et al. 2004; ZHOU et al. 2004). Não existe na literatura a descrição desse genótipo na América do Sul, sendo esse estudo, o primeiro relato.

A subtipagem do gene gp60 é ferramenta usada em estudos de transmissão das espécies de *Cryptosporidium*, para identificar diferenças geográficas e temporais na distribuição dos subtipos desse parasito em humanos e em outros animais. É utilizada para as espécies *C. parvum* e *C. hominis*, mostrando variações significantes nos sinais clínicos e nas virulências entre as famílias dos subtipos (CAMA et al., 2007, 2008). Para *C. meleagridis*, entretanto, o uso é limitado. Das três famílias identificadas nesse estudo (IIIa, IIIb e IIIg), a mais prevalente foi a IIIg, observada em galinhas. Esse resultado é semelhante ao de Baroudi et al. (2013) na Argélia. Essa família também foi identificada em humanos e em aves domésticas na Suécia (STENSVOLD et al., 2014).

Dos subtipos observados dentro da família IIIg desse trabalho, dois são novos achados (IIIgA25G3R1 e IIIgA21G3R1) e dois foram anteriormente reportados,

IIIgA24G2R1 em galinha da Argélia (JX878610) e IIIgA22G3R1 em ser humano do Nepal (KU852730), indicando uma possível potencial zoonótico desse subtipo (BAROUDI et al. 2013; BESER et al., 2016).

Subtipos da família IIIb foram relatados em vários países do mundo em humanos e perus (STENSVOLD et al., 2014). No presente trabalho, foram identificados dois subtipos dessa família, IIIbA24G1R1 em galinha e IIIbA23G1R1 em codorna, ambos anteriormente relatados em seres humanos da China (KU852729), Peru (KF733818), Indonésia (KJ210606) e Tailândia (KJ210609) (STENSVOLD et al., 2014; WANG et al., 2014b; BESER et al., 2016).

Dentre as famílias de *C. meleagridis*, a IIIa é a menos encontrada, com relatos em seres humanos da Jordânia e do Quênia e em Peru dos Estados Unidos (GLABERMAN et al., 2001; HIJAWI et al., 2010). Nas amostras dessa pesquisa, foi identificado um novo subtipo dessa família em uma amostra de Peru.

Como os estudos de subtipagem de *C. meleagridis* ainda são escassos, não é possível determinar se os novos subtipos das famílias IIIa e IIIg, encontrados nesse trabalho, são restritos ao Brasil. Mais estudos de subtipagem são necessários para o melhor entendimento da especificidade de hospedeiros e da dinâmica de transmissão de *C. meleagridis*.

6.2. *Giardia* spp.

Embora *Giardia* spp. seja amplamente documentada em mamíferos de vários países do mundo, existe um número limitado de trabalhos com esse parasito em aves silvestres e domésticas de diferentes ordens (PAPINI et al. 2012; REBOREDO-FERNÁNDEZ et al. 2015; CANO et al. 2016). No Brasil, esse protozoário foi observado em 3,1% de aves silvestres provenientes de Minas Gerais, entretanto, o presente trabalho constitui o primeiro relato de *Giardia* spp. em uma ave da ordem Piciforme (da CUNHA, 2013).

A positividade de *Giardia* spp. encontrada em aves nesse estudo (0,78%) foi similar às positivities reportadas em aves de cativeiros provenientes de pet shops (1,6%) e zoológicos (3,6%) na Itália e em aves silvestres da Espanha (2,1%) (PAPINI et al. 2012; REBOREDO-FERNÁNDEZ et al. 2015). Porém, alguns estudos de diagnóstico e caracterização molecular documentaram positivities maiores que a desse trabalho. Berrili et al. (2012) identificaram, na Costa do Marfim, 58% de galinhas

parasitadas e, na Hungria, Plutzer e Tomor (2009) relataram 24% de aves aquáticas infectadas. As diferenças entre os resultados podem estar relacionadas a fatores como número amostral, manejo das aves, método de diagnóstico e localização geográfica.

Pela caracterização molecular, *G. duodenalis* foi a espécie presente em um tucano (de cativeiro) e em uma galinha. De acordo com Feng e Xiao (2011), *G. duodenalis* é considerada multiespécie complexa devido à presença de diversos genótipos e subgenótipos, que podem ser zoonóticos ou hospedeiro-específico. Entre os genótipos de *G. duodenalis*, as assemblages A e B são aquelas de menor especificidade de hospedeiro (CACCIÓ; RYAN, 2008). Essas são encontradas em humanos e em outros vertebrados, incluindo as aves, portanto, são consideradas de potencial zoonótico (CACCIÓ; RYAN, 2008). Nesta pesquisa, as duas amostras sequenciadas foram caracterizadas como assemblage A, a qual foi documentada em aves silvestres, domésticas e de cativeiro procedentes da Espanha, Costa do Marfim e Itália (BERRILI et al., 2012; PAPINI et al. 2012; REBOREDO-FERNÁNDEZ et al. 2015). Outras assemblages de *G. duodenalis*, como assemblage B, D e F foram identificadas em aves silvestres do Brasil, em aves silvestres e aquáticas da Espanha e em aves domésticas da Costa do Marfim (BERRILI et al., 2012; da CUNHA, 2013; REBOREDO-FERNÁNDEZ et al. 2015; CANO et al. 2016).

6.3. *Enterocytozoon bieneusi*

E. bieneusi é considerado patógeno entérico emergente em vários hospedeiros vertebrados, entretanto informações desse parasito em aves são escassas (LI et al., 2014). Esse parasito já foi reportado nas ordens Galliformes, Columbiformes, Passeriformes, Psittaciformes, Struthioniformes e Falconiformes provenientes de Abu Dhabi, Iran, China, Peru, República Checa, Alemanha, Portugal e Espanha (SANTIN, 2015). No Brasil, foi identificado em pombos e em aves exóticas do estado de São Paulo (LALLO et al., 2012).

A positividade observada nas aves desse trabalho corrobora com os achados de autores de várias localidades do mundo que, utilizando ferramentas moleculares, encontraram positivities variando de 1,4 a 49% em aves domésticas, exóticas e de cativeiro (HARO et al. 2005; LOBO et al., 2006; BART et al., 2008; KASICHOVÁ et al., 2009; LALLO et al., 2012; LI et al., 2014; PIRESTANI et al., 2013; STODKOWICZ-KOWALSKA et al., 2013; ZAO et al., 2016). A diferença nos

resultados de positividade entre os estudos pode ser atribuída, principalmente, ao habitat das aves investigadas. Analisando a literatura, observa-se que as positivities de *E. bieneusi* menores, normalmente estão relacionadas a aves silvestres e exóticas e as mais altas a aves domésticas (SANTÍN, 2015; da CUNHA et al., 2016b). Isso, provavelmente ocorre pelo fato das aves domésticas estarem em maior contato com outros animais e por viverem aglomeradas.

