

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

**OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium*
spp. e *Giardia spp.* EM AVES SILVESTRES BRASILEIRAS**

Maria Júlia Rodrigues da Cunha

Uberlândia
Fevereiro – 2013

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

**OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium*
spp. e *Giardia spp.* EM AVES SILVESTRES BRASILEIRAS**

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

Maria Júlia Rodrigues da Cunha
Aluna

Prof^a Dr^a Márcia Cristina Cury
Orientadora

Uberlândia
Fevereiro – 2013

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

Maria Júlia Rodrigues da Cunha

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

Área de Concentração: Parasitologia

Banca examinadora:

Prof. Dra. Marlene Cabrine dos Santos Silva – UFTM

Prof. Dr. Oswaldo Marçal Júnior – UFU

Prof^ª Dr^ª Márcia Cristina Cury – UFU

Uberlândia
Fevereiro – 2013

Dedicatória

A toda equipe do Laboratório de Parasitologia, por me apoiar nas horas em que mais precisei e vibrar comigo a cada amostra positiva.

Especialmente a Natália e a Luana, por todas as risadas, choros e desesperos vividos intensamente.

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

"Você nunca sabe a força que tem. Até que sua única alternativa é ser forte."

Johnny Depp

Agradecimientos

Em primeiro lugar, a minha orientadora, Márcia Cristina Cury, que mais do que eu mesma, acreditou no meu potencial e na minha capacidade de superação. Muito obrigada por toda paciência, carinho, broncas e prontidão em ajudar. Você será para sempre minha mãe científica.

Ao Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos e toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres, que abriram as portas do ambulatório para que eu realizasse as coletas.

A equipe do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, que permitiu as coletas de material das aves aquáticas.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelo treinamento e auxílio durante a execução dos experimentos.

A todos do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, especialmente à Profa. Dra. Márcia Benedita de Oliveira Silva, pelos ensinamentos transmitidos.

A Isabella Pena, do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela gentileza e agilidade na execução do sequenciamento.

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, a Juliana, por toda a paciência e presteza.

Aos colegas da turma, por todos os momentos agradáveis, dentro e fora de sala de aula, que fizeram as disciplinas se tornarem menos desesperadoras.

As amigas, Natália e Luana, pelo apoio incondicional nas horas de alegria e desânimo. Pelas risadas, choros, conselhos, viagens e feriados passados no laboratório. A amizade de vocês foi a melhor e maior conquista que o mestrado me trouxe.

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 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Muito obrigada!

Lista de figuras

Figura 1: Exemplo esquemático da divisão das áreas onde se localizavam as aves aquáticas. Cada quadrante foi considerado um “pool” amostral.

Pag. 38

Figura 2: Diagrama esquemático do fluxograma de etapas do estudo.

Pag. 43

Figura 3: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de aproximadamente 825 pares pb do gene SSU rDNA de *Cryptosporidium* spp., amplificado pela nested-PCR a partir do DNA obtido de amostras de fezes de aves de cativeiro e vida livre, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 47

Figura 4: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando o perfil das amostras positivas na nestes-PCR após digestão com as enzimas *SspI* e *VspI*.

Pag. 51

Figura 5: Relações filogenéticas das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. caracterizados pelo sequenciamento do gene SSU rRNA inferidas pela análise Neighbour-Joining. Valores de bootstrap estabelecidos em 1000 réplicas.

Pag. 53

Figura 6: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de aproximadamente 432 pares pb do gene *gdh* de *Giardia* spp., amplificado pela semi-nested PCR a partir do DNA obtido de amostras de fezes de aves de cativeiro e vida livre, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 55

Figura 7: Relações filogenéticas das Assemblages de *G. duodenalis* e *Giardia* spp. caracterizados pelo sequenciamento do gene *gdh* inferidas pela análise Neighbour-Joining. Valores de bootstrap estabelecidos em 1000 réplicas.

Pag. 59

Lista de tabelas

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

Pag. 21

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

Pag. 27

Tabela 3: Análise de RFLP-PCR do gene SSU rDNA de várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp.

Pag. 40

Tabela 4: Espécies e famílias de aves silvestres procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 44

Tabela 5: Grupo e número de aves silvestres procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 45

Tabela 6: Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. a partir do número amostral total aves silvestres procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 47

Tabela 7: Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em aves silvestres de cativeiro e de vida livre procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 48

Tabela 8: Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em aves silvestres aquáticas e não aquáticas procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das

quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 49

Tabela 9: Resultados de RFLP-PCR e sequenciamento das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp.

Pag. 52

Tabela 10: Ocorrência de *Giardia* spp. em a partir do número amostral total de aves silvestres procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 55

Tabela 11: Ocorrência de *Giardia* spp. em aves silvestres de cativeiro e de vida livre procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 56

Tabela 12: Ocorrência de *Giardia* spp. em aves silvestres aquáticas e não aquáticas procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Pag. 57

Tabela 13: Resultados do sequenciamento das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp.

Pag. 58

Sumário

RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	19
1.1.1. Histórico e Classificação das espécies de <i>Cryptosporidium</i>	20
1.1.2. Ciclo biológico.....	23
1.1.3. Patogenia.....	23
1.1.4. Epidemiologia.....	24
1.1.5. Diagnóstico.....	25
1.2. <i>Giardia</i> spp.....	26
1.2.1. Histórico e Classificação das espécies de <i>Giardia</i>	26
1.2.2. Ciclo biológico.....	29
1.2.3. Patogenia.....	29
1.2.4. Epidemiologia.....	30
1.2.5. Diagnóstico.....	30
1.3. Papel das aves na transmissão de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo geral.....	34
3.2. Objetivos específicos.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Comitê de Ética.....	35
4.2. Área de estudo.....	35
4.3. Local de estudo	
4.3.1. Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS).....	35
4.3.2. Zoológico do Parque Municipal do Sabiá.....	36
4.4. População de Estudo.....	37
4.5. Coleta das amostras.....	37
4.6. Armazenamento das amostras fecais.....	39
4.7. Extração do DNA.....	39
4.8. Diagnóstico molecular e Identificação das espécies de <i>Cryptosporidium</i>	
4.8.1. Reação de nested-PCR.....	39

4.8.2. Reações de RFLP- PCR.....	40
4.9. Diagnóstico molecular e identificação das espécies de <i>Giardia</i>	41
4.10. Eletroforese em gel de agarose.....	41
4.11. Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento.....	42
4.12. Avaliação, edição e alinhamento das sequências.....	42
4.13. Análise Estatística.....	43
5. RESULTADOS	
5.1. Amostras coletadas.....	44
5.2. <i>Cryptosporidium</i> spp.	
5.2.1. Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	46
5.2.2. Identificação das espécies de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	50
5.3. <i>Giardia</i> spp.	
5.3.1. Ocorrência de <i>Giardia</i> spp.....	54
5.3.2. Identificação das espécies de <i>Giardia</i> spp.....	58
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÕES.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
9. ANEXOS	
9.1. Anexo A.....	82
9.2. Anexo B.....	83
9.3. Anexo C.....	84

Resumo

Infecções parasitárias estão entre os problemas sanitários comuns que acometem aves em todo mundo. A identificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em aves silvestres é relevante, visto que esses animais podem agir como veiculadoras dos parasitos para o ser humano, por meio da contaminação ambiental. O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência e caracterizar geneticamente as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em aves silvestres de cativeiro e vida livre atendidas no Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia (LAPAS-UFU) e procedentes do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. O DNA, extraído diretamente das fezes coletadas, foi submetido a reações de nested-PCR e semi-nested PCR para amplificação de fragmentos dos genes SSU rRNA e *gdh* de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., respectivamente. Das 256 amostras coletadas, 10 (3,9%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. e 8 (3,1%) para *Giardia* spp. Das 172 amostras de aves de cativeiro, seis (3,49%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. e quatro (2,32%) para *Giardia* spp.; das 84 amostras de aves de vida livre, quatro (4,76%) para *Cryptosporidium* spp. e quatro (4,76%) para *Giardia* spp. foram positivas. A ocorrência dos parasitos em aves aquáticas (n=39) foi dois (5,13%) para *Cryptosporidium* spp. e quatro (10,26%) para *Giardia* spp.; em aves não aquáticas (n=217), oito (3,7%) e quatro (1,84%), respectivamente. Não foi encontrada diferença significativa na ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre os grupos de aves de cativeiro e vida livre ($p=0,62$ e $0,29$, respectivamente). Apesar de não ter sido realizada análise estatística para a positividade de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre aves aquáticas e não aquáticas, ressalta-se que o encontro desses parasitos nas aves aquáticas pode ter implicações na transmissão desses protozoários para o homem e outros animais. Análises de RFLP e sequenciamento identificaram *C. meleagridis* em duas aves da família Anatidae, duas *Aratinga leucophthalma* (Maritaca) e duas *Athene cunicularia* (Corujas-buraqueira) e *C. baileyi* em três *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro) e uma *Amazona amazonica* (papagaio-do-mangue). As amostras sequenciadas para *Giardia* spp., provenientes de dois *Rupornis magnirostris* (Gavião-carijó) e uma *Theristicus caudatus* (Curicaca), foram classificadas como *Giardia duodenalis* assemblage B. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. estão presentes em aves silvestres de cativeiro e vida livre na microrregião de Uberlândia, MG. A presença de *C. meleagridis* e *G. duodenalis* assemblage B, considerados zoonóticos, em animais desse estudo, pode gerar impacto negativo na saúde pública.

Abstract

Parasitic infections are among the commonest health problems that affect birds. The identification of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in wild birds is relevant, since these animals can act as disseminators of these parasites to humans through environmental contamination. The aim of this research was to determine the occurrence and to perform the molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species/genotypes in feces from free-living and captive wild birds treated in the Laboratory of Wild Animals Research from the Federal University of Uberlândia (LAPAS) and kept in the Zoo of the Municipal Park of Sabiá, in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. The DNA extracted directly from feces was submitted to nested-PCR and semi-nested PCR analysis for amplification of fragments of the SSU rRNA and *gdh* genes of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., respectively. Results showed that out of 256 samples collected, 10 (3.9%) were positive for *Cryptosporidium* spp., and 8 (3.1%) for *Giardia* spp.. Out of 172 samples of captive birds, six (3.49%) were positive for *Cryptosporidium* spp., and four (2.32%) for *Giardia* spp.. Out of 84 samples of free-living birds, four (4.76%) for *Cryptosporidium* spp. and four (4.76%) for *Giardia* spp. were positive. The occurrence of parasites in waterfowl (n=39) was two (5.13%) for *Cryptosporidium* spp., and four (10.26%) for *Giardia* spp.; in non-aquatic birds (n=217), it was eight (3.7%) and four (1.84%), respectively. There was no significant difference in the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. among captive and free-living birds ($p = 0.62$ and 0.29 , respectively). Although no statistical analysis was performed for the positivity of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. between waterfowl and non aquatic birds, the meeting of these parasites in waterfowl may have implications for the transmission of these protozoa to humans and other animals. RFLP and sequencing analysis have identified *C. meleagridis* in two birds of the Anatidae family, in two *Aratinga leucophthalma* (White-eyed parakeet), and in two *Athene cunicularia* (Burrowing Owl). They have also found *C. baileyi* in three *Amazona aestiva* (Blue-fronted Parrot) and in one *Amazona amazonica* (Orange-winged Parrot). Only three positive samples for *Giardia* spp. - classified as *Giardia duodenalis* assemblage B - were sequenced, two of them found in *Rupornis magnirostris* (Roadside Hawk), and one in *Theristicus caudatus* (Buff-necked Ibis). The essay concluded that *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. are present in wild birds in the microregion of Uberlândia, MG. The existence of zoonotic *C. meleagridis* and *G. duodenalis* assemblage B in the animals of this study may have a negative impact on public health.

Introdução

Infecções parasitárias estão entre os problemas sanitários mais comuns que acometem aves silvestres em todo o mundo, podendo se tornar tanto uma condição subclínica como, também, ser causa de morte (MARIETTO-GONÇALVES et. al., 2008).

De acordo com Freitas et al. (2002), além de propiciar o aparecimento de infecções secundárias, as parasitoses interferem no comportamento e no desempenho reprodutivo das aves o que é refletido, principalmente, no retardo do desenvolvimento dos filhotes e na diminuição do tamanho das ninhadas (MOYER et. al., 2002).

Alguns parasitos podem causar doenças em humanos e animais, sendo as aves um grupo importante na cadeia de transmissão de vários parasitos. Aves infectadas com patógenos humanos podem contaminar fontes de água de consumo ou recreacionais, representando risco à saúde pública, uma vez que esses patógenos causam diversos surtos de doenças de veiculação hídrica (KARANIS et al., 2007).

Entre os parasitos que são facilmente disseminados no ambiente por hospedeiros aviários, destacam-se *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., os principais agentes etiológicos causadores de surtos gastrointestinais em animais e humanos de todo mundo, nos últimos anos (KARANIS et al., 2007; FRANCO et al., 2012). Oocistos e cistos desses patógenos são liberados no ambiente pelas fezes dos hospedeiros, transmitidos por contato direto ou indireto, pelo consumo de água e alimentos contaminados (FAYER et al., 2000).

Diversas espécies de aves silvestres e domésticas são hospedeiras de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp (GRACZYC et al., 2008). Entretanto, o papel das aves na contaminação de “habitats” aquáticos e as consequências na saúde pública da presença desses animais em fontes de água de consumo e recreação têm sido pouco estudados (GRACZYC et al., 2008).

1.1. *Cryptosporidium* spp.

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Coccidia, Ordem Eucoccidiorida, Família Crypsosporidiidae (FAYER, 2008). Este coccídio é parasito intracelular obrigatório, capaz de parasitar microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal e respiratório de hospedeiros vertebrados (PENG et

al., 2003; OLSON et al., 2004). O quadro clínico comum é a diarreia, podendo gerar prejuízo na produtividade de animais de produção comercial (SANTIN et al., 2004).