Esse trabalho constitui o primeiro relato de *E. bieneusi* em aves domésticas (galinha, galinha d'Angola, codorna e faisão) e em aves da ordem Anseriformes (ganso-africano) no Brasil. Em aves domésticas, existem três estudos na Alemanha, Peru e China que reportaram a presença de *E. bieneusi* em galinhas (REETZET al., 2002; FENG et al., 2011; LI et al., 2014). Em relação à galinha d'Angola, codorna e faisão, não existem relatos prévios de *E. bieneusi* nessas aves. Na ordem Anseriformes, além do presente estudo, há apenas um relato de *E. bieneusi* em gansos-domésticos e patos-domésticos na China (ZHAO et al., 2016).

E. bieneusi é comumente detectado em pombos com registros no Brasil, China, Irã, Holanda, Espanha, Polônia e Portugal (HARO et al. 2006; LOBO et al. 2006; BART et al. 2008; LALLO et al. 2012; PIRESTANI et al. 2013; STODKOWICZ-KOWALSKA et al. 2013; ZHAO et al. 2016). O achado desse parasito em pombos do presente estudo corroboram com os resultados da literatura. De acordo com Haro et al. (2005), pombos possuem contato próximo com crianças e idosos em parques urbanos e, portanto, devem ser estudados a fim de se estabelecer o papel desses animais como carreadores de parasitos oportunistas e potencialmente zoonóticos.

A análise das sequências de nucleotídeos da região ITS de *E. bieneusi* revelou a presença de quatro genótipos, D, TipoIV, Peru6 e Peru11, todos anteriormente relatados no homem e em outros mamíferos, em diferentes localidades. De acordo com Santín (2015), os genótipos D e TipoIV de *E. bieneusi* são frequentemente diagnosticados em humanos, com relatos na América do Norte, América do Sul, África, Europa e Ásia.

O genótipo D apresenta ampla diversidade de hospedeiros, incluindo humanos, aves (pombos e falcões), primatas não-humanos, suínos, bovinos, cães, gatos, equinos, coelhos e roedores (SANTÍN 2015). Na América do Sul, foi reportado em humanos no Brasil e no Peru, em bovinos na Argentina e no Brasil e em equinos na Colômbia (SULAIMAN et al., 2003; BERN et al., 2005; CAMA et al., 2007; SANTIN et al., 2010; FENG et al., 2011; del COCO et al., 2014; da SILVA FIUZA et al., 2016). O

encontro desse genótipo em aves do presente estudo representa o primeiro relato do genótipo D em galinhas, codorna e ganso-africano.

O genótipo TipoIV também possui grande variedade de hospedeiros, incluindo o homem e outros animais (GALVÁN-DÍAZ et al., 2014; SANTÍN, 2015). Os achados desse estudo representam o primeiro relato do genótipoIV em uma ave da ordem Galliforme.

Os genótipos Peru6 e Peru 11, são mais restritos em relação ao hospedeiro e localização geográfica. Peru6 foi identificado em humanos do Peru e Portugal, em cães de Portugal, bovinos dos Estados Unidos e pombos e periquitos de Portugal (SANTÍN, 2015). Peru11 foi detectado em humanos na China, Peru e Tailândia, primatas no Quênia e China e em animais silvestres dos Estados Unidos (SANTÍN, 2015). O presente estudo representa o primeiro relato de Peru6 em ave da ordem Galliformes e de Peru11 em um hospedeiro aviário.

4.0. Importância das aves na transmissão dos patógenos

Cryptosporidium spp., *Giardia* spp. e *E. bienersi* são patógenos humanos de caráter zoonótico que influenciam, consideravelmente, na morbidade de indivíduos saudáveis e na mortalidade de indivíduos imunocomprometidos (GRACZYC et al., 2008). Vários estudos indicam o envolvimento de fontes de água na epidemiologia desses parasitos (GRACZYC et al., 2008). Em ambientes aquáticos, oocistos, cistos e esporos se mantêm infectantes por longos períodos de tempo (BERRILLI et al., 2012). Além disso, o pequeno tamanho e a resistência aos padrões normais de desinfecção por cloro, facilitam a transmissão por via hídrica (BERRILLI et al., 2012).

Existem muitas fontes de contaminação ambiental de habitats aquáticos por esses parasitos. Vários animais podem eliminar oocistos, cistos e esporos nas fezes e passá-los mecanicamente para fontes de água (GRACZYC et al., 1998; ZHOU et al., 2004). Nesse sentido, as aves aquáticas assumem importante papel na cadeia de transmissão desses patógenos, pois tem contato direto com águas possivelmente contaminadas, e pela capacidade de dispersar os parasitos durante o processo migratório. O encontro de *Cryptosporidium* spp. em aves aquáticas desse estudo corrobora com trabalhos desenvolvidos no Brasil, Espanha, Turquia e Estados Unidos que identificaram aves da ordem Anseriformes infectadas por esse protozoário. (GRACZYK et al., 1998; KUHN et al., 2002; ZHOU et al., 2004; CHVALA et al.,

2006; HUBER et al., 2007; PLUTZER; TOMOR, 2009; CANO et al., 2016) Entretanto, deve-se ressaltar que o presente estudo configura o primeiro relato de *E. bieneusi* em aves aquáticas.

Estudos de epidemiologia molecular envolvendo populações humanas e animais vivendo em contato próximo, tem demonstrado a importância dos animais domésticos, incluindo as aves, na transmissão de patógenos zoonóticos para o ser humano. Berrilli et al. (2012), identificaram alta positividade da espécie zoonótica, *C. meleagridis*, em humanos e galinhas que transitavam livremente em uma comunidade carente da Costa do Marfim. Estudo realizado por Mahmud et al. (1995) no Egito, detectou aumento no risco de infecção por *Giardia* em crianças que conviviam com galinhas. No presente trabalho, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi* foram detectados em aves domésticas da ordem Galliformes (galinhas, galinhas d'Angola, codorna, faisão e codorna). Esses resultados se assemelham a de outros autores que detectaram esses parasitos em aves domésticas de diversos países (REETZ et al., 2002; GHARAGOZLOU et al., 2006; SOLTANE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; McEVOY et al. 2009; WANG et al., 2010; BERRILLI et al., 2012; WANG et al., 2012; BAROUDI et al., 2013; BERRILI et al., 2013; HAMIDINEJAT et al. 2014; LI et al., 2014; WANG et al., 2014a,b; ZAO et al., 2016).

As aves aquáticas e domésticas do presente estudo foram criadas em pequenas propriedades urbanas ou rurais para consumo próprio ou venda em pequenos comércios informais. A maioria das aves eram criadas soltas, transitando livremente pelas propriedades e, assim, tinham contato próximo com os seres humanos e outros animais, como bovinos, suínos e cães. Três galinhas positivas para *E. bieneusi* eram criadas presas em recintos de alvenaria e não conviviam com outros animais, porém tinham contato frequente com os cuidadores que higienizavam os recintos. Algumas propriedades eram localizadas próximas a cursos d'água onde os animais podiam beber água e defecar, aumentando o risco de contaminação ambiental e disseminação dos parasitos. Os resultados do presente trabalho demonstraram que espécies e genótipos zoonóticos de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi* estão presentes em aves aquáticas e domésticas no Brasil, ressaltando o importante papel desses animais como fonte de infecção para o homem e de contaminação ambiental.