Infecções por esse parasito são comuns em humanos, bovinos, cães, gatos, porcos, cavalos, carneiros, cabras, aves e animais selvagens (HAMNES; GJERD; ROBERTSON, 2006). Muitas espécies não possuem especificidade por hospedeiros e a transmissão entre eles pode ocorrer facilmente (SRÉTER; VARGA, 2000).

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente sugere que a infecção pode ocorrer por diversas rotas de transmissão, tais como, contato pessoa-a-pessoa, contato com animais de fazenda e de companhia e ingestão de alimentos, água potável e águas de recreação contaminados (FAYER, 2010).

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. variam em tamanho e apresentam-se em forma esférica. Possuem estruturas internas de difícil observação em microscópio óptico, com pouca ou nenhuma diferença morfométrica capaz de distinguir as inúmeras espécies do gênero que são infectantes para os animais e para o homem (HUBER et al., 2003; MORGAN et al., 1998; XIAO et al., 2004).

A criptosporidiose aviária é doença cosmopolita, sendo reportada em mais de 30 espécies de aves no mundo todo, incluindo aves domésticas, de cativeiro e silvestres (RYAN, 2010). O elevado número de espécies suscetíveis a *Cryptosporidium* sugere que as aves apresentam relevância na cadeia epidemiológica dessa zoonose, pois podem agir como fonte de infecção para o ser humano pela contaminação ambiental. (SRÉTER; VARGA, 2000). Além disso, a doença acarreta impactos econômicos, causando perdas na indústria avícola (SRÉTER; VARGA, 2000).

.

1.1.1. Histórico e Classificação das espécies de *Cryptosporidium*

A morfologia dos oocistos era a principal ferramenta utilizada na taxonomia de *Cryptosporidium*, porém, a falta de informações sobre a especificidade de hospedeiros tem dificultado a classificação deste parasito (FALL et al., 2003). Atualmente, baseando-se em características moleculares, epidemiológicas e morfológicas, várias espécies, genótipos e subgenótipos de *Cryptosporidium* foram identificados, sendo reconhecidas 20 espécies (PLUTZER; KARANIS, 2009), como demonstrado na tabela a seguir:

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

Espécie	Hospedeiro	Referência
<i>C. parvum</i>	Mamíferos	Tyzzzer, 1912
<i>C. muris</i>	Mamíferos	Tyzzzer, 1907
<i>C. andersoni</i>	Mamíferos	Lindsay et al., 2000
<i>C. hominis</i>	Mamíferos	Morgan-Ryan et al., 2002
<i>C. canis</i>	Mamíferos	Fayer et al., 2001
<i>C. felis</i>	Mamíferos	Iseki, 1979
<i>C. bovis</i>	Mamíferos	Fayer et al., 2005
<i>C. ryanae</i>	Mamíferos	Fayer et al., 2008
<i>C. suis</i>	Mamíferos	Ryan et al., 2004
<i>C. wrairi</i>	Mamíferos	Vetterling et al., 1971
<i>C. fayeria</i>	Mamíferos	Ryan et al., 2008
<i>C. macropodum</i>	Mamíferos	Power; Ryan, 2008
<i>C. meleagridis</i>	Aves	Slavin, 1955
<i>C. baileyi</i>	Aves	Current et al., 1986
<i>C. galli</i>	Aves	Pavlásek, 1999
<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. scophthalmi</i>	Peixes	Alvarez-Pollitero et al., 2004

PLUTZER; KARANIS, 2009.

O polimorfismo genético entre as espécies de *Cryptosporidium* é continuamente detectado, devido ao uso crescente das técnicas moleculares (PLUTZER; KARANIS, 2009). Utilizando-se a subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rRNA), foram descritos aproximadamente, 61 genótipos de *Cryptosporidium* sem classificação definida (PLUTZER; KARANIS, 2009). A principal espécie estudada é *C. parvum*, devido a seu potencial zoonótico. Plutzer e Karanis (2009) afirmam que foram descritos doze subtipos de *C. parvum*, sendo dois identificados como zoonóticos (IIa e IIc) e dez como não zoonóticos (IIb, IIc, IIe-III) (ABE et al., 2006; AKIYOSHI et al., 2006; GLABERMAN et al., 2001; MEIRELES et al., 2006; MISIC; ABE, 2007; SOBA; LOGAR, 2008).

Alguns trabalhos sugerem que oocistos de *C. parvum*, provenientes de mamíferos, podem gerar infecções gastrointestinais em aves (MAJEWSKA et al., 2009; QUAH et al., 2011; GOMES et al., 2012). O encontro dessa espécie nesses animais

indica que as aves podem estar diretamente envolvidas na cadeia de transmissão zoonótica.

Além da espécie zoonótica, até o momento, três espécies-específicas de aves foram reconhecidas e denominadas *C. meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli*. Estas podem infectar mais de 30 espécies de aves, diferindo-se quanto aos hospedeiros e os locais de infecção (FAYER, 2010). Proctor e Kemp (1974) identificaram, também, *C. anserinum*, parasitando gansos domésticos (*Anser domesticus*) e Levine (1961), observou *C. tyzzeri* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*). Entretanto, esses autores não forneceram descrição adequada dos oocistos ou outras informações úteis e, portanto, as espécies relatadas não foram consideradas válidas (LINDSAY; BLAGBURN, 1990).

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

C. meleagridis infecta várias espécies de aves, incluindo perus, papagaios, galinhas, calopsitas e perdizes. Apesar de ser considerado espécie-específica de aves, Ryan (2010) relata que em estudos de transmissão experimental, o parasito foi capaz de se desenvolver em mamíferos, como bezerros, porcos, coelhos, ratos e camundongos. Esse protozoário também é considerado patógeno humano emergente, sendo a terceira espécie de *Cryptosporidium* mais comum em seres humanos (XIAO; FAYER, 2008). Estudos sugeriram que *C. meleagridis* pudesse ser *C. parvum*, entretanto análises moleculares realizadas na Inglaterra, Austrália e Europa, demonstraram a singularidade do parasito (XIAO et al., 1999; MORGAN et al., 2000; SRETER et al., 2000; SULAIMAN et al., 2000; XIAO et al., 2000; MORGAN et al., 2001; SULAIMAN et al., 2002; XIAO et al., 2002).

C. baileyi é a espécie mais encontrada em aves, sendo primeiramente descrita em frangos de granja por Current et al. (1986). A espécie possui diversos hospedeiros, como, gaivotas, galinhas, biguás, perus, patos, gansos, calopsitas, codornas, avestruzes, periquitos, falcões, entre outros (LINDSAY; BLAGBURN, 1990; PAVLASEK, 1993; RYAN et al., 2003; HUBER et al., 2007).

Utilizando diferenças biológicas, Pavlásek (1999), descreveu *C. galli*, entretanto, posteriormente, o parasito foi descrito novamente, sendo utilizadas, dessa vez,

diferenças moleculares (RYAN et al., 2003b). Essa espécie se desenvolve nas células epiteliais do proventrículo das aves, com altas taxas de morbidade e mortalidade (PAVLÁSEK, 2001). Já foram confirmadas 11 espécies de aves como hospedeiras deste parasito, incluindo pássaros, galinhas, araras-azul, flamingos e cardeais-do-nordeste (CURRENT et al., 1986; LINDSAY et al., 1987).

Além das três espécies reconhecidas, quatro genótipos aviários (I-IV) foram descritos em várias espécies de aves baseado no locus SSU rDNA e HSp-70. Foram identificados também cinco genótipos de ganso (I-V), dois de patos (I e II) e um de galinha (PLUTZER; KARANIS, 2009).

1.1.2. Ciclo biológico

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 (no caso de aves) e após ingestão, os esporozoítos são liberados e parasitam as células epiteliais do trato gastrointestinal (ou outros, como trato respiratório). Dentro das células, eles sofrem reprodução assexuada (merogonia) seguida de reprodução sexuada (gametogonia). Após fertilização dos macrogametócitos (célula feminina) pelos microgametócitos (célula masculina) é formado o zigoto e finalmente, o oocisto.

Os oocistos eliminados no meio externo são altamente infectantes, pois saem na forma esporulada 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).

1.1.3. Patogenia

Criptosporidiose em aves se manifesta em duas formas clínicas principais: respiratória e gastrointestinal (LINDSAY; BLAGBURN, 1990).

A forma respiratória, causada por *C. baileyi*, pode acometer o trato respiratório superior, com desenvolvimento de sinusite (cabeça inchada) e o trato respiratório

inferior, com acometimento da traqueia, brônquios, sacos aéreos e pulmões, gerando sinais clínicos de tosse, espirros, dispneia e conjutivite (SRÉTER; VARGA, 2000). Segundo Sréter; Varga (2000), criptosporidiose respiratória é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade na indústria aviária, entretanto, os fatores responsáveis pelos surtos dessa doença são pouco conhecidos.

C. meleagridis e *C. galli*, são as espécies responsáveis pela forma gastrointestinal da criptosporidiose, com acometimento das glândulas salivares e esofágicas, proventrículos, intestino delgado, ceco, colo, cloaca e bursa de Frabicius (LINDSAY; BLAGBURN, 1990; FAYER et al., 2000). Os sinais clínicos mais comuns da doença são: letargia, diarreia e perda de peso e de pigmentação. Como ocorre invasão da mucosa, lesões, como atrofia das microvilosidades e hipertrofia das criptas, podem ser observadas (SRÉTER; VARGA, 2000).

1.1.4. Epidemiologia

De acordo com Sréter; Varga (2000), criptosporidiose é infecção parasitária prevalente em aves domesticadas, de cativeiro e silvestres, sendo relatada em espécies de aves pertencentes à diversas ordens, como Passeriformes, Psittaciformes, Galliformes, Columbiformes e Anseriformes (MAJEWSKA et al., 2009; PLUTZER e TOMOR, 2009; QI et al., 2011; QUAH et al., 2011; SEVÁ et al., 2011; GOMES et al., 2012). Esta doença foi reportada em aves de diversos países como Austrália, Argentina, Canadá, China, Espanha, África do Sul, Taiwan, Turquia, Inglaterra, Brasil, entre outros (FAYER et al., 1997). Na Europa a prevalência da infecção foi de 50-59% em patos e gansos, 20-60% em faisões, 22-100% em gaivotas e 4% em Psittaciformes (PAVLÁSEK; KOZAKIEWICZ, 1989; RICHTER, 1991; PAVLÁSEK, 1993; SMITH et al., 1993; RICHTER et al., 1994; PAPINI et al., 2012).

No Brasil, estudos sobre infecção por *Cryptosporidium* spp. em aves se concentram em aves domésticas e de cativeiro, estas provenientes, principalmente, de “pet shops” e comércios aviários. Nakamura et al. (2009), Huber et al. (2007) e Meireles et al. (2006), utilizando técnicas de biologia molecular, encontraram *Cryptosporidium* spp. em frangos de cortes e avestruzes. Em animais cativos, Gomes et al. (2011) identificaram o parasito por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 6,8% dos animais apresentando oocistos do parasito. Em aves silvestres de vida livre, entretanto, estes dados são insuficientes. Em trabalho realizado com animais apreendidos por agências de

controle ambiental, no estado de São Paulo, Sevá et al. (2011) encontraram *Cryptosporidium* spp. parasitando 6,6% das aves.

1.1.5. Diagnóstico

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 Ziehl-Neelsen modificado (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981) recomendado, 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 de *Cryptosporidium* e se mostrar álcool-ácido-resistentes, dificultando o diagnóstico (RAMIREZ; SREEVATSAN, 2006).

Métodos sorológicos e imunoenzimáticos podem ser empregados em estudos epidemiológicos da criptosporidiose humana e animal, entretanto esses métodos, apesar de alta sensibilidade, apresentam o inconveniente de não possibilitar a diferenciação entre infecções passadas e recentes, uma vez que anticorpos IgG para *Cryptosporidium* podem persistir durante anos após o contato com o parasito (ANDRADE, 2009).

A imunofluorescência direta e o ensaio imunoenzimático (EIA) são considerados mais sensíveis que as colorações ácido-resistentes, porém são caros e assim como os métodos de coloração, não são capazes de diferenciar as várias espécies do protozoário (JEX et al., 2008; FAYER et al., 2000).

Métodos moleculares são amplamente empregados na detecção e caracterização genética de *Cryptosporidium* spp., sendo a PCR em associação com a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) as metodologias mais frequentemente utilizadas. O sequenciamento é a técnica mais precisa na caracterização molecular, pois é capaz de fornecer a sequência exata de nucleotídeos que compõe a região do DNA analisada, possibilitando identificar e diferenciar as espécies e subtipos do parasito. Contudo, além de caro, a presença de várias substâncias orgânicas e inorgânicas nas amostras, pode inibir e afetar a sensibilidade destes métodos baseados em ácidos nucléicos (RAMIREZ; SREEVATSAN, 2006).

Em estudos de biologia molecular, a escolha da região correta é de grande importância. Geralmente, um gene todo 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 coccídeo. Esta região é conservada e de menor polimorfismo, o que possibilita a identificação do parasito. Já os genes da actina e da proteína do choque térmico (HSp-70), por apresentarem alto polimorfismo intraespecífico são utilizados na análise de espécies e genótipos com similaridade genética (PENG et al., 2003; XIAO et al., 2004).

1.2. *Giardia* spp.

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

O parasito é encontrado no intestino delgado de mamíferos, roedores, aves, répteis e anfíbios. Segundo, Thompson (2004), este protozoário é, atualmente um dos organismos mais estudados do mundo, possivelmente pelo seu forte potencial zoonótico.