Aves exóticas e silvestres de cativeiro também tem sido identificadas como fontes de infecção de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi* (XIAO et al., 2015). Aves mantidas em cativeiro estão em contato próximo ao homem, pois devem

ser periodicamente manipuladas para alimentação e higienização dos recintos. Essas atividades podem expor os cuidadores à infecção por parasitos zoonóticos. Fezes sem o devido tratamento e descarte podem contaminar fontes de água, solo ou alimentos e, assim, contribuir, indiretamente, com a transmissão desses patógenos. No presente estudo, genótipo zoonótico de *G. duodenalis* e *E. bieneusi*, foram detectados em ave silvestre (tucano) e em aves exóticas (pombos-domésticos), respectivamente, mantidas em cativeiro. Esses achados corroboram com diversos autores do mundo, incluindo Brasil, que identificaram aves silvestres e exóticas mantidas em cativeiro infectadas por patógenos considerados humanos (LOBO et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; KASICKOVÁ et al., 2009; da SILVA et al., 2009; GOMES et al., 2012; LALLO et al., 2012; PAPINI et al., 2012; PIRESTANI et al., 2013; NAKAMURA et al., 2014; REBOREDO-FERNANDEZ et al., 2015; LI et al., 2016; ZHAO et al., 2016). Apesar das aves cativas poderem ser importantes carreadoras de diversos parasitos patogênicos, a positividade encontrada, de modo geral, é baixa, pois a maioria desses animais vivem em recintos cujas condições de alimentação, água e higiene são controladas, diminuindo, assim, o risco de infecções.

Nesse estudo, as amostras fecais dos animais dos fragmentos florestais e da falcoaria provenientes da microrregião de Uberlândia e do CETAS/IBAMA de Belo Horizonte, não foram positivas para nenhum dos parasitos analisados. Majewska et al. (2009) comentaram que aves de vida livre são suscetíveis à infecções parasitárias, pois estão em constante contato com diferentes ambientes, cujas condições podem não ser ideais. Entretanto, as aves de vida livre capturadas nos fragmentos florestais do presente estudo não estavam infectadas por nenhum dos três parasitos estudados. Alguns fatores podem ser atribuídos a essa diferença de resultados como número amostral e localização geográfica. As aves da falcoaria apesar de serem mantidas em cativeiro, são soltas regularmente para caça, se tornando suscetíveis à infecções em ambientes contaminados. Porém, ao primeiro sinal de doença, os animais são tratados. As aves do CETAS/IBAMA, assim que chegam ao local são tratadas com antiparasitário e mantidas em recintos periodicamente higienizados, vivendo em condições ideais, o que pode ter contribuído para a ausência de parasitos nas amostras analisadas.

Esse trabalho confirmou a presença de espécies/genótipos zoonóticos de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi* em diferentes aves das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, sugerindo importante participação desses animais na transmissão de patógenos para o homem e outros animais. O contato próximo entre aves

(aquáticas, domésticas e cativas) e o homem, inevitavelmente, continuará resultando em impactos negativos para a saúde pública e para a qualidade de fontes de água e alimentos. Dessa forma, faz-se necessário a introdução de testes específicos de análise da água para a presença de parasitos zoonóticos. Além disso, mais estudos epidemiológicos que busquem compreender o papel das aves na contaminação ambiental por parasitos zoonóticos são imprescindíveis. Estudos nesse sentido serão fundamentais para a elaboração de estratégias de benfeitorias na saúde pública, de planos de manejos adequados que vizem a redução de perdas econômicas na indústria avícola e para a conservação e manutenção das espécies aviárias.

Conclusões

- *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi* estão presentes em aves das microrregiões de Uberlândia e/ou Belo Horizonte.
- Dos três parasitos estudados, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. apresentaram a maior e menor positividade, respectivamente.
- Não foi observada diferença significativa na positividade de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bieneusi* entre aves das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG.
- Foram identificadas as espécies *C. baileyi*, *C. meleagridis* e genótipo de pato, sendo *C. meleagridis* a espécie mais prevalente.
- Infecção mista foi identificada em uma amostra positiva para *Cryptosporidium* spp.
- A subtipagem de *C. meleagridis* detectou a presença de três famílias, IIIa, IIIb e IIIg, sendo a família IIIg a mais prevalente.
- *G. duodenalis* foi a única espécie de *Giardia* identificada e a assemblage presente foi a A.
- Esse trabalho constitui o primeiro relato de *Giardia* spp. em ave da ordem Piciforme.
- Quatro genótipos de *E. bieneusi* foram reportados, D, TipoIV, Peru6 e Peru11, sendo o genótipo D o mais prevalente.
- Esse é o primeiro relato de *E. bieneusi* em aves domésticas (galinha, galinha d'Angola, codorna e faisão) e em aves da ordem Anseriformes (ganso-africano) do Brasil.
- O encontro de espécies/genótipos zoonóticos de *Cryptosporidium*, *Giardia* e *E. bieneusi* em aves aquáticas, domésticas e cativas pode ter implicações na transmissão desses parasitos para o homem e outros animais.

Referências bibliográficas

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.3, p.447-75, 2001.

AKINBO, F.O.; OKAKA, C.E.; OMOREGIE, R.; DEAREN, T.; LEON, E.T.; XIAO, L. Molecular epidemiologic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV-infected persons in Benin City, Nigeria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, n.3, p.441-445, 2012.

AKIYOSHI, E.E.; MORRISON, H.G.; LEI, S.; FENG, X.; ZHANG, Q.; CORRADI, N.; MAVANIA, H.; TUMWINE, J.K.; KEELING, P.J.; WEISS, L.M.; TZIPIRI, S. Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. **PLoS Pathogens**, v.5, e1000261, 2009.

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

ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M.I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M.J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁZQUEZ, 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.

APPELBEE, A.J.; FREDERICK, L.M.; HEITMAN, T.L.; OLSON, M.E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, v.112, p.289-294, 2003.

ARAÚJO, G.M.; NUNES, J.J.; ROSA, A.G.; RESENDE, E.J. Estrutura comunitária de vinte áreas de cerrado residuais no município de Uberlândia, MG. **Daphne**, v.7, n.2, p.7-14, 1997.

ARAÚJO, A.J.; KANAMURA, H.Y.; ALMEIDA, M.E.; GOMES, A.H.; PINTO, T.H.; da 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.

AVICULTURA INDUSTRIAL. 2016. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br>. Acesso em 01/12/2016.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. **Water Research**, v.45, p.6603-6614, 2011.

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

BARR, S.C.; BOWMAN, D.D.; HELLER, R.L. Efficacy of fenbendazole against giardiasis in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, p.988-990, 1994.

BART, A.; WENTINK-BONNEMA, E.M.; HEDDEMA, E.R.; BUIJIS, J.; VAN GOOL, T. Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in Amsterdam, the Netherlands. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.7056-7058, 2008.

BERKMAN, D.S.; LESCANO, A.G.; GILMAN, R.H.; LOPEZ, S.L.; BLACK, M.M. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. **The Lancet**, v.359, p.564-571, 2002.

BERN, C.; BERN, C.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; RABKE-VERANI, J.; WILLIAMSON, J.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; VIVAR, A.; TICONA, E.; NAVINCOPA, M.; CAMA, V.; MOURA, H.; SECOR, W.; VISVESVARA, G.; GILMAN, R.H. The epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, v.191, p.1658-1664, 2005.

BERRILLI, F.; D'ALFONSO, R.; GIANGASPERO, A.; MARANGI, M.; BRANDONISIO, O.; KABORÉ, Y.; GLÉ, C.; CIANFANELLI, C.; LAURO, R.; Di CAVE, D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p.191-195, 2012.

BRANTLEY, R.K.; WILLIAMS, K.R.; SILVA, T.M.J.; SISTROM, M.; THIELMAN, N.M.; WARD, H.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. AIDS-associated diarrhea and wasting in Northeast Brazil is associated with subtherapeutic plasma levels of antiretroviral medications and with blood bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, p.16-22, 2003.

BUCKHOLT, M.A.; LEE, J.H.; TZIPORI, S. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2595-2599, 2002.

BUDU-AMOAKO, E.; GREENWOOD, S.J.; DIXON, B.R.; BARKEMA, H.W.; McCLURE, J.T. Foodborne illness associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* from livestock. **Journal of Food Protection**, v.74, p.1944-1955, 2011.

BURET, A.; GALL, D.G.; OLSON, M.E. Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. **Parasitology Research**, v.77, p.109-114, 1991.

CACCIÒ, S.M., de GIACOMO, M., POZIO, E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1023-1030, 2002.

CACCIÒ, S.M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.160, p.75 -80, 2008.

CACCIÒ, S.M.; SPRONG, H. Epidemiology of giardiasis in humans. In: LUJAN, H.D.; SVARD, S. (Eds.). **Giardia: A model organismo**. Wien: Springer, 2011. p.16-28.

CACCIÒ, S.M.; LALLE, M. *Giardia*. In: XIAO, L.; RYAN, U.; FAYER, Y. (Eds.). **Biology of Foodborne Parasites**. Boca Raton (FL): CRC Press, 2015. p.149–174.

CAMA, V.A.; PEARSON, J.; CABRERA, L.; PACHECO, L.; GILMAR, R.; MEYER, S.; ORTEGA, Y.; XIAO, L. Transmission of *Enterocytozoon bienersi* between a child and guinea pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2780-2710, 2007.

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 journal*, v.14, p.1567-1574, 2008.

CANO, L.; DE LUCIO, A.; BAILO, B.; CARDONA, G.A.; MUADICA, A.S.; LOBO, L.; CARMENA, D. Identification and genotyping of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. isolates in aquatic birds in the Salburua wetlands, Álava, Northern Spain. **Veterinary Parasitology**, v.221, p.144-148, 2016.

CAPELLA-GUTIERREZ, S.; MARCET-HOUBEN, M.; GABALDON, T. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. **BMC Biology**, v. 10, p.47, 2012.

CARDOZO, S.V.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W. Evaluation of different diagnostic techniques for oocysts of *Cryptosporidium baileyi* in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) fecal samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p.351-353, 2008.

CHALMERS, R.M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK - challenges for control. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1487-1497, 2010.

CHAPPELL, C.L.; OKHUYSSEN, P.C.; LANGER-CURRY, R.C.; AKIYOSHI, D.E.; WIDMER, G.; TZIPORI, S. *Cryptosporidium meleagridis*: Infectivity in Healthy Adult Volunteers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, n.2, p.238-242, 2011.

CHELLADURAI, J.J.; CLARK, M.E.; KVÁČ, M.; HOLUBOVÁ, N.; KHAN, E.; STENGER, B.L.; GIDDINGS, C.W.; MCEVOY, J. *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). **Parasitology Research**, v.115, p.1901-1906, 2016.

CHVALA, S.; FRAGNER, K.; HACKL, R.; HESS, M.; WEISSENBOCK, H. *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser* f. domestica) detected by in-situ hybridization. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, p.211-218, 2006.

del COCO, V.F.; CÓRDOBA, M.A.; BILBAO, G.; de ALMEIDA, CASTRO, P.; BASUALDO, J.A.; SANTÍN, M. First report of *Enterocytozoon bieneusi* from dairy cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.199, p.112-115, 2014.

da CUNHA, M.J.R. **Ocorrência e identificação molecular de *cryptosporidium* spp. e *giardia* spp. em aves silvestres brasileiras**. 2013. 84f. Dissertação (mestrado em Parasitologia e imunologia aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2013.

da CUNHA, M.J.R.; CURY, M.C.; SANTÍN, M. Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds. **Parasitology Research**, v.116, p.487-493, 2016a.

da CUNHA, M.J.R.; CURY, M.C.; SANTIN, M. Widespread presence of human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in chickens. **Veterinary Parasitology**, v.217, p.108-112, 2016b.

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

DECRAENE, V.; LEBBAD, M.; BOTERO-KLEIVEN, S.; GUSTAVSSON, A.M.; LÖFDAHL, M. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. **Epidemiology and Infection**, v.140, p.519–527, 2012.

DIDIER, E.S.; STOVALL, M.E.; GREEN, L.C.; BRINDLEY, P.J.; SESTAK, K.; DIDIER, P.J. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.145-166, 2004.

ELEGIO-GARCIA, L.; CORTES-CAMPOS, A.; CARDOSO-JIMENES, E.; Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. **Parasitology Research**, Dusseldorf, v.97, p.1-6, 2005.

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

ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J. SEM evidence for a new species, *Giardia psitacci*. **Journal of Parasitology**, v.73, p.623-629, 1987.

ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J.; WELLIS, C.L.; FEELY, D.E.; KNUDSEN, L.; CAMPBELL, S.R.; van KEULEN, H.; JARROLL, E.L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). **Journal of Parasitology**, v.76, n.5, p.717-724, 1990.

ERLANDSEN, S.L.; WEISBROD, A.R.; KNUDSON, L.W.; OLEREICH, R.; DODGE, W.E.; JAKUBOWSKI, W.; BEMRICK, W.J. Giardiasis in wild and captive bird populations: High prevalence in herons and budgerigars. **International Journal of Environmental Health Research**, v.1, n.3 p.132–143, 1991.

ESPERN, A.; MORIO, F.; MIEGEVILLE, M.; ILLA, H.; ABDOULAYE, M.; MEYSSONNIER, V.; ADEHOSSI, E.; LEJEUNE, A.; CAM, P.D.; BESSE, B.; GAY-ANDRIEU, F. Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2999-3002, 2007.

FARTHING, M.J.G. Giardiasis. Parasitic Diseases of the liver and intestines. **Gastroenterology Clinics of North America**, Oxford, v.25, n.3 p.493-515, 1996.