Não existem na literatura, estudos aprofundados sobre a especificidade de *Giardia* spp. em aves silvestres. As espécies aviárias *G. psittaci* e *G. ardeae* e a espécie zoonótica, *G. duodenalis*, acometem aves em todo o mundo, com prevalência variando de 5 a 49% em aves silvestres, o que indica potencial papel, desses animais, na transmissão de parasitos intestinais (PLUTZER et al., 2010).

1.2.1. Histórico e Classificação das espécies de *Giardia*

O conceito de rígida especificidade de hospedeiros, proposto por Hegner (1922) dominou a taxonomia da giardiase por vários anos, tendo sido descritas mais de 50 espécies (THOMPSON et al., 1990; KULDA; NOHYNKOVA, 1996; THOMPSON, 2002). A classificação baseava-se na espécie animal do hospedeiro onde era encontrada (LANE; LOYD, 2002), sendo *Giardia bovis* em bovinos, *Giardia canis* em cães, *Giardia cati* em gatos e *Giardia lamblia* no homem (KENNEDY, 1989).

Entretanto, a visão proposta por Hegner em 1922, foi amplamente questionada. A maioria dos pesquisadores concordava que essa ideia era insustentável e eram a favor

da existência de variedade 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 a *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, a partir de técnicas de axenização, microscopia eletrônica e estudos de DNA e RNA, foi possível identificar três novas espécies, denominadas *Giardia psittaci* (ERLANDSEN; BEMRICK, 1987) parasitando periquitos, *Giardia ardeae* (ERLANDSEN et al., 1990) em garças, antes incluídas em *G. duodenalis* e a mais nova espécie descrita *Giardia microti* parasitando roedores do campo (*Microtus ochrogaster*) e do rato almiscarado (*Ondatra zibethicus*) (MONIS et al., 2003).

Atualmente, 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 outros mamíferos podem ser divididos em seis principais genótipos (assemblages), denominados 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 atualmente, estão demonstrados na tabela abaixo:

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, outros primatas, ruminantes domésticos e selvagens, alpacas, suínos, cavalos, cães domésticos e selvagens, gatos, furão, roedores, marsupiais, outros mamíferos	

Continuação

Espécies	Principais hospedeiros	Referência
Assemblage B	Humanos, outros 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	

FENG; 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 ser traçados os papéis do homem e dos animais dentro da giardíase (PLUTZER et al., 2010). Por outro lado, as assemblages C, D, E e F parecem ser genótipos-específicos (PLUTZER et al., 2010).

Diversos trabalhos reportaram a presença de *Giardia* em aves e alguns deles indicam que novas espécies podem ocorrer em aves silvestres (McROBERTS et al., 1996). Baseado em medidas morfométricas, Travis (1939) descreveu quatro novas espécies provenientes de hospedeiros aviários: *G. sturnellae* e *G. melsopizae* em Passeriformes, *G. boutari* em Pelecaniformes e *G. floridae* em Ciconiiformes. Entretanto, além dos genótipos zoonóticos de *G. duodenalis*, somente 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 Garça-real-europeia (*Ardea cinerea*). Posteriormente, Erlandsen et al. (1990), utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), caracterizaram em Garça-azul-grande (*Ardea herodias*), parasito similar ao encontrado por Noller e o nomeou de *G. ardeae*.

Erlandsen; Benrick (1987), pela MEV, caracterizaram trofozoítos de *Giardia* de Piriquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*), como nova espécie, *G. psittaci*, com base na ausência de um flagelo ventrolateral (McROBERTS et al., 1996).

1.1.2. Ciclo biológico

O parasito apresenta dois estágios bem definidos em seu ciclo de vida, o cisto e o trofozoíto. O cisto, forma infectante, é encontrado, frequentemente, em fezes formadas, apresentando alta resistência no ambiente e permanecendo viável por vários meses, principalmente, em locais úmidos (LANE; LLOYD, 2002). O trofozoíto, forma vegetativa do parasito, apresenta dois núcleos de tamanhos iguais na parte anterior, dois axonemas, um disco suatorial ou adesivo ventral, dois corpos médios e quatro pares de flagelos (THOMPSON et al., 1993).

A forma cística, após ingerida, sofre ação do baixo pH gástrico e de enzimas pancreáticas que rompem suas paredes, promovendo o excistamento, e liberando dois trofozoítos. Estes, aderem à mucosa intestinal e sob condições favoráveis, iniciam processo de reprodução assexuada, multiplicando-se por divisão binária, 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).

1.2.3. Patogenia

Infecções por *Giardia* podem afetar aves de todas as idades, entretanto, aves jovens são mais suscetíveis, sendo encontradas altas taxas de mortalidade em filhotes.

Aves infectadas podem apresentar 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. Estas alterações estão correlacionadas com deficiências enzimáticas na borda em escova, diminuindo a digestão e absorção de nutrientes, incluindo os dissacarídeos, 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).

1.2.4. Epidemiologia

Giardíase é infecção parasitária encontrada em aves silvestres no mundo todo. Na Europa, Franssen et al. (2000) identificaram *G. ardeae* em Cegonha-branca (*Ciconia ciconia*), nos Estados Unidos, Erlandsen et al. (1991) observaram prevalência de 55% de *G. ardeae* em gansos e 46% de *G. psittaci* em psitacídeos e Graczyk et al. (1998) encontraram *Giardia* spp. em Gansos-do-Canadá (*Branta canadensis*) e na Austrália, Filippich et al. (1998), encontraram oitos periquitos-australianos parasitados por *G. psittaci* em cativeiros de reprodução. Entretanto, no Brasil, não há estudos recentes sobre *Giardia* spp. em aves silvestres.

Assim como oocistos de *C. parvum*, cistos de *G. duodenalis* (genótipo humano) provenientes de mamíferos também podem ser encontrados em aves, tornando este parasito organismo de grande potencial zoonótico. Plutzer e Tomor (2009) observaram prevalência de 5,8% de *G. duodenalis* (assemblage A e B) em aves silvestres e 24% em aves domésticas. Majewska et al. (2009) relataram que 5,2% das amostras fecais analisadas, provenientes de dez ordens distintas de aves, foram positivas para *G. duodenalis* (assemblage A e B) e mais recentemente, Papini et al. (2012), identificaram 5,3% de psitacídeos infectados pela assemblage A do parasito.

1.2.5. Diagnóstico

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 demonstrar o parasito, 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 mais conservada. Entretanto, a genotipagem dos genes β -giardin (*bg*), glutamato dehidrogenase (*gdh*) e triosefosfato isomerase (*tpi*), providencia informações mais detalhadas dos subgrupos dos genótipos de *G. duodenalis*, uma vez que esses genes possuem sequências polimórficas capazes de diferenciar os genótipos de forma mais precisa.

1.3. Papel das aves na transmissão de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. são patógenos ubíquos no ambiente que podem desenvolver doenças graves no homem e nos animais, sendo frequentemente veiculados pela água (MAJEWSA et al., 2009).

De acordo com Gale; Stanfield (2000), os protozoários patogênicos vêm se tornando agentes que estão envolvidos na transmissão de doenças de veiculação hídrica. Esses organismos são resistentes às condições adversas do ambiente e também capazes de causar infecções mesmo em baixas doses infectantes.

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em fontes de água representa séria ameaça à saúde pública, visto que esses parasitos têm causado diversos surtos relacionados às águas de consumo e recreacionais (KARANIS et al., 2007). Nos últimos 28 anos, ocorreram 524 episódios em todo o mundo, destacando-se o período compreendido entre 1984 e 2004 (KARANIS et al., 2007) e, posteriormente, de 2004 a 2010 (BALDURSSON; KARANIS, 2011), com 325 e 199 surtos epidêmicos, respectivamente.

Existem muitas fontes de contaminação ambiental de “habitats” aquáticos por esses patógenos. Descargas de águas residuais em águas de superfície podem causar acúmulo de oocistos e cistos em fontes de água potável e, conseqüentemente, impacto negativo na saúde pública (KARANIS et al., 2007). Além disso, vários animais podem propagar e disseminar os parasitos no ambiente. De acordo com Graczyk et al. (2008), diversas espécies de aves de vida livre, de cativeiro e domésticas podem excretar oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos *Giardia* spp. e passá-los mecanicamente para fontes de água (GRACZYK et al., 1998; ZHOU et al., 2004). Entretanto, o papel das aves como contaminantes de “habitats” aquáticos é pouco estudado (GRACZYK et al., 2008). Fontes de água potável ou águas de recreação não são rotineiramente monitorados, apesar de existirem evidências claras que demonstram a associação

zoonótica com aves, principalmente, espécies de aves aquáticas (GRACZYC et al., 2008).

De acordo com o trabalho desenvolvido por Majewska et al. (2009), a presença de *C. parvum* e *G. duodenalis* foi significativamente maior em aves de vida livre e em aves aquáticas e segundo os resultados de Plutzer e Tomor (2009), aves aquáticas como patos, gansos e corvos-marinheiros foram de extrema importância na disseminação ambiental dos parasitos.

C. parvum (genótipo bovino) e *G. duodenalis* (assemblages A e B), são as principais espécies relacionadas a surtos epidêmicos de transmissão pela água, devido ao caráter zoonótico. Esses parasitos são oportunistas e causam diarreia profusa em indivíduos imunodeficientes, principalmente pacientes HIV positivos (MORGAN et al., 2000; CAREY et al., 2004). Entretanto, outras espécies, entre elas, *C. meleagridis*, têm sido relatadas em seres humanos, sendo considerado patógeno humano emergente (XIAO; FAYER, 2008).

Justificativa

Infecções parasitárias estão entre os problemas sanitários mais comuns que acometem aves silvestres. Além de provocarem impactos econômicos na indústria avícola e influenciarem em aspectos da ecologia, evolução e conservação das espécies, representam 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.

Entre os parasitos que são facilmente disseminados no ambiente por hospedeiros aviários destacam-se *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Nos últimos anos, esses patógenos são relatados como os principais agentes etiológicos causadores de surtos epidêmicos de transmissão hídrica, mostrando a importância epidemiológica das aves na disseminação ambiental de oocistos e cistos, respectivamente. Mas, apesar de serem potenciais veiculadoras de doenças, poucos estudos descrevem o papel das aves silvestres na cadeia de transmissão desses parasitos.

Dessa forma, trabalhos que relatem a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em aves silvestres são de extrema importância para o melhor entendimento do papel desses animais na contaminação ambiental por parasitos. Estudos nesse sentido facilitarão a elaboração de estratégias de benfeitorias na saúde pública e de planos de manejos adequados que visem à conservação e manutenção das espécies de aves silvestres no Brasil.

Objetivos

3.1. Objetivo geral

Determinar a ocorrência e caracterizar geneticamente as espécies e ou genótipos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em aves silvestres de cativeiro e de vida livre na microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar, por meio de nested-PCR e semi-nested PCR, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., respectivamente, em aves silvestres de cativeiro e de vida livre na microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil;
- Comparar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre aves silvestres de cativeiro e de vida livre;
- Comparar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre aves aquáticas e não aquáticas;
- Determinar as espécies de *Cryptosporidium* encontradas em aves silvestres, por meio de análises de RFLP-PCR e sequenciamento;
- Determinar as espécies de *Giardia* e genótipos de *G. duodenalis* encontrados em aves silvestres, por meio do sequenciamento.
- Avaliar se os isolados possuem potencial zoonótico, estabelecendo o papel das aves silvestres na disseminação ambiental dos patógenos;

Material e Métodos

4.1. Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), sob o protocolo número 111/11 (Anexo A).

4.2. Área de Estudo

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 uma vegetação sob domínio do Cerrado (*lato sensu*), que atualmente está restrito a pequenas reservas isoladas, tendo em seu 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).

4.3. Local de Estudo

4.3.1. Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS)

O LAPAS é setor vinculado à Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O ambulatório do LAPAS atende animais silvestres da microrregião de Uberlândia, de diferentes famílias, gêneros e espécies com problemas de saúde e animais que são apreendidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pela Polícia Ambiental.

Atualmente, o laboratório é coordenado pelo Professor Doutor André Luiz Quagliatto Santos (CRMV-MG 2401) e a residente em Medicina Veterinária Lorena Leal Rodrigues (CRMV-MG 12374) é a responsável pelo atendimento clínico, avaliação médica e tratamento dos animais.

Ao chegarem ao ambulatório do LAPAS, os animais silvestres levados por seus proprietários, recebem atendimento médico veterinário. O animal é diagnosticado e posteriormente, é realizada prescrição de medicação, caso haja necessidade. Após a consulta, o proprietário deixa o ambulatório de posse de seu animal.

Quando os animais chegam por intermédio do IBAMA ou da Polícia Ambiental, são encaminhados para o ambulatório onde é realizada triagem e avaliação das aves. Os animais saudáveis, são vermifugados e mantidos em quarentena, para em seguida, serem encaminhados ao viveiro do LAPAS. Neste local, os animais permanecem até o retorno do IBAMA, o qual promove a soltura em áreas de reserva florestal no município de Uberlândia e região.

Os animais doentes encaminhados pelo IBAMA recebem tratamento adequado, permanecendo no ambulatório tempo necessário para total recuperação. Os sadios são levados para o viveiro, permanecendo no local até o retorno do IBAMA.

As aves encaminhadas ao LAPAS são mantidas em gaiolas separadas, higienizadas diariamente e recebem como alimentação, frutas, ração e água da torneira.

Antes do início do estudo, foi realizada reunião com o coordenador do LAPAS, para explicar os objetivos e delineamento do trabalho e obter a devida autorização permitindo a realização da pesquisa com os animais que chegam ao ambulatório (Anexo B).

O Acordo de Cooperação Técnica nº 02/2011, assinado entre IBAMA e UFU, sustenta a possibilidade de aproveitamento de qualquer material oriundo dos animais silvestres atendidos no Hospital Veterinário, sem licença específica (Disponível no Diário Oficial da União, do dia 29/09/11, seção 3, pag. 130).

4.3.2. Zoológico do Parque Municipal do Sabiá

O Parque Municipal do Sabiá está localizado a aproximadamente seis quilômetros do centro da cidade de Uberlândia, MG, entre os bairros Tibery e Santa

Mônica, possuindo área total de 185 hectares (ha), dos quais cerca de 35 são de remanescentes de vegetação nativa (GUILHERME et al., 1998).

O zoológico do Parque conta com estrutura adequada para manter em seu interior mais de 200 espécies animais. Dentre as instalações, o zoológico conta com lagos artificiais, onde habitam aves aquáticas de diferentes espécies. As aves permanecem em recintos cercados ou transitando livremente em áreas próximas aos lagos.

As aves aquáticas são alimentadas diariamente, com ração e frutas e têm como fonte de água, os lagos onde estão localizadas.

Autorização assinada pelo diretor do zoológico, Sr. Gustavo Cavinato Herrera, foi obtida antes do início das coletas (Anexo C).

4.4. População de Estudo

Foram incluídas nesta pesquisa, aves silvestres que permaneceram no ambulatório do LAPAS por pelo menos três dias, não importando a espécie, origem ou condições de saúde do animal. Durante os dias de realização das coletas de fezes, os animais não receberam nenhum tipo de droga antiparasitária.

As aves silvestres foram distinguidas em aves de cativeiro e de vida livre, de acordo com os critérios estabelecidos pelo LAPAS. Foram consideradas aves de cativeiro, aquelas provenientes de propriedades particulares ou criatórios e aves de vida livre, aquelas que chegaram ao ambulatório imediatamente após sua remoção do “habitat” natural.

Amostras fecais de aves aquáticas provenientes do Zoológico do Parque Municipal do Sabiá situado em Uberlândia, Minas Gerais, também foram incluídas no estudo. Foram coletadas amostras fecais das aves dos recintos fechados e das aves que transitavam livremente pelo local. Todas as aves do zoológico foram consideradas de cativeiro.

4.5. Coleta das amostras

No LAPAS, as coletas fecais foram realizadas de forma individual. As fezes frescas foram retiradas do piso das gaiolas desinfetadas previamente com hipoclorito e depositadas em tubos de poliestileno identificados (espécie, família ou gênero a qual

pertence o animal, número correspondente do indivíduo e número da coleta), sendo a primeira coleta realizada no dia em que o animal chegava ao local. As duas coletas subsequentes foram efetuadas, em dias alternados devido o padrão intermitente de eliminação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp.

No zoológico, as amostras das aves aquáticas foram colhidas diretamente do chão, em forma de “pool”, pois os animais se encontravam livres e aglomerados. As quatro áreas onde as aves transitavam foram divididas em quadrantes de, aproximadamente, 80m². Todas as fezes frescas presentes em cada quadrante foram coletadas, formando-se um “pool” amostral (Figura 1). As coletas foram realizadas em trélicas, em dias alternados, em todos os quadrantes.

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.

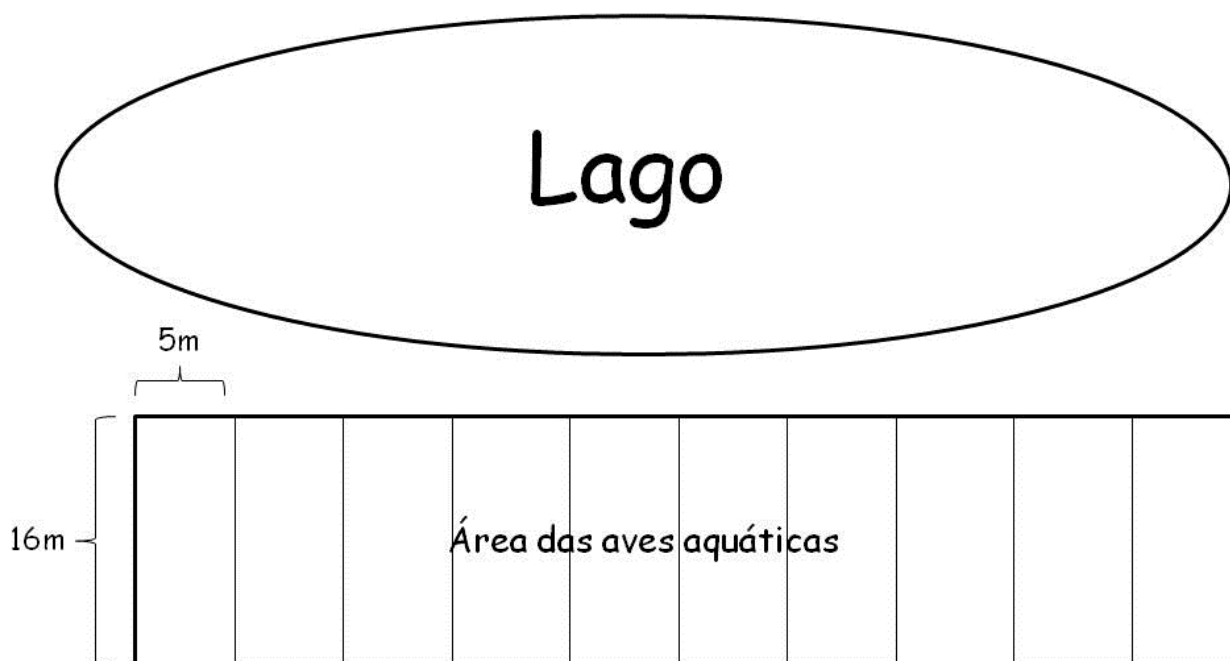


Figura 1: Exemplo esquemático da divisão das áreas onde se localizavam as aves aquáticas. Cada quadrante foi considerado um “pool” amostral.

4.6. Armazenamento das amostras fecais

Assim que chegaram no laboratório de parasitologia, as amostras fecais foram mantidas a -20° C até o momento da extração do DNA.

4.7. Extração do 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) às fezes com o tampão de lise do “kit”, com posterior agitação vigorosa após aquecimento à 95°C por 10 minutos. Essa modificação foi realizada com o intuito de facilitar o rompimento dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. O DNA foi eluído em 200 µL de tampão e armazenado em freezer a -20°C.

4.8. Diagnóstico molecular e Identificação das espécies de *Cryptosporidium*

4.8.1. Reação de nested-PCR

A primeira etapa da reação de nested-PCR (n-PCR) destinou-se a amplificar um fragmento de aproximadamente 1.325pb do gene que codifica a região hipervariável da subunidade ribossômica menor (SSU rRNA) de *Cryptosporidium*, utilizando-se os iniciadores 18SX1F: (5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3') e 18X1R: (5'- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'), de acordo com os protocolos de Xiao et al., 1999; Xiao et al., 2000. A reação foi realizada em volume final de 25 µL de uma solução contendo 6 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada um dos quatro nucleotídeos, 10pmol de cada iniciador, 2,5U de *Taq* DNA Platinum (Invitrogen), tampão composto de Tris-HCl 10 mM, pH= 8,3 e KCl 50 mM e 5 µL de cada amostra de DNA. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada reação. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C (3 min) e de 35 ciclos térmicos para desnaturação a 94°C (45s), associação 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, que produziu um fragmento específico de aproximadamente 819-825pb (produto secundário) utilizando os iniciadores 18SX2F: (5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3') e 18SX2R: (5'- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'). A reação foi realizada nas mesmas condições descritas para a primeira etapa de amplificação, diferindo apenas no tempo da extensão a 72° que será de 40 segundos.

4.8.2. Reações 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 abaixo:

Tabela 3: Análise de RFLP-PCR do gene SSU rDNA de várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. (adaptado de Xiao et al., 1999; Xiao et al., 1999, Xiao et al., 2001). Os nomes com asterisco referem-se a *C. parvum* genótipo humano (*C. hominis**) e *C. parvum* genótipo dog (*C. canis***), do original do trabalho de 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. wairi</i>	Porquinho da Índia	11, 109, 254, 449	102, 104, 628
<i>C. andersoni/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

4.9. Diagnóstico molecular e identificação das espécies de *Giardia*

O diagnóstico molecular de *Giardia* spp. foi realizado usando protocolo baseado em reação de semi-nested PCR. Fragmentos de 432 pares de bases do gene *glutamato dehidrogenase (gdh)* foram amplificados, de acordo com a metodologia previamente descrita por Read et al., 2004. Na primeira amplificação, os iniciadores utilizados foram GDHeF: (5'- TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT – 3') e GDHiR: (5 – GTT RTC CTT GCA CAT CTC C – 3'). Para a segunda fase da reação (Semi-nested), os iniciadores usados foram GDHiF: (5' – CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG – 3') e novamente, o iniciador GDHiR: (5 – GTT RTC CTT GCA CAT CTC C – 3'). A reação foi realizada em volume final de 25 µL de uma solução contendo 50 mM de MgCl₂, 5 mM de uma solução contendo cada um dos quatro oligonucleotídeos, 50pmol de cada iniciador, 1,25U de *Taq* DNA Platinum (Invitrogen), tampão composto de Tris-HCl 10 mM, pH= 8,3 e KCl 50 mM e 2,5 µL de cada amostra de DNA. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada reação. As condições de amplificação foram: um ciclo de 94°C por dois minutos, um ciclo de 56°C por um minuto, um ciclo de 72°C por dois minutos, 55 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 20 segundos e 72°C por 45 segundos e extensão final de 7 minutos a 72°C. Foram adicionados 2,5µl do produto de PCR da reação primária à reação secundária. Para a segunda fase da reação (semi-nested PCR) o protocolo seguiu as mesmas condições de temperaturas e tempos descritos acima para a reação de PCR.

4.10. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações da nested-PCR e semi-nested PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) [1M Tris-HCl (pH 8.0), 0,83M ácido bórico, 20mM EDTA] e revelados com Brometo de Etídio (0,5µg/mL). O gel foi observado em transluminador ultravioleta, para a visualização dos produtos amplificados e os fragmentos de DNA foram analisados, comparativamente, com marcadores de DNA de 100 pares de base.

4.11. Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento

Após a separação dos produtos da PCR em gel de agarose a 2,0%, as bandas de interesse foram purificadas com *Sephacryl S-400 HR* (GE Healthcare, UK). As reações de sequenciamento foram realizadas no sentido *Foward*, utilizando-se o reagente *BigDye terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* e sequenciadas em analisador de ácidos nucleicos ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.12. Avaliação, edição e alinhamento das sequências

Os cromatogramas das sequências obtidas foram avaliados usando *Sequence Scanner* (version 1.0; Copyright Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências de nucleotídeos de cada amostra amplificada foram alinhadas com o auxílio da ferramenta Clustal W do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). As seguintes sequências referência disponíveis no GenBank foram utilizadas para *Cryptosporidium* spp.: EU827312 para *C. meleagridis*, AF093495 *C. baileyi*, AY168848 *C. galli*, GQ227479 genótipo aviário I, DQ002931 genótipo aviário II, DQ650342 genótipo aviário III, DQ650344 genótipo aviário IV, AY273769 genótipo de galinhola, AF316630 genótipo de pato, AY120912 genótipo de ganso I, AY504512 genótipo de ganso II, AY324638 genótipo de ganso III, AY324641 genótipo de ganso IV e AF093490 *C. parvum*. Para *Giardia* spp. foram utilizadas as sequências referência: M84604.1 para *G. duodenalis* Sub-Assemblage AI, AY178737.1 *G. duodenalis* Sub-Assemblage AII, AY826193.1 *G. duodenalis* Sub-Assemblage BIII, AY178738.1 *G. duodenalis* Sub-Assemblage BIV, U60982.2 *G. duodenalis* assemblage C, U60986.2 *G. duodenalis* Assemblage D, AY178741.1 *G. duodenalis* assemblage E, AF069057.2 *G. duodenalis* Assemblage F, AF069060.2 *G. ardeae* e AB714978.1 *G. psittaci*.

A análise filogenética foi realizada usando “Neighbour-Joining” (NJ) implementada no programa MEGA v.5.1 Beta e os valores de “bootstrap” foram calculados pela análise de 1000 réplicas.

Diagrama esquemático das etapas do trabalho está demonstrado na Figura 2.