FARTHING, M.J.G. The molecular pathogenesis of giardiasis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.24, p.79-88, 1997.

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.35-54, 2000.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoan and helminths in feces. **Journal of Parasitology**, v. 25, p.241-262, 1939.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.12-13, 2000.

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

FAYER, R. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.37-56, 2004.

FAYER, R., SANTÍN, M., XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicom-plexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Journal of Parasitol.**, v.91, p.624–629, 2005.

FAYER, R. General biology. In.: FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporium* and Criptosporidiosis. New York, **CRC Press**, p.1-42, 2008.

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

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

FENG, Y.; LI, N.; DEAREN, T.; LOBO, M.L.; MATOS, O.; CAMA, V.; XIAO, L. Development of a multilocus sequence typing tool for high-resolution genotyping of *Enterocytozoon bienersi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.4822-4828, 2011.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.1, p.110-40, 2011.

FILIPPICH, L.J.; McDONNELL, P.A.; MUNOZ, E.; UPCROFT, J.A. *Giardia* infection in budgerigars. **Australian Veterinary Journal**, v.76, n.4, 1998.

FISCHER, W.M.; PALMER, J.D. Evidence from small-subunit ribosomal RNA sequences for a fungal origin of Microsporidia. **Molecular, Phylogenetics and Evolution**, v.36, p.602-622, 2005.

FORSHAW, D.; PALMER, D.G.; HALSE, S.A.; HOPKINS, R.M.; THOMPSON, R.C. *Giardia* in straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. **The Veterinary Record**, v.131, p.267-268, 1992.

FRANSSEN, F.F.J.; HOOIMEIJER, J.; BLANKESTAIN, B.; HOUWERS, D.J. Giardiasis in a White Stork in the Netherlands, **Journal of wildlife diseases**, v.36, n.4, p.764-766, 2000.

GALVÁN, A.L.; MAGNET, A.; IZQUIERDO, F.; FENOY, S.; RUEDA, C.; FERNÁNDEZ-VADILLO, C.; HENRIQUES-GIL, N.; del AGUILA, C. Molecular characterization of human-pathogenic microsporidia and *Cyclospora cayetanensis* isolated from various water sources in Spain: a year-long longitudinal study. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.2, p.449-459, 2013.

GALVAN-DÍAZ, A.L.; MAGNET, A.; FENOY, S.; HENRIQUES-GIL, N.; HARO, M.; GORDO, F.P.; MILLÁN, J.; MIRÓ, J.; del ÁGUILA, C.; IZQUIERDO, F. Microsporidia detection and genotyping study of human pathogenic *E. bienersi* in animals from Spain. **Plos One**, v.9, p.e92289, 2014.

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

GLABERMAN, S.; SULAIMAN, I.M.; BERN, C.; LIMOR, J.; PENG, M.M.; MORGAN, U.; GILMAN, R.; LAL, A.A.; XIAO, L. A multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium meleagridis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. Suppl 19S–22S, 2001.

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

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

GRACZYK, T.K.; FAYER, R.; TROUT, J.M.; LEWIS, E.J.; FARLEY, C.A.; SULAIMAN, I.; LAL, A.A. *Giardia* sp. 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., MAJEWSKA, A.C., SCHWAB, K.J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. **Trends in Parasitology**, v.24, n.2, p.55-59, 2008.

GUO, Y.; ALDERISIO, K.A.; YANG, W.; CAMA, V.; FENG, Y.; XIAO, L. Host specificity and source of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in a drinking source watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.1, p.218-225, 2014.

HAMIDINEJAT, H.; JALALI, M.H.; JAFARI, R.A.; NOURMOHAMMADI, K. Molecular determination and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in fecal and respiratory samples of industrial poultry in Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, p.517-520, 2014.

HARO, M.; IZQUIERDO, F.; HENRIQUES-GIL, N.; ANDRES, I.; ALONSO, F.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.3153–3157, 2005.

HARO, M.; HENRIQUES-GIL, N.; FENOY, S.; IZQUIERDO, F.; ALONSO, F.; DEL AGUILA, C. Detection and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in pigeons. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.53, p.S58–S60, 2006.

HEGNER, R.W. A comparative study of *Giardia* living in man, rabbit and dog. **American Journal of Epidemiology**, v.2, p.442-454, 1922.

HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.22, p.594-596, 1981.

HIJJAWI, N.; NG, J.; YANG, R.; ATOUM, M.F.; RYAN, U. Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. **Experimental Parasitology**, v.125, p.161–164, 2010.

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

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

HOPKINS, R.M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M.; WETHERALL, J.D.; REYNOLDSON, J.A. Thompson, R.C. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal of Parasitology**, v.83, p.44-51, 1997.

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

HUNTER, P.R.; NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.145-154, 2002.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 01/12/2016.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 01/12/2016.

INSULANDER, M.; SILVERLÅS, C.; LEBBAD, M.; KARLSSON, L.; MATTSSON, J.G.; SVENUNGSSON, B. Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. **Epidemiology and Infection**, v.141, p.1009-1020, 2013.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. **Journal of Parasitology**, v.28, p.13–35, 1979.

JEDRZEJEWSKI, S.; GRACZYK, T.K.; SLODKOWICZ-KOWALSKA, A.; TAMANG, L.; MAJEWSKA, A.C. Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.12, p.4071-4073, 2007.

JELLISON, K.L.; DISTEL, D.L.; HEMOND, H.F.; SCHAUER, D.B. Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.452-458, 2004.

JIRKU, M., VALIGUROVÁ, A., KOUDELA, B., KRÍZEK, J., MODRÝ, D., SLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitológica**, (Praha) v.55, p.81–94, 2008.

KARANIS, P.; PLUTZER, J.; HALIM, N.A.; IGORI, K.; NAGASAWA, H.; ONGERTH, J.; LIQING, M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. **Parasitology Research**, v.101, p.1575–1580, 2007.

KASICKOVÁ, D.; SAK, B.; KVÁC, M.; DITRICH, O. Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterization of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.125–130, 2009.

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.

KEELING, P.J.; FAST, N.M. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p.93–116, 2002.

KEISER, J.; UTZINGER, J. Food-borne trematodiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, p.466–483, 2009.

KOUDELA, B., MODRY, D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. **Folia Parasitológica**, v.76, p.181–188, 1998.

KUHN, R.C.; ROCK, C.M.; OSHIMA, K.H. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande river valley in southern New Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.161–165, 2002.

KVÁČ, M.; KESTŘANOVÁ, M.; PINKOVÁ, M.; KVĚTOŇOVÁ, D.; KALINOVÁ, J.; WAGNEROVÁ, P.; KOTKOVÁ, M.; VÍTOVEC, J.; DITRICH, O.; MCEVOY, J.; STENGER, B.; SAK, B. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). **Veterinary Parasitology**, v.191, p.218–227, 2013.

KVÁČ M.; HOFMANNOVÁ, L.; HLÁSKOVÁ, L.; KVĚTOŇOVÁ, D.; VÍTOVEC, J.; McEVOY, J.; SAK, B. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. **Veterinary Parasitology**, v.201, p.9–17, 2014.