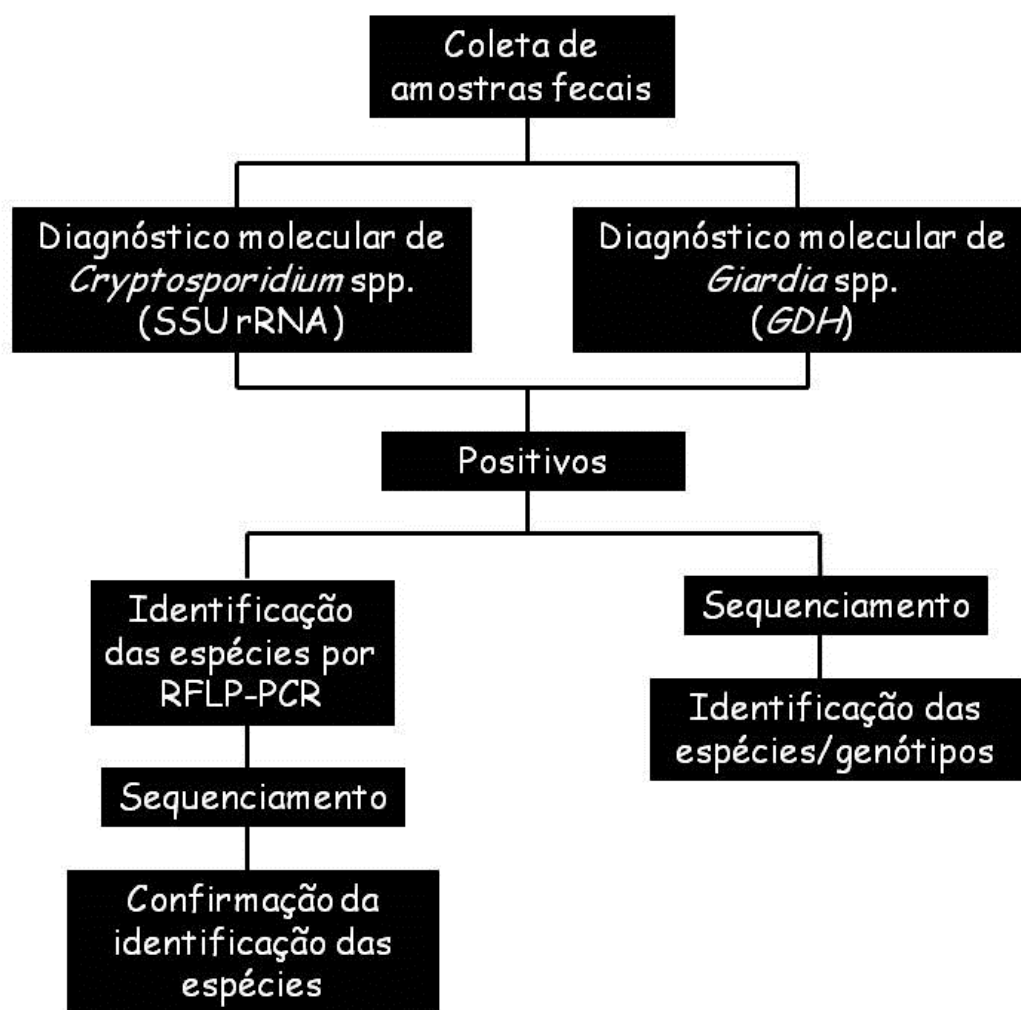


Figura 2: Diagrama esquemático do fluxograma de etapas do estudo.

4.13. Análise Estatística

Os dados foram armazenados e analisados pelo programa BioEstat versão 5.0. Nas comparações entre duas amostras independentes foi utilizado o teste binomial de duas proporções. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

5.1. Amostras coletadas

Foram coletadas 256 amostras de fezes de aves silvestres, em 12 meses de coleta (março 2011 a fevereiro de 2012). No LAPAS, 218 amostras foram colhidas de aves pertencentes a 29 espécies de 16 famílias (Psittacidae, Tyrannidae, Mimidae, Accipitridae, Falconidae, Cathartidae, Strigidae, Tytonidae, Ramphastidae, Trochilidae, Columbidae, Cacatuidae, Icteridae, Emberizidae, Rallidae e Threskiornithidae) (Tabela 4). No zoológico do Parque Municipal do Sabiá foram coletadas 38 amostras (“pool”) de aves aquáticas (Família Anatidae) (Tabela 4).

Do total de aves silvestres, 172 (67,2%) de cativeiro e 84 (32,8) de vida livre e 39 (15,2) de aves aquáticas e 217 (84,8) não aquáticas (Tabela 5).

Tabela 4: Espécies e famílias de aves silvestres procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas amostras de fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Espécie	Família	Nome popular	Nº animais
<i>Brotogeris chiriri</i> ^{a,b,2}	Psittacidae	Periquito-de-encontro-amarelo	30
<i>Aratinga leucophthalma</i> ^{a,b,2}	Psittacidae	Maritaca/Periquitão-maracanã	32
<i>Amazona aestiva</i> ^{a, b, 2}	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	56
<i>Amazona amazônica</i> ^{b, 2}	Psittacidae	Papagaio-do-mangue/Curica	4
<i>Amazona xanthops</i> ^{b,2}	Psittacidae	Papagaio-galego	7
<i>Aratinga aurea</i> ^{a,b,2}	Psittacidae	Piriquito-rei	6
<i>Melopsittacus undulatus</i> ^{b,2}	Psittacidae	Piriquito-australiano	1
<i>Ara nobilis</i> ^{b,2}	Psittacidae	Maracanã-nobre	2
<i>Ara ararauna</i> ^{a,2}	Psittacidae	Arara-canindé	2
<i>Pitangus sulphuratus</i> ^{a,2}	Tyrannidae	Bem-te-vi	8
<i>Mimus saturninus</i> ^{a,2}	Mimidae	Sabiá-do-campo	2
<i>Rupornis magnirostris</i> ^{a,2}	Accipitridae	Gavião-carijó	10
<i>Heterospizias meridionalis</i> ^{a,2}	Accipitridae	Gavião-caboclo	3
<i>Polyborus plancus</i> ^{a,2}	Falconidae	Carcará	11
<i>Falco sparverius</i> ^{a,2}	Falconidae	Quiriquiri	2
<i>Coragyps atratus</i> ^{a,2}	Cathartidae	Urubu-de-cabeça-preta	3

Continuação

Espécie	Família	Nome popular	Nº animais
<i>Asio clamator</i> ^{a,2}	Strigidae	Coruja-orelhuda	1
<i>Athene cunicularia</i> ^{a,2}	Strigidae	Coruja-buraqueira	6
<i>Tyto Alba</i> ^{a,2}	Tytonidae	Coruja-suindara	2
<i>Ramphastos toco</i> ^{a,b,2}	Ramphastidae	Tucano	10
<i>Eupetomena macroura</i> ^{a,2}	Trochilidae	Beija-flor-tesoura	2
<i>Colibri serrirostris</i> ^{a,2}	Trochilidae	Beija-flor-de-orelha-violeta	1
<i>Columbina talpacoti</i> ^{a,2}	Columbidae	Rolinha caldinho-de-feijão/roxa	1
<i>Columba lívia</i> ^{a,2}	Columbidae	Pombo-doméstico	7
<i>Nymphicus hollandicus</i> ^{b,2}	Cacatuidae	Calopsita/Caturra	3
<i>Gnorimopsar chopi</i> ^{a,2}	Icteridae	Pássaro-preto/Graúna	1
<i>Sporophila angolensis</i> ^{a,2}	Emberizidae	Curió	2
<i>Gallinula galeata</i> ^{a,1}	Rallidae	Galinha d'água	2
<i>Theristicus caudatus</i> ^{a,2}	Threskiornithidae	Curicaca	1
	Anatidae ^{b,1}	Aves aquáticas	38
Total			256

^a Aves de vida-livre ^b Aves de cativeiro ¹ Aves aquáticas ² Aves não-aquáticas

Tabela 5: Grupo e número de aves silvestres procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

	Aquática	Não aquática	Total
Cativeiro	38	134	172
Vida livre	1	83	84
Total	39	217	256

5.2. *Cryptosporidium* spp.

5.2.1. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp.

Do total das 256 amostras coletadas, 10 (3,9%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. após análise pela nested-PCR (Figura 3 e Tabela 6).

Das amostras positivas para o parasito, seis (3,49%) eram de aves de cativeiro, pertencentes às famílias Anatidae (patos, marrecos e gansos) e Psittacidae (*Amazona aestiva* e *Amazona amazônica*) e quatro (4,76%) eram de aves de vida livre das famílias Psittacidae (*Aratinga leucophthalma*) e Strigidae (*Athene cunicularia*) (Tabela 7). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na ocorrência de *Cryptosporidium* spp. entre os grupos de aves de cativeiro e vida livre ($p=0,62$) (Tabela 7).

A nested-PCR para *Cryptosporidium* spp. foi positiva em duas (5,13%) amostras de fezes de aves aquáticas da família Anatidae (patos, marrecos e gansos) e em oito (3,7%) amostras de aves não aquáticas das famílias Psittacidae (*Amazona aestiva*, *Amazona amazônica* e *Aratinga leucophthalma*) e Strigidae (*Athene cunicularia*) (Tabela 8).

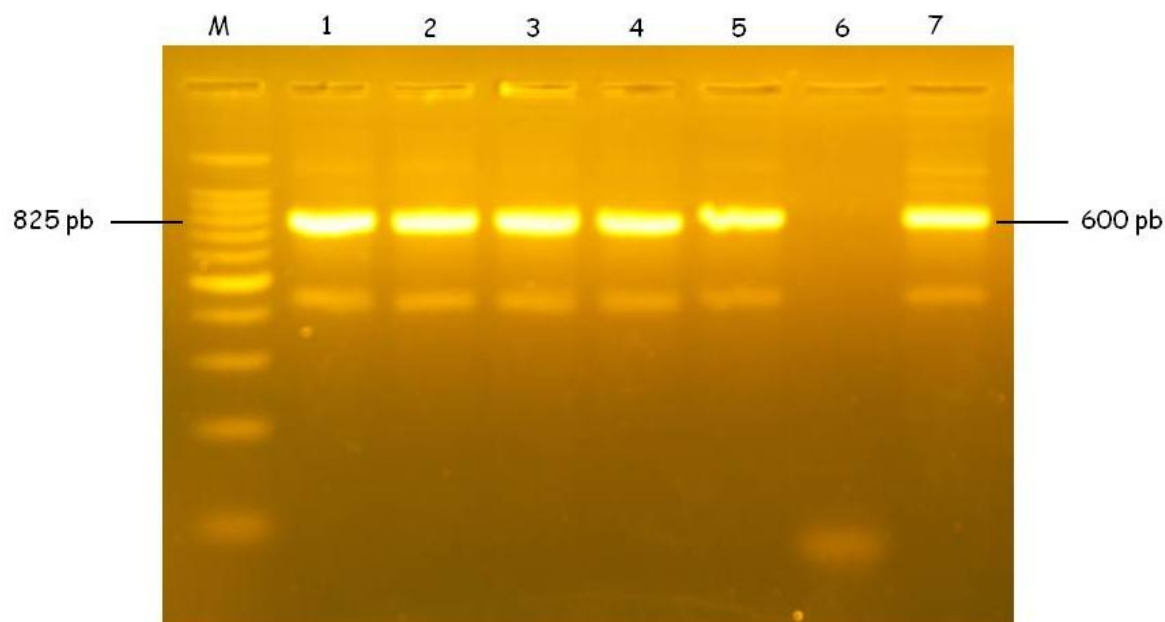


Figura 3: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de aproximadamente 825 pares pb do gene SSU rDNA de *Cryptosporidium* spp., amplificado pela nested-PCR a partir do DNA obtido de amostras de fezes de aves de cativeiro e vida livre, na microrregião de Uberlândia, MG. Linha M: Marcador molecular de 100 pares de base; Linha 1 a 5: Amostras positivas para *Cryptosporidium* spp.; Linha 6: Branco; Linha 7: Controle positivo (*C. parvum*).

Tabela 6: Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. a partir do número amostral total de aves silvestres, procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, no município de Uberlândia, MG.

Hospedeiro	Total de amostras	Nº de amostras positivas
Maritaca (<i>Aratinga leucophthalma</i>)	32	2
Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	56	3
Papagaio-do-mangue (<i>Amazona amazonica</i>)	4	1
Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	6	2
Patos, marrecos e gansos (Anatidae)	38	2
25 outras espécies	120	0
Total	256	10 (3,9%)

Tabela 7: Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em aves silvestres de cativeiro e de vida livre procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Hospedeiro	Nº de aves cativeiro	Positivas	Nº de aves vida livre	Positivas	p-valor*
Maritaca (<i>Aratinga leucophthalma</i>)	26	0	6	2	0,62
Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	55	3	1	0	
Papagaio-do-mangue (<i>Amazona amazonica</i>)	4	1	0	0	
Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	0	0	6	2	
Patos, marrecos e gansos (Anatidae)	38	2	0	0	
25 outras espécies	49	0	71	0	
Total	172	6 (3,49%)	84	4 (4,76%)	

* $p \leq 0,05$

Tabela 8: Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em aves silvestres aquáticas e não aquáticas procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Aves aquáticas			Aves não aquáticas		
Hospedeiro	n	Pos.	Hospedeiro	n	Pos.
Patos, marrecos e gansos (Anatidae)	38	2	Maritaca (<i>Aratinga leucophthalma</i>)	32	2
			Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	56	3
			Papagaio-do-mangue (<i>Amazona amazonica</i>)	4	1
			Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	6	2
Outros	1	0	Outros	119	0
Total	39	2 (5,13%)	Total	217	8 (3,7%)

* $p \leq 0,05$

5.2.2. Identificação das espécies de *Cryptosporidium* spp.

Análises de RFLP-PCR dos produtos dos fragmentos do gene SSU rDNA identificaram a presença de duas espécies nas amostras positivas, *C. meleagridis*, que apresentou leituras aproximadas de 108pb, 254pb e 449 pb com a enzima *SspI* e 102(104)pb, 171 pb e 456pb com a enzima *VspI* e *C. baileyi*, cujas leituras aproximadas foram 254pb e 572pb com a enzima *SspI* e 102(104)pb, 171pb e 456pb com a enzima *VspI* (Figura 4). *C. meleagridis* foi identificado em duas aves da família Anatidae (aves aquáticas) de cativeiro, duas *Aratinga leucophthalma* (Maritaca) de vida livre e duas *Athene cunicularia* (Coruja-buraqueira) de vida livre e *C. baileyi* em três *Amazona aestiva* (Papagaio-verdadeiro) e uma *Amazona amazônica* (Papagaio-do-mangue), todas de cativeiro (Tabela 9).

Quando as sequências do presente estudo foram submetidas ao BLAST, as espécies *C. baileyi* e *C. meleagridis* isoladas das diferentes aves, exibiram 100% de similaridade com sequências depositadas no GenBank (Tabela 9).

Na comparação entre as sequências obtidas nesse estudo e as sequências referência, observou-se que todas as sequências de *C. meleagridis* e *C. baileyi* foram homólogas às referência. A árvore filogenética das espécies de *Cryptosporidium* encontradas e as sequências referência utilizadas estão demonstradas na figura 5.

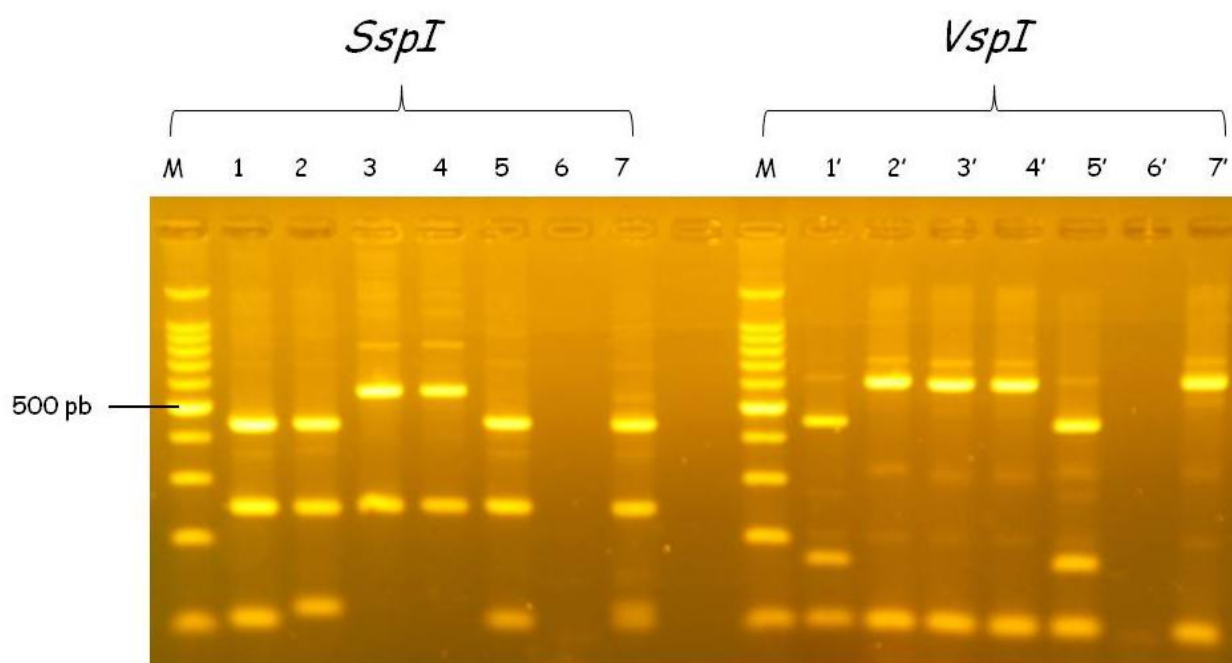


Figura 4: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando o perfil das amostras positivas na nestes-PCR após digestão com as enzimas *SspI* e *VspI*. M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base; 1, 3, 4 e 5: Amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. digeridas pela enzima *SspI*; 2 e 7: Controle positivo (*C. parvum*); 6: Branco; 1', 3', 4', 5': amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. digeridas pela enzima *VspI*, 2' e 7': controle positivo (*C. parvum*); 6': branco.

Tabela 9: Resultados de RFLP-PCR e sequenciamento das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp.

Isolado	Hospedeiro	*Enzima <i>SspI</i> (pb)	*Enzima <i>VspI</i> (pb)	Resultado RFLP	Nº acesso GenBank	Resultado Blast
Cry1UDI	Ave aquática (Anatidae)	108, 254, 449	102(104), 171, 456	<i>C. meleagridis</i>	JX416368.1	<i>C. meleagridis</i>
Cry2UDI	Ave aquática (Anatidae)	108, 254, 449	102(104), 171, 456	<i>C. meleagridis</i>	JX416368.1	<i>C. meleagridis</i>
Cry3UDI	Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	254, 572	102(104), 620	<i>C. baileyi</i>	JQ413445.1	<i>C. baileyi</i>
Cry4UDI	Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	254, 572	102(104), 620	<i>C. baileyi</i>	JQ413445.1	<i>C. baileyi</i>
Cry5UDI	Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	254, 572	102(104), 620	<i>C. baileyi</i>	JQ413445.1	<i>C. baileyi</i>
Cry6UDI	Papagaio-do-mangue (<i>Amazona amazonica</i>)	254, 572	102(104), 620	<i>C. baileyi</i>	GQ426096.1	<i>C. baileyi</i>
Cry7UDI	Maritaca (<i>Aratinga leucophthalma</i>)	108, 254, 449	102(104), 171, 456	<i>C. meleagridis</i>	JX416368.1	<i>C. meleagridis</i>
Cry8UDI	Maritaca (<i>Aratinga leucophthalma</i>)	108, 254, 449	102(104), 171, 456	<i>C. meleagridis</i>	JX416368.1	<i>C. meleagridis</i>
Cry9UDI	Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	108, 254, 449	102(104), 171, 456	<i>C. meleagridis</i>	JX416368.1	<i>C. meleagridis</i>
Cry10UDI	Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	108, 254, 449	102(104), 171, 456	<i>C. meleagridis</i>	JX416368.1	<i>C. meleagridis</i>

* XIAO et al., 1999; XIAO et al., 2001

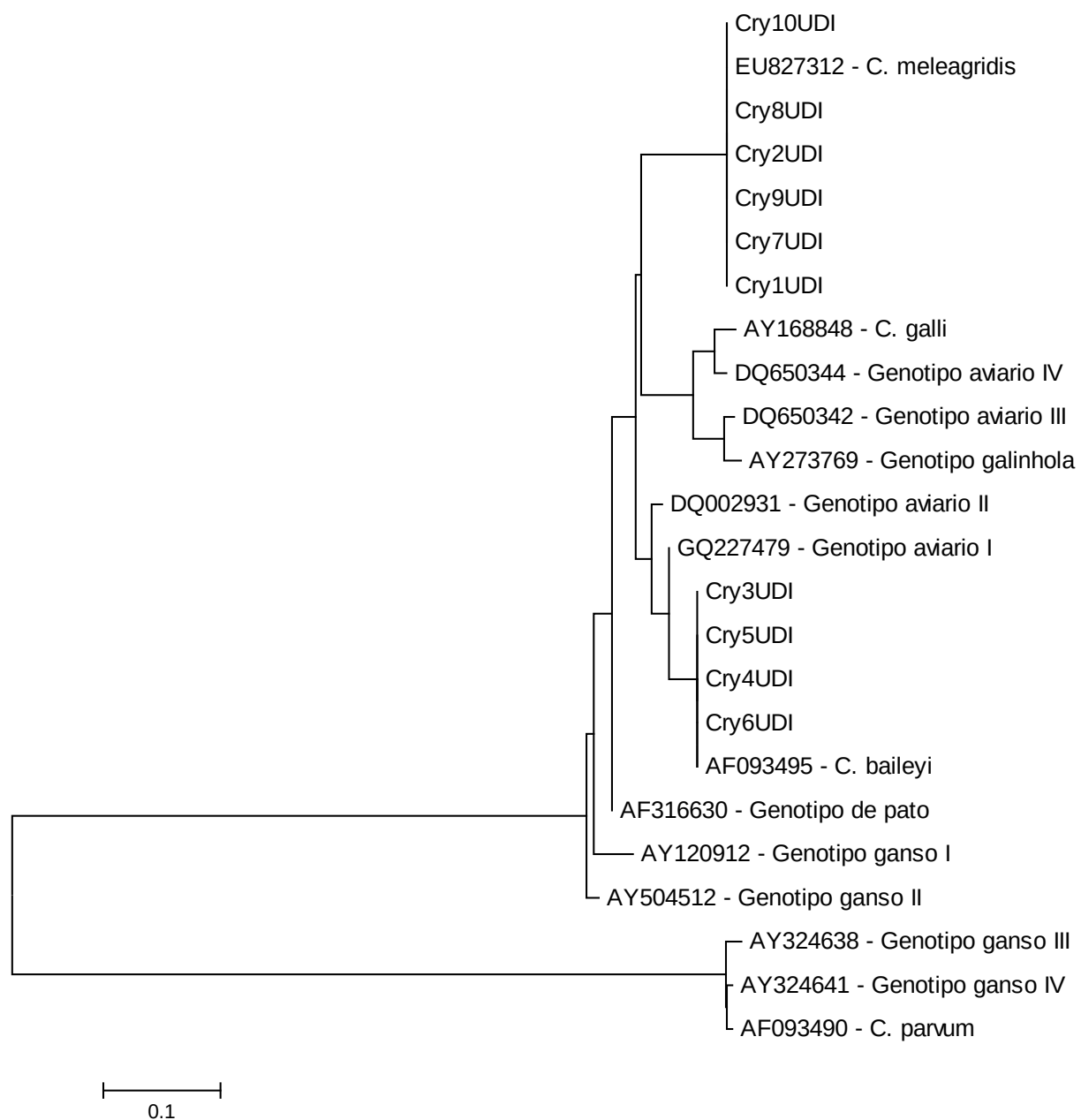


Figura 5: Relações filogenéticas das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. caracterizados pelo sequenciamento do gene SSU rDNA inferidas pela análise Neighbour-Joining. Valores de “bootstrap” estabelecidos em 1000 réplicas.

5.3. *Giardia* spp.

5.3.1. Ocorrência de *Giardia* spp.

Das 256 amostras coletadas, oito (3,1%) foram positivas para *Giardia* spp. após análise pela semi-nested PCR (Figura 6 e Tabela 10).

Das amostras positivas para o parasito, quatro (2,32%) eram de aves de cativeiro pertencentes à família Anatidae (patos, marrecos e gansos) e quatro (4,76) eram de aves de vida livre, das famílias Strigidae (*Asio Clamator*), Threskiornithidae (*Theristicus caudatus*) e Accipitridae (*Rupornis magnirostris*) (Tabela 11). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na ocorrência de *Giardia* spp. entre os grupos de aves de cativeiro e vida livre ($p=0,29$) (Tabela 11).

A semi-nested PCR para *Giardia* spp. foi positiva em quatro (10,26%) amostras de fezes de aves aquáticas da família Anatidae (patos, marrecos e gansos) e em quatro (1,84%) aves não aquáticas das famílias Strigidae (*Asio Clamator*), Threskiornithidae (*Theristicus caudatus*) e Accipitridae (*Rupornis magnirostris*) (Tabela 12).

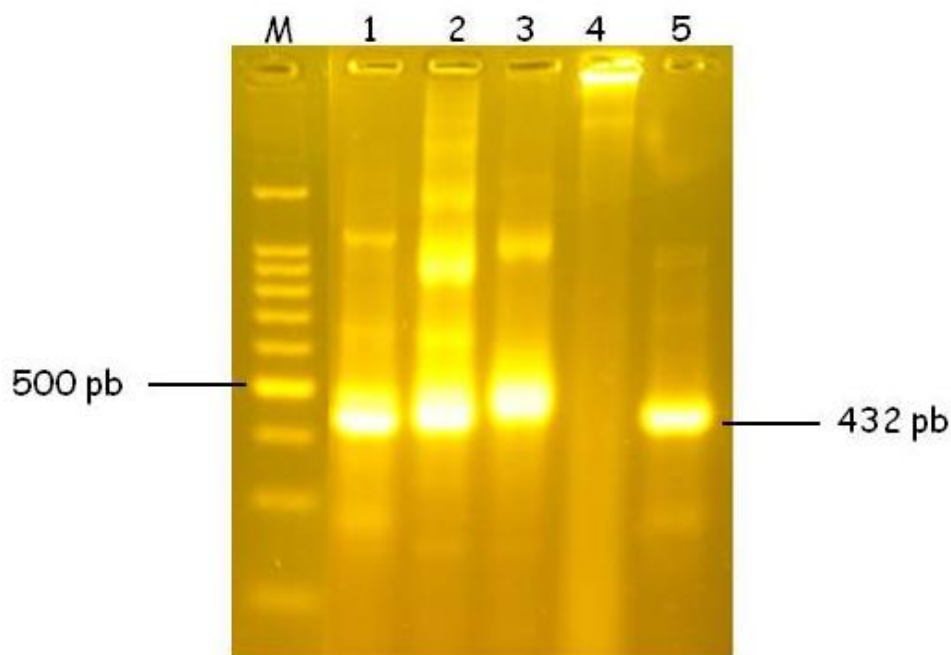


Figura 6: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de aproximadamente 432 pares pb do gene *gdh* de *Giardia* spp., amplificado pela semi-nested PCR a partir do DNA obtido de amostras de fezes de aves de cativeiro e vida livre, na microrregião de Uberlândia, MG. Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base; Linha 1 a 3: Amostras positivas para *Giardia* spp.; Linha 4: Branco; Linha 5: Controle positivo (*G. duodenalis*).

Tabela 10: Ocorrência de *Giardia* spp. a partir do número amostral total de aves silvestres procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Hospedeiro	Tamanho da amostra	Nº de amostras positivas
Coruja-orelhuda (<i>Asio clamator</i>)	1	1
Curicaca (<i>Theristicus caudatus</i>)	1	1
Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	10	2
Patos, marrecos e gansos (Anatidae)	38	4
26 outras espécies	206	0
Total	256	8 (3,1%)

Tabela 11: Ocorrência de *Giardia* spp. em aves silvestres de cativeiro e de vida livre procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Host	Nº de aves cativeiro	Positivas	Nº de aves vida livre	Positivas	p-valor*
Coruja-orelhuda (<i>Asio clamator</i>)	0	0	1	1	0,29
Curicaca (<i>Theristicus caudatus</i>)	0	0	1	1	
Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	0	0	10	2	
Patos, marrecos e gansos (Anatidae)	38	4	0	0	
26 outras espécies	134	0	72	0	
Total	172	4 (2,32%)	84	4 (4,76%)	

* $p \leq 0,05$

Tabela 12: Ocorrência de *Giardia* spp. em aves silvestres aquáticas e não aquáticas procedentes do LAPAS e do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, das quais foram obtidas fezes, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, na microrregião de Uberlândia, MG.