KVÁČ, M.; HAVRDOVÁ, N.; HLÁSKOVÁ, L.; DAŇKOVÁ, T.; KANDĚRA, J.; JEŽKOVÁ, J.; VÍTOVEC, J.; SAK, B.; ORTEGA, Y.; XIAO, L.; MODRÝ, D.; CHELLADURAI, J.R.; PRANTLOVÁ, V.; MCEVOY, J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and Biological Evidence of Cryptic Species within Gastric *Cryptosporidium* of Mammals. **Plos one**, v.15, p. e0147090, 2016.

LALLO, M.A.; CALÁBRIA, P.; MILANELO, L.; *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (Microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds. **Veterinary Parasitology**, v.190, p.418–422, 2012.

LEAL, D.A.G. **Monitoramento de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. na cadeia produtiva de ostras (*Crassostrea brasiliensis*), depuradas para o consumo humano no complexo estuário-lagunar de Cananéia, São Paulo**. 2013. 165f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas. Campinas. 2013

LEANDER, B.S. Marine gregarines: evolutionary prelude to the apicomplexan radiation? **Trends in Parasitology**, v.24, p.60–67, 2008.

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

- LI, W.; TAO, W.; JIANG, Y.; DIAO, R.; YANG, J.; XIAO, L. Genotypic distribution and phylogenetic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in diarrheic chickens and pigs in multiple cities, China: potential zoonotic transmission. **PLoS One**, v.9, p.e108279, 2014.
- LI, X.; PEREIRA, M.D.; LARSEN, R.; XIAO, C.; PHILLIPS, R.; STRIBY, K.; MCCOWAN, B.; ATWILL, E.R. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.4, p.343-350, 2015.
- LI, Q.; LI, L.; TAO, W.; JIANG, Y.; WAN, Q.; LIN, Y.; LI, W. Molecular investigation of *Cryptosporidium* in small caged pets in northeast China: host specificity and zoonotic implications. **Parasitology Research**, v.115, p.2905-2911, 2016.
- LINDSAY D. S.; BLAGBURN B. L.; ERNEST J. A. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in chickens. **Journal of Parasitology**, v.73, p.242-4, 1987.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. Cryptosporidiosis in birds. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. (Eds.). **Cryptosporidiosis of Man and Animals**. Boca Raton (FL): CRC Press; 1990. p. 133-148.
- LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., OWENS, D.S., MORGAN, U.M., MEAD, J.R., BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.47, p.91-95, 2000.
- LOBO, M.L.; XIAO, L.; CAMA, V.; MAGALHAES, N.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.7380-7382, 2006.
- LOBO, M.L.; XIAO, L.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: a 10-years study on HIV-positive and negative patients. **International Journal for Parasitol**, v.41, p. 197-205, 2012.
- MAHMUD, M.A.; CHAPPELL, C.; HOSSAIN, M.M.; HABIB, M.; DUPONT, H.L. Risk factors for development of first symptomatic *Giardia* infection among infants of a birth cohort in rural Egypt. **The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v.53, p.84-88, 1995.
- MAJEWSA, A.C.; TADDEUS, K.G.; SŁODKOWICZ-KOWALSKA, A.; TAMANG, L.; JĘDRZEJEWSKI, S.; ZDUNIAK, P.; SOLARCZYK, P.; NOWOSAD, A.; NOWOSAD, P. The role of free-ranging, captive, and domestic birds of Western Poland in environmental contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. **Parasitology Research**, v.104, p.1093-1099, 2009.
- MANABE, Y.C.; CLARK, D.P.; MOORE, R.D.; LUMADUE, J.A.; DAHLMAN, H.R.; BELITSOS, P.C.; CHAISSON, R.E.; SEARS, C.L. Cryptosporidiosis in patients with AIDS: correlates of disease and survival. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.536-542, 1998.

MARÇAL JÚNIOR, O.; FRANCHIN, A.G.; ALTEFF, E.F.; SILVA JÚNIOR, E.L.; MELO, C. Levantamento da avifauna na reserva ecológica Panga (Uberlândia, MG, Brasil). **Bioscience Journal**, v.25, n.6, p.149-164, 2009.

MATHIS, A.; WEBER, R.; Deplazes, P. Zoonotic potential of the microsporidia. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.423-425, 2005.

MEYER, S.T.; da SILVA, A.F.; JÚNIOR, P.M.; NETO, J.A.A.M. Composição florística da vegetação arbórea de um trecho de floresta de galeria do Parque Estadual do Rola-Moça na Região Metropolitana de Belo Horizonte, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n.4, p.701-709, 2004.

McEVOY, J.M.; GIDDINGS, C.W. *Cryptosporidium* in commercially produced turkeys on-farm and postslaughter. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.302-306, 2009.

McLAUHLIN, J.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; AMAR-HOETZENEDER, C.; NICHOLS, G.L. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.3153–3158, 1999.

McROBERTS, K.M.; MELONI, B.P.; MORGAN, U.M.; MARANO, R.; BINZ, N.; ERIANDSEN, S.L.; HALSE, S.A.; THOMPSON, R.C. Morphological and molecular characterization of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. **Journal of Parasitology**, v.82, p.711–718, 1996.

MONIS, P.T.; ANDREES, R.H.; MAYRRHOFER, G.; EY, P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v.3, n.1, p.29-38, 2003.

MONIS, P.T.; CACCIO, S.M.; THOMPSON, R.C. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v.25, p.93-100, 2009.

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

MÜLLER, M.G.; KINNE, J.; SCHUSTER, R.K.; WALOCHNIK, J. Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bieneusi* in falcons. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.67–78, 2008.

MUNGTHIN, M.; SUBRUNGRUANG, I.; NAAGLOR, T.; AIMPUN, P.; AREEKUL, W.; LEELAYOOVA, S. Spore shedding pattern of *Enterocytozoon bieneusi* in asymptomatic children. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.473-476, 2005.

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.

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

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

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

NOLLER, W. Kleine Beobachtungen an parasitischen Protozoen. **Archiv für Protistenkunde**, v.41, p.169-189, 1920.

NYGÅRD, K.; SCHIMMER, B.; SØBSTAD, Ø.; WALDE, A.; TVEIT, I.; LANGELAND, N.; HAUSKEN, T.; AAVITSLAND, P. A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area. **BMC Public Health**, v.6, p.6-10, 2006.

O'HANDLEY, R.M.. *Giardia* in farm animals. In: Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. **CAB International**, Wallingford, p.97-105, 2002.

OLIVEIRA, F.C.; EDERLI, N.B.; EDERLI, B.B.; ALBUQUERQUE, M.C.; Dos SANTOS, M.D. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in ostriches, *Struthio camelus* L., 1758 (Aves, Struthionidae) reared in North and Lowered Coastline regions of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p.322-325, 2008.

OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v.20, p.185-191, 2004.

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

PAPINI, R.; GIRIVETTO, M.; MARANGI, M.; MANCIANTI, F.; GIANGASPERO, A. Endoparasite infection in pet and zoo Birds in Italy. **ScientificWorldJournal**, v.2012, p.1-9, 2012.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environment. **Rem. Clin. Microbiol.**, v.3, p.290-301, 1999.

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

PENG, M.M; WILSON, M.L.; HOLLAND, R.E.; MESHNICK, S.R.; LAL, A.A.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications

for understanding the transmission dynamics. **Parasitology Research**, v.90, p.175-180, 2003.

PEREIRA, M.D.; ATWILL, E.R.; BARBOSA, A.P.; SILVA, S.A.; GARCÍA-ZAPATA, M.T. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, p.787-793, 2002.

PIRESTANI, M.; SADRAEI, J.; FOROUZANDEH, M. Molecular characterization and genotyping of human related microsporidia in free-ranging and captive pigeons of Tehran, Iran. **Infection, Genetics and Evolution**, v.20, p.495-499, 2013.

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

PLUTZER, J.; TOMOR, B. The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. **Parasitology International**, v.58, p.227-231, 2009.

POWER, M.L., RYAN, U.M. A new species of *Cryptosporidium* (Api-complexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). **Journal of Parasitology**, v.94, p.1114-1117, 2008.

PLUTZER, J. ONGERTH, J. KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene Environmental Health**, v.213, p.321-333, 2010.

REETZ, J.; RINDER, H.; THOMSCHKE, A.; MANKE, H.; SCHWEBS, M.; BRUDEREK, A. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bienersi* in non-mammalian hosts (chickens). **International Journal for Parasitology**, v.32, p.785-787, 2002.

REN, X.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; NING, C.; JIAN, F.; WANG, R.; LV, C.; WANG, Q.; ARROWOOD, M.J.; XIAO, L. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). **Experimental Parasitology**, v.130, p.274-281, 2012.

RAMIREZ, N.E.; SREEVATSAN, S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.201-213, 2006.

REBOREDO-FERNADEZ, A.; ARES-MAZÁS, E.; CACCIÒ, S.M.; GÓMEZ-COUSO, H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). **Parasitology**, v.142, p.917-925, 2015.

RIJPSTRA, A.C.; CANNING, E.U.; VAN KETEL, R.J.; EEFTINCK-SCHATTENKERK, J. K.; LAARMAN, J.J. Use of light microscopy to diagnose small-intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. **Journal of Infectious Diseases**, v.157, p.827-831, 1998.

RINDER, H.; JANITSCHKE, K.; ASPOCK, H.; Da SILVA, A.J.; DEPLAZES, P.; FEDORKO, D.P.; FRANZEN, C.; FUTH, U.; LEHMACHER, A.; MEYER, C.G.; MOLINA, J.M.; SANDFORT, J.; WEBER, R.; LOSCHER, T. Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of Microsporidia in stool specimens. **Journal of clinical microbiology**, v.36, p.1814-1818, 1998.

ROBERTSON, L.J.; GJERDE, B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. **Journal of Food Protection**, v.64, p.1793-1798, 2001.

ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.J.; KATZER, F.; BARTLEY, P.M.; HUNTER, P.R.; NATH, M.; INNES, E.A.; CHALMERS, R.M. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, v.40, p.1539-1548, 2010.

RODRIGUES, M.; MICHELIN, V.B. Riqueza e diversidade de aves aquáticas de uma lagoa natural no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.4, p.928-935, 2005.

ROSA, R.; LIMA, S.C.; ASSUNÇÃO, L.W. Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia (MG). **Sociedade & Natureza**, v.3, n.5 e 6, p.91-108, 1991.

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. **Journal of Parasitology**, v.89, p.809-813, 2003.

RYAN, U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H.L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, R.; ROBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R.C.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v.90, 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. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v.124, p.113-120, 2010.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; TONG, K.; YANG, R.; GIBSON-KUEH, S.; O'HARA, A.; LYMBERY, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). **Experimental Parasitology**, v.150, p.31-35, 2015.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry?. **Water Research**, v.15, p.305-313, 2016.

- SANTÍN, M.; FAYER, R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.56, p.34–38, 2009.
- SANTÍN, M.; VECINO, J.A.; FAYER, R. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bieneusi* in horses. **Journal of Parasitology**, v.96, p.157-161, 2010.
- SANTÍN, M.; FAYER, R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. **Research in Veterinary Science**, v.90, p.363-371, 2011.
- SANTÍN, M.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; SOLANO-AGUILAR, G.; FAYER, R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. **Parasitology Research**, v.109, p.205-212, 2011.
- SANTÍN, M. *Enterocytozoon bieneusi*. In: XIAO, L.; RYAN, U.; FAYER, Y. (Eds.). **Biology of Foodborne Parasites**. Boca Raton (FL): CRC Press; 2015. p.149–174.
- SAK, B.; KUCEROVÁ, Z.; KVEC, M.; KVETONOVÁ, D.; ROST, M. SECO, E.W. Soropositivity for *Enterocytozoon bieneusi*, Czech Republic. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.335-337, 2010.
- SEMENZA, J.C.; NICHOLS, G. Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. **European surveillance**, v.12, p.E13-E14, 2007.
- SEVÁ, A.P.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARAES, 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.
- da SILVA, A.S.; ZANETTE, R.A.; LARA, V.M.; GRESSLER, L.T.; CARREGARO, A.B.; SANTURIO, J.M. MONTEIRO, S.G. Gastrointestinal parasites of owls (Strigiformes) kept in captivity in the Southern region of Brazil. **Parasitology Research**, v.104, p.485-487, 2009.
- da SILVA FIUZA, V.R.; LOPES, C.W.; DE OLIVEIRA, F.C.; FAYER, R.; SANTIN, M. New findings of *Enterocytozoon bieneusi* in beef and dairy cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.30, p.46-51, 2016.
- 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. TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.29-40, 2007.
- SOLTANE, R., GUYOT, K., DEI-CAS, E., AYADI, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. **Parasite**, v.14, p.335–338, 2007.

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

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

STODKOWICZ-KOWALSKA, A.; GRACZYK, T.K.; NOWOSAD, A.; MAJEWSKA, A.C. First detection of microsporidia in raised pigeons in Poland. **Annals of Agricultural Environment Medicine**, v.20, n.1, p.13-15, 2013.

SULAIMAN, I.M.; BERN, C.; GILMAN, R.; CAMA, V.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; TICONA, E.; VIVAR, A.; XIAO, L. A molecular biologic study of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV-infected patients in Lima, Peru. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v.50, Suppl:586-590, 2003.

SULAIMAN, I.M.; HIRA, P.R.; ZHOU, L.; AL-ALI, F.M.; AL-SHELAHI, F.A.; SHWEIKI, H.M.; IQBAL, J.; KHALID, N.; XIAO, L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.2805–2809, 2005.

TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; CHEN, W.J.; HUANG, C.G.; LANCTO, C.A.; ABRAHAMSEN, M.S.; ZHU, G. A Genome-Sequence Survey for *Ascogregarina taiwanensis* Supports Evolutionary Affiliation but Metabolic Diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*. **Molecular Biology and Evolution**, v.27, p.235-248, 2010.