Hospedeiro	n	Pos.	Hospedeiro	n	Pos.
Patos, marrecos e gansos (Anatidae)	38	4	Coruja-orelhuda (<i>Asio clamator</i>)	1	1
			Curicaca (<i>Theristicus caudatus</i>)	1	1
			Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	10	2
26 outras espécies	1	0	26 outras espécies	205	0
Total	39	4 (10,26%)	Total	217	4 (1,84%)

* $p \leq 0,05$

5.3.2. Identificação das espécies de *Giardia* spp.

Das oito amostras positivas pelo semi-nested PCR, apenas três foram sequenciadas com sucesso, sendo duas amostras de *Rupornis magnirostris* (Gavião-carijó) e uma de *Theristicus caudatus* (Curicaca).

Quando as sequências foram submetidas ao BLAST, as três amostras foram classificadas como *Giardia duodenalis* assemblage B. As sequências dos Gaviões-carijó foram idênticas entre si e exibiram 100% de similaridade com sequência depositada no GenBank (JN204452.1) e a sequência da curicaca exibiu 76% de similaridade com a sequência HM136884.1, sendo depositada no GenBank, com número de acesso KC473497 (Tabela 13).

A árvore filogenética das espécies de *Giardia* encontradas e as sequências referência utilizadas estão demonstradas na figura 7.

Tabela 13: Resultados do sequenciamento das amostras positivas para *Giardia* spp.

Isolado	Hospedeiro	Número acesso no GenBank	Resultado do Blast
Giar1UDI	Curicaca (<i>Theristicus caudatus</i>)	HM136884.1	<i>G. duodenalis</i> - assemblage B
Giar2UDI	Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	JN204452.1	<i>G. duodenalis</i> - assemblage B
Giar3UDI	Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	JN204452.1	<i>G. duodenalis</i> - assemblage B

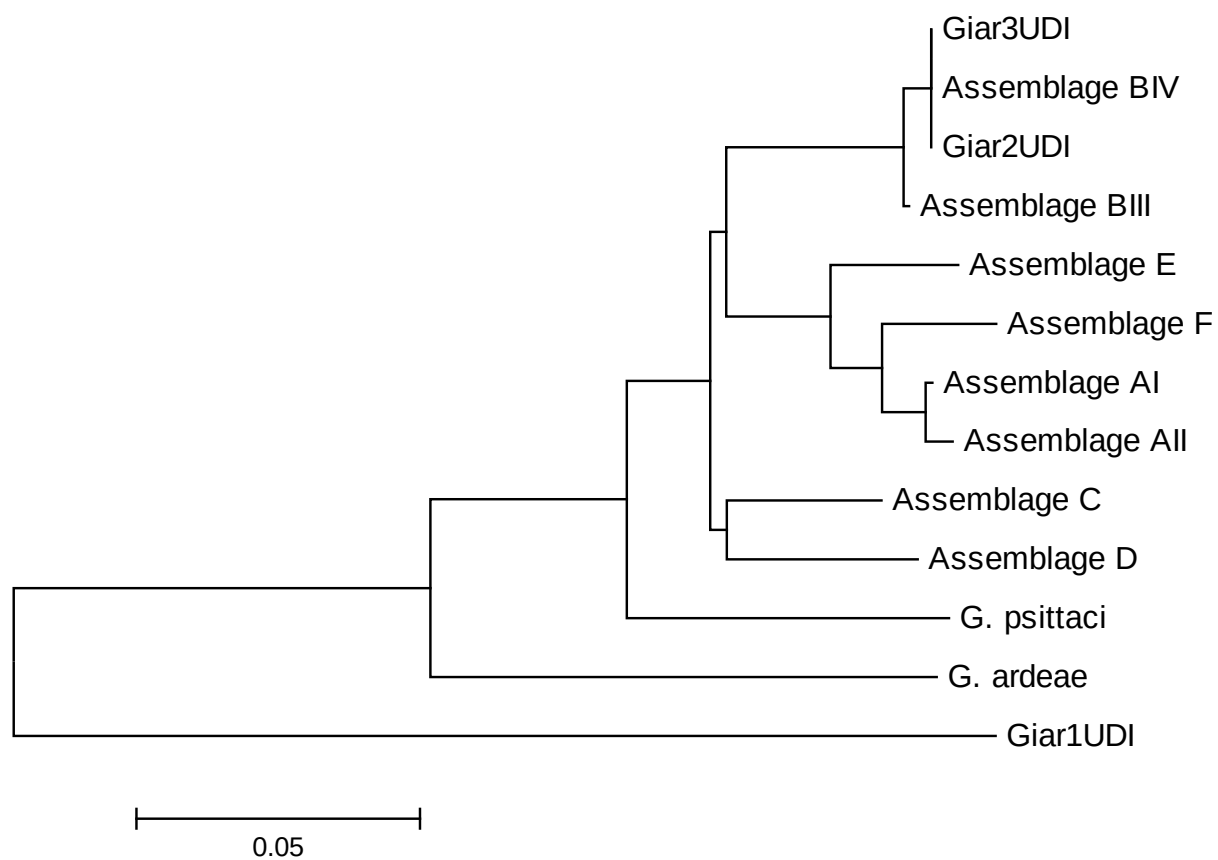


Figura 7: Relações filogenéticas das assemblages de *G. duodenalis* e *Giardia* spp. caracterizados pelo sequenciamento do gene *gdh* inferidas pela análise Neighbour-Joining. Valores de “bootstrap” estabelecidos em 1000 réplicas.

Discussão

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. são considerados os principais protozoários agentes de infecção em humanos e animais, sendo causas comuns de surtos transmitidos por água e de gastroenterites no mundo todo. (FILIPPICHI et al., 1998; NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009). Esses parasitos possuem variedade de reservatórios zoonóticos, podendo estar associados a “habitats” aquáticos e a inúmeras espécies de animais, que propagam e disseminam cistos e oocistos, no meio ambiente (GRACZYCK et al., 2008). Vários gêneros e espécies de aves de vida livre, de cativeiro e domésticas podem excretar esses protozoários nas fezes, entretanto o papel desses animais na contaminação ambiental não está totalmente esclarecido (GRACZYCK et al., 2008).

No presente estudo, a positividade encontrada para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foi de 3,9% e 3,1%, respectivamente. O resultado observado para *Cryptosporidium* spp., corrobora com diversos autores no Brasil e no mundo que encontraram positividade entre 1,4 e 10% (NG et al., 2006; ZIEGLER et al., 2007; GÜL; CIÇEK, 2009; MAJEWSKA et al., 2009; NAKAMURA et al., 2009; QI et al., 2011; QUAH et al., 2011; SEVÁ et al., 2011; GOMES et al., 2012). Entretanto, para *Giardia* spp. a ocorrência encontrada foi inferior a outros estudos que relataram 5 a 49% de prevalência (PLUTZER et al., 2010). A diferença nos resultados pode ser atribuída a variações nas técnicas de diagnóstico empregadas. Segundo Ramirez; Sreevatsan, (2006), diagnósticos baseados na detecção do DNA do parasito, como realizado nesta pesquisa, demonstraram maior sensibilidade e especificidade que as demais técnicas. Entretanto, deve-se ressaltar que a presença de várias substâncias orgânicas e inorgânicas nas amostras analisadas, pode inibir e afetar a eficiência dessas metodologias. Além disso, cistos de *Giardia* spp. são menos resistentes do que oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, o armazenamento das fezes em freezer por longo período de tempo, pode explicar a baixa positividade desse parasito (KOTHAVADE, 2012). De acordo com Paz e Silva (2010), a extração do DNA deve ser realizada, até cinco dias após a coleta, para que não ocorra degradação dos cistos e, consequentemente, perda do DNA do parasito.

Neste estudo, não foram observadas diferenças significantes na positividade de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre aves de cativeiro e aves de vida livre. Esse resultado foi diferente ao de Majewska et al. (2009) que relataram aves de vida livre mais parasitadas pelos protozoários. Conjectura-se que este grupo de aves é mais

propenso a carrear patógenos, pois animais de vida livre estão em constante contato com diferentes ambientes, cujas condições podem não ser ideais. O contrário pode ser observado em ambientes de cativeiro, onde alimentação, água e higienização são controlados pelos tratadores. Entretanto, não deve-se descartar que as diferenças entre os trabalhos estejam relacionadas a fatores tais como número amostral, manejo das aves, método de diagnóstico e localização geográfica.

No presente trabalho, não foi possível realizar análise estatística para a positividade de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre aves aquáticas e não aquáticas, devido às diferenças nas metodologias de coleta de fezes. Ressalta-se, entretanto, que o encontro desses parasitos nas aves aquáticas pode ter implicações na transmissão desses protozoários para o homem e outros animais. Em trabalho realizado por Majewska et al. (2009), a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em aves aquáticas foi significativamente maior, em comparação as aves não aquáticas. Os autores trabalharam tanto com aves de cativeiro, como com aves de vida livre. Diversos pesquisadores sugerem que, independente da significância estatística, do modo de vida e da positividade encontrada, aves aquáticas podem estar diretamente envolvidas no ciclo de transmissão de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. associado a água (KOOMPAPONG; SUKTHANA, 2012; KOTHAVADE, 2012; GRACZYK et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009; PLUTZER; TOMOR, 2009; GRACZYK et al., 2008). A presença de cistos e oocistos dos protozoários em ambientes aquáticos representa risco à saúde pública, uma vez que esses patógenos têm causado inúmeros surtos relacionados a águas de consumo e recreacional (KARANIS et al., 2007). Deve-se considerar que nesta pesquisa, as coletas de fezes das aves aquáticas foram realizadas em forma de “pool”. Como os animais transitavam entre os quadrantes, uma ave infectada pode ter contaminado outros quadrantes, o que, possivelmente, superestimou a ocorrência de *Giardia* spp.

Das duas espécies de *Cryptosporidium* observadas nesse estudo, *C. meleagridis* prevaleceu, contrariando a literatura que afirma ser *C. baileyi* a espécie mais prevalente em aves (PLUTZER; KARANIS, 2009; FAYER, 2010; RYAN, 2010).

C. meleagridis possui diversidade de hospedeiros aviários, sendo relatado em perus, papagaios, galinhas, periquitos e perdizes-vermelhas (O'DONOGHUE, 1995; MORGAN et al., 2000; SRÉTER; VARGA, 2000; DARABUS; OLARIU, 2003; ABE; ISEKI, 2004; HUBER et al., 2007; PAGÈS-MANTÉ et al., 2007; SOLTANE et al.,

2007). Entretanto, não há na literatura, relatos em coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*), sendo o encontro de *C. meleagridis* nessa espécie, o primeiro achado.

Além das aves, esta espécie foi identificada no homem e em diversos mamíferos, estando associada a manifestações gastrointestinais (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). Champliand et al. (1998) e Sréter e Varga (2000) sugeriram que *C. meleagridis* pudesse ser *C. parvum*, espécie considerada zoonótica, entretanto análises moleculares demonstraram a singularidade biológica de *C. meleagridis* (XIAO et al., 1999; MORGAN et al., 2000; SRÉTER et al., 2000; XIAO et al., 2000; SULAIMAN et al., 2002; XIAO et al., 2002). O parasito pode afetar indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. Chappell et al. (2011), comprovaram a suscetibilidade do homem a esta espécie, por meio de estudos de transmissão experimental em adultos imunocompetentes; Cama et al. (2003) e Samra et al. (2012) relataram esse protozoário, em pacientes HIV-positivos e em crianças com diarreia, respectivamente. Apesar dos vários relatos, a admissão de *C. meleagridis* como espécie zoonótica, é pouco discutida e compreendida.

A presença de *C. meleagridis* em aves de vida livre nesse trabalho, sugere risco de disseminação ambiental, haja vista a grande possibilidade de circulação desses animais. Além disso, por ser considerado patógeno de potencial zoonótico, a presença dessa espécie proveniente de aves aquáticas do zoológico pode, também, ter implicações na saúde pública, visto que esses animais transitam livremente pelo local, permanecendo em contato direto com tratadores e visitantes.

Ao contrário de *C. meleagridis*, *C. baileyi* tem especificidade por hospedeiros aviários. Segundo Qi et al. (2011), esta espécie foi reportada em diversas aves, incluindo aves domésticas e silvestres (NAKAMURA et al., 2009; AMER et al., 2010; RYAN, 2010). É frequentemente associada à criptosporidiose respiratória, com alta morbidade e mortalidade em aves, especialmente em frangos de corte (SRÉTER; VARGA, 2000). Neste trabalho, foi observada presença de *C. baileyi* em aves do gênero *Amazona*, animais nativos da América do Sul. No Brasil esta espécie foi somente reportada em galinhas domésticas, codornas e patos (MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992; CARDOZO et al., 2005; HUBER et al., 2007).

Giardia spp. tem sido identificada em aves pertencentes à diversas ordens, como Psittaciformes, Anseriformes, Gruiformes, Ciconiiformes e Passeriformes (GRACZYK et al., 1998; MAJEWSKA et al., 2009; PLUTZER; TOMOR, 2009; PAPINI et al., 2012). Entretanto, este é o primeiro relato do parasito nas espécies *Asio clamator* (Coruja-orelhuda), *Theristicus caudatus* (Curicaca) e *Rupornis magnirostris* (Gavião-carijó).

O sequenciamento do gene *gdh* de *Giardia* spp. falhou em algumas amostras positivas pelo semi-nested PCR. Segundo Read et al. (2004), o sequenciamento do gene *gdh* pode prover informações detalhadas dos diferentes genótipos de *G. duodenalis*, uma vez que possui sequências polimórficas capazes de diferenciar os genótipos de forma precisa. Entretanto, perdas ou a má qualidade do DNA amplificado, pequena quantidade de cistos nas amostras e pequena quantidade de DNA amplificado, podem ser responsáveis por falhas no sequenciamento (NAKAMURA et al., 2009).

Neste trabalho, o sequenciamento identificou *G. duodenalis*, como espécie presente nas amostras avaliadas. De acordo com Feng; 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 que possuem menor especificidade de hospedeiro, sendo encontradas em humanos e outros vertebrados, incluindo aves (CACCIÓ; RYAN, 2008). Nesta pesquisa, as três amostras sequenciadas foram caracterizadas como assemblage B. Plutzer; Tomor (2009), trabalhando com aves aquáticas encontraram a maior parte dos animais parasitados com o genótipo B. Entretanto, Feng; Xiao (2011) comentam que o genótipo A é considerado mais prevalente em relação ao genótipo B, em animais silvestres.

A identificação de genótipos zoonóticos de *G. duodenalis* em aves silvestres neste e em outros estudos, ressalta o potencial papel desses animais na manutenção do ciclo de transmissão zoonótica da giardíase. Dessa forma, as aves podem representar impacto negativo na saúde pública, pela eliminação de cistos do parasito nas fezes, passando-os mecanicamente para fontes de água, causando surtos epidêmicos de gastroenterites (GRACZYK et al. 2008; FRANCO et al., 2012). De acordo com Karanis et al. (2007) e Baldursson; Karanis (2011), os principais protozoários envolvidos em surtos epidêmicos de doenças transmitidas pela água foram *Giardia* spp. e também *Cryptosporidium* spp.

Apesar das espécies de *Giardia* não terem sido caracterizadas nas aves aquáticas do zoológico do Parque Municipal do Sabiá, não se deve descartar os riscos da presença desse protozoário para humanos e animais. Se o genótipo encontrado fosse zoonótico, os tratadores e visitantes poderiam estar expostos à infecção, devido ao contato direto com os animais. Entretanto, se os genótipos identificados fossem específicos, esses seriam reservatórios de infecção para outras aves não infectadas.

Embora, estudos tenham comprovado o papel das aves na contaminação de “habitats” por patógenos humanos, pouco se sabe sobre os mecanismos e fatores associados ao hospedeiro e ao parasito que facilitam ou dificultam a contaminação ambiental (GRACZYK et al., 2008). Baseado nisso, sugere-se a necessidade de mais estudos epidemiológicos para melhor compreensão da importância das aves na disseminação ambiental de oocistos e cistos das espécies/genótipos zoonóticos de *Cryptosporidium* e *Giardia*, respectivamente. Além disso, busca-se compreender os impactos desses animais na saúde pública, principalmente quando estiverem presentes em áreas de recreação, como parques e zoológicos, assim como próximos a fontes de água de consumo.

Conclusões

- *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. estão presentes em aves silvestres de cativeiro e vida livre.
- A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em aves silvestres de cativeiro e vida livre foi de 3,9 e 3,1%, respectivamente.
- Não foi observada diferença significativa na positividade de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre aves de cativeiro e aves de vida livre.
- O encontro de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp em aves aquáticas pode ter implicações na transmissão desses protozoários para o homem e outros animais.
- Duas espécies de *Cryptosporidium* foram observadas, *C. baileyi* e *C. meleagridis*, sendo *C. meleagridis*, a espécie que prevaleceu.
- A única espécie de *Giardia* identificada foi *G. duodenalis*, assemblage B.
- A presença de genótipos zoonóticos de *G. duodenalis* em aves silvestres pode gerar impacto negativo na saúde pública.
- Foi observado o primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. em *Athene cunicularia* (Coruja-buraqueira) e de *Giardia* spp. em *Asio clamator* (Coruja-orelhuda), *Theristicus caudatus* (Curicaca) e *Rupornis magnirostris* (Gavião-carijó).
- Estudos epidemiológicos envolvendo aves silvestres e o homem são necessários para melhor entendimento do impacto da criptosporidiose e da giardíase aviária, na saúde pública.

Referências bibliográficas

ABE, N., ISEKI, M. Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. **Parasitol. Res.**, v.92, p.523–526, 2004.

ABE, N.; MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. **Parasitol. Res.**, v.99, p.303–305, 2006.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.3, p.447–75, 2001.

AKIYOSHI, D.E.; TUMWINE, J.K.; BAKEERA-KITAKA, S.; TZIPORI, S. Subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from children in Uganda. **J. Parasitol.**, v.92, p.1097–1100, 2006.

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

ALVAREZ-PELLITERO, P., QUIROGA, M.I., SITJA`-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. **Dis. Aquat. Organ.**, v.62, p.133–145, 2004.

AMER, S., WANG, C., HE, H. First detection of *Cryptosporidium baileyi* in Ruddy Shelduck (*Tadorna ferruginea*) in China. **J. Vet. Med. Sci.**, v.72, p.935–938, 2010.

ANDRADE, D. V. **Frequência e caracterização genética de *Cryptosporidium* em aves cativas da cidade de Uberaba-MG.** Monografia - Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Instituto de Ciências Biomédicas, 2008.

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.

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

BARR, S.C.; BOWMAN, D.D.; HELLER, R.L. Efficacy of fenbendazole against giardiasis in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.55, p.988-990, 1994.

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*. **Parasitol. Res.**, 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. **Int. J. Parasitol.**, v.32, p.1023-1030, 2002.

CACCIÒ, S.M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.160, p.75 -80, 2008.

CAMA, V.A.; BERN, C.; SULAIMAN, I.M.; GILMAN, R.H.; TICONA, E.; VIVAR, A.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; ZHOU, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium* Species and Genotypes in HIV-Positive Patients in Lima, Peru. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.50, n.6, p.531-533, 2003.

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

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

CHAMPLIAUD, D., GOBET, P., NACIRI, M., VAGNER, O., LOPEZ, J., BUISSON, J.C., VARGA, I., HARLY, G., MANCASSOLA, R., BONNIN, A. Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. Meleagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, p.1454-1458, 1998.

CHAPPELL, C.L.; OKHUYSEN, P.C.; LANGER-CURRY, R.C.; AKIYOSHI, D.E.; WIDMER, G.; TZIPORI, S. *Cryptosporidium meleagridis*: Infectivity in Healthy Adult Volunteers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.85, n.2, p.238-242, 2011.

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

DARABUS, G., OLARIU, R.. The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. **Pol. J. Vet. Sci.**, v.6, p.225–228, 2003.

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

ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J. SEM evidence for a new species, *Giardia psitacci*. **J. Parasitol.**, 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*). **J. Parasitol.**, 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. **Int. J. Environ. Health Res.**, v.1, n.3 p.132–143, 1991.

FALL, A.; THOMPSON, R.C.; HOBBS, R.P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **J. Parasitol.**, v.89, p.399–402, 2003.

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

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin. Microbial. Rev.**, 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. **J. Parasitol.**, v. 25, p.241-262, 1939.

FAYER, R. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **CRC Press**, Boca Raton, FL, p.272, 1997.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON S.J.; Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.1305–1322, 2000.

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

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

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

FAYER, R., SANTIÍN, M., TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Vet. Parasitol.**, v.156, p.191–198, 2008.

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

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

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

FORSHAW, D.; PALMER D.G, HALSE S.A, HOPKINS R.M, THOMPSON R.C.A. *Giardia* in straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. **Vet. Rec.**, 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, **J.wildl.dis.**, v.36, n.4, p.764-766, 2000.

FRANCO, R.M.B.; BRANCO, N.; LEAL, D.A.G. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Rev. Pat. Trop.**, v.41, n. 2, p.119-135, 2012.

FREITAS, M.F.L.; OLIVEIRA, J.B.; CAVALCANTI, M.D.B.; LEITE, A.D.; MAGALHÃES, V. S.; OLIVEIRA, R. A.; SOBRINHO, A. E. Parasitos gastrointestinais de aves silvestres em cativeiro em el estado de Pernambuco. **Parasitol. Latinoam.**, v.57, p.50–54, 2002.

GALE, P.; STANFIELD, G. *Cryptosporidium* during a simulated outbreak. **J. Am. Water Works Assoc.**, v. 92, p.105-116, 2000.

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*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, (Suppl.), p.19S–22S, 2001.

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

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*). **Appl. Environ. Microbiol.**, 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 Parasitol.** v.24, n.2, p.55-59, 2008.

GUILHERME, E.A.G.; NAKAJIMA, J.N.; LIMA, C.A.P.; VANINI, A. Fitofisionomias e a Flora Lenhosa Nativa do Parque do Sabiá, Uberlândia, MG. **Daphne**, v.8, n.2, p.17-30, 1998.

GÜL, A.; CIÇEK, M. Investigation of the prevalence of gastrointestinal parasites in aviary birds in homes in the Van province. **Türkiye Parazitol. Derg.**, v.33, p.215-217, 2009.

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

HAMNES, I. S.; GJERD, B.; ROBERTSON, L. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. **Vet. Parasitol.**, v.140, p.204-216, 2006.

HEGNER, R.W. A comparative study of *Giardia* living in man. Rabbit and dog, **Am. J. Hyg.**, v.2, p.442-454, 1922.

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

HUBER, F.; BONFIM, T.C.; GOMES, R.S.; Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.2, n.3, p.135-137, 2003.

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. **Vet. Parasitol.**, v.150, p.65-74, 2007.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 01/02/2013.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. from the domestic cat. Jpn., **J. Parasitol.**, v.28, p.13-35, 1979.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium* – Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnol. Adv.**, 2008.

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 Parasitol.**, (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. **Parasitol. Res.**, v.101, p.1575–1580, 2007.

KENNEDY, J.P. Giardiasis - zoonosis or not? **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.194, n.4, p.447-450, 1989.

KOOMPAPONG, K.; SUKTHANA, Y. Seasonal variation and potential sources of *Cryptosporidium* contamination in surface waters of Chao Phraya river and Bang Pu nature reserve pier, Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v.43, n.4, p. 832-840, 2012.

KOTHAVADE, J.R. Potential molecular tools for assessing the public health risk associated with waterborne *Cryptosporidium* oocysts. **J. Med. Microbiol.**, v.61, p. 1039-1051, 2012.

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

KULDA, J.; NOHYNKOVA, E. Flagellates of human intestine and of intestines of other species. In: KREIER, J. P. (Ed.), **Parasitic Protozoa**, v.2, p.225- 422, 1996.

LANE, S.; LOYD, D. Current trends in research into waterborne parasite *Giardia*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.28, p.123-147, 2002.

LEVINE, N.D. Protozoan Parasites of Domestic Animals and Man. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1961.

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

LINDSAY D. S.; BLAGBURN B. L.; ERNEST J. A. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in chickens. **J. Parasitol.**, 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 in Man and Animals. **CRC Press**, Inc., Boca Raton, p.133–148, 1990.

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*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.47, p.91–95, 2000.

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. **Parasitol. Rev.**, v.104, p.1093–1099, 2009.

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). **Biosci. J.**, v.25, n.6, p.149–164, 2009.

MARIETTO-GONÇALVES, G.A.; FERNADES, T.M.; SILVA, R.J.; LOPES, R.S.; ANDREATTI FILHO, R.L. Intestinal protozoan parasites with zoonotic potential in birds. **Parasitol. Res.**, v.103, p.1237–1240, 2008.

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. **J. Parasitol.**, v.82, p.711–718, 1996.

MEIRELES, M.V., FIGUEIREDO, P.C. Isolamento e identificação de *Cryptosporidium baileyi*, Current et al., 1986 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em frangos de corte. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v.1, p.125–130, 1992.

MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M.; DOS SANTOS, M.M.; GENNARI, S.M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). **J. Parasitol.**, v.92, p.623–626, 2006.

MISIC, Z.; ABE, N. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. **Parasitology**, v.134, p.351–358, 2007.

MONIS, P.T.; ANDREES, R.H.; MAYRRHOFFER, G.; EY, P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to hosp origin. **Infec. Genet. Evol.**, v.3, n.1, p.29–38, 2003.

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

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

MORGAN, U.M.; PALLANT, L.; DWYER, B.W.; FORBES, D.A.; RICH, G.; THOMPSON, R.C.A. Comparison of PCR and Microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.4, p.995–998, 2002.

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. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.49, p.433–440, 2002.

MOYER, B.R.; DROWN, D.M.; CAYTON, D.H.; Low humidity reduces ectoparasites pressure: implications for host life history evolution. **Oikos**, v.97, p.223–228, 2002.

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

NG, J.; PAVLASEK, L.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, p.7548-7553, 2006.

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

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Int. J. Parasitol.**, v.25, p.139-195, 1995.

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.

OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends Parasitol.**, v.20, n 4, p.185-191, 2004.

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

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

PAVLÁSEK, I., KOZAKIEWICZ, L. Occurrence and localization of *Cryptosporidium* sp. in spontaneously infected pheasants (*Phasianus colchicus*). **Folia Parasitol.**, v.36, p.287-288, 1989.

PAVLÁSEK, I. The black-headed gull (*Larus ridibundus*), a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Vet. Med. Praha.**, v.38, p.629–638, 1993.

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

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

PAZ E SILVA, F. M. **Caracterização molecular de *Giardia duodenalis* em cães na cidade de Botucatu-SP.** Tese (doutorado), Universidade Estadual Paulista. Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2010.

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. **Parasitol. Res.**, v.90, n.3, p.175-180, 2003.

PLUTZER, J., KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Vet. Parasitol.**, 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. **Parasitol. Int.**, v.58, p.227-231, 2009.

PLUTZER, J. ONGERTH, J. KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v.213, p.321-333, 2010.

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

PROCTOR, S.J., KEMP, R.L. *Cryptosporidium anserinum* sp. n. (Sporozoa) in a domestic goose *Anser anser* L., from Iowa. **J. Protozool