THOMPSON, R.C.A.; REYNOLDSON, J.A.; MENDIS, A.H.W. *Giardia* and giardiasis. **Advances in Parasitology**, v.32, p.71-160, 1993.

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, v.16, n.5, p.211-213, 2000.

THOMPSON, R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.15–35, 2004.

THOMPSON, R.C.; MONIS, P. *Giardia*-from genome to proteome. **Advances in Parasitology**, v.78, p.57-95, 2012.

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

VASCONCELOS, M.F.; MAZZONI, L.G.; PERILLO, A.; GUERRA, T.; MORAIS, R.; GARZON, B.; dos SANTOS, J.E.; GUIMARÃES, L.S.L.; ALMEIDA, T.O.; PEIXOTO, H.J.C.; DUTRA, E.C.; PEDROSO, L.F.; VALÉRIO, F.A.; PETROCCHI,

D.; SANTOS, L.P.S.; DIAS, J.E.M.; de MORAIS, A.S.; GARCIA, F.I.A.; BENFICA, C.E.R.T.; RIBEIRO, B.P. Long-term avifauna survey in an urban ecosystem from southeastern Brazil, with comments on range extensions, new and disappearing species. **Papéis avulsos de zoologia**, v.53, n.25, p.327-344, 2013.

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. **The Journal of Protozoology**, v.18, p.243-247, 1971.

VOLOTÃO, A.C.; COSTA-MACEDO, L.M.; HADDAD, F.S.M.; BRANDÃO, A.; PERALTA, J.M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using giardin gene: A phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v.102, p.10-19, 2007.

VOSSBRINCK, C.R.; MADDOX, J.V.; FRIEDMAN, S.; DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B.A.; WOESE, C.R. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. **Nature**, v. 326, p. 411-414, 1987.

WASSON, K.; PEPER, R. L. Mammalian microsporidiosis. **Veterinary pathology**, v. 37, p. 113-128, 1999.

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 Pathology**, v.39, p.447-451, 2010.

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

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**, v.21, p.1-5, 2014a.

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

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R.C.A.; FAYER, R.; LAL, A.A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3386-3391, 1999.

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

XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T.K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.3, p.1097-1101, 2001.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.72-97, 2004.

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

XIAO, L.; RYAN, L. *Cryptosporidium*. In: XIAO, L.; RYAN, U.; FAYER, Y. (Eds.). **Biology of Foodborne Parasites**. Boca Raton (FL): CRC Press; 2015. p. 77–95.

XIAO, L.; RYAN, U.; FENG, Y. (Eds.). **Biology of Foodborne Parasites**. Boca Raton (FL): CRC Press; 2015. p. 149–174.

YANG, Z.; ZHAO, W.; SHEN, Y.; ZHANG, W.; SHI, Y.; REN, G.; YANG, D.; LING, H.; YANG, F.; LIU, A.; CAO, J. Subtyping of *Cryptosporidium cuniculus* and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in rabbits in two farms in Heilongjiang Province, China. **Parasite**, v.23, p.52, 2016.

ZHOU, L.; KASSA, H.; TISCHLER, M.L; XIAO, L. Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.4211-4215, 2004.

ZHAO, W.; YU, S.; YANG, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; WANG, R.; ZHANG, W.; YANG, F.; LIU, F. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) isolated from various birds in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v.40, p.151-154, 2016.

Anexos

Anexo A: Análise final da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) para o protocolo 151/13.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 013/14 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 151/13

Projeto Pesquisa: "Ocorrência e identificação molecular de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em aves silvestres e domésticas no sudeste brasileiro".

Pesquisador Responsável: Márcia Cristina Cury

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 20 de Março de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Anexo B: ofício direcionado ao superintendente do IBAMA/MG para formalizar o pedido de coleta das amostras fecais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

OF- 84/2013

Uberlândia, 17 de Setembro de 2013

Sr. Marco Túlio Simões Coelho
Superintendente Estadual do IBAMA/MG.

Prezado Senhor,

Venho por meio desta, solicitar a autorização de coleta de fezes das aves presentes no CETAS/IBAMA de Belo Horizonte, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa do projeto intitulado "Ocorrência e identificação molecular de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em aves silvestres e domésticas no sudeste brasileiro", da aluna de doutorado, **Maria Júlia Rodrigues da Cunha**, do Programa de Pós Graduação em Parasitologia e Imunologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Márcia Cristina Cury

Laboratório de Parasitologia - ICBIM
Universidade Federal de Uberlândia - Av. Pará 1720 – Bloco 4C
Bairro Umuaramá - CEP-38400-902
Tel: (034)321821-98
Fax: (34)321823-32
curv@umuarama.ufu.br

PROF. DRA. MÁRCIA CRISTINA CURY
SIAPE 1220499
CHAPA 04508667
CRMV-MG 3929

Anexo C: TCLE assinado pelos responsáveis pelas propriedades particulares, comércios aviários e falcoaria, antes do início do trabalho.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos

Termo de consentimento Livre e Esclarecido – proprietário

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa com o título **“Ocorrência e identificação molecular de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bienersi* em aves silvestres e domésticas das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG”**, sob a responsabilidade da pesquisadora Maria Júlia Rodrigues da Cunha, sob orientação da Prof^a Dr^a Márcia Cristina Cury do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Nesta pesquisa buscamos conhecer o número de infecções por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *E. bienersi*, parasitos intestinais, que acometem aves silvestres e domésticas. Buscaremos compreender se as aves são capazes de disseminar espécies zoonóticas desses patógenos, causando impacto negativo na saúde pública.

Você participará da pesquisa, fornecendo fezes dos animais de sua propriedade que serão solicitadas pelos pesquisadores. As fezes serão coletadas em potes coletores, contidos em kits (prato descartável, espátula e coletor de fezes), que serão previamente cedidos. Estes potes contendo as fezes serão encaminhados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão investigados parasitos, através de exame das fezes.

Em nenhum momento seu nome será identificado. Os resultados dos exames de fezes dos animais participantes serão fornecidos diretamente, por contato telefônico. Você será avisado do exame dos animais de sua propriedade e se houverem animais positivos para os parasitos, você será orientado a procurar um médico veterinário para seguir com tratamento adequado dos mesmos.

Você não terá nenhum ônus ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

Dessa forma, você, autorizando a coleta de material dos animais da sua propriedade, estará colaborando para um melhor entendimento destes patógenos, e possibilitando futuras medidas de controle e tratamento mais eficazes.

O(a) senhor(a) é livre para deixar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor(a).

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa entre em contato com: Maria Júlia Rodrigues da Cunha ou Prof^a Dr^a Márcia Cristina Cury na Av. Pará, 1720 Bloco 4C – Campus Umuarama – CEP: 38400-902 – Uberlândia-MG, Telefone: (34) 32182198.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco

A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131.

Uberlândia, _____ de _____ de 200 _____

Márcia Cristina Cury

Maria Júlia Rodrigues da Cunha

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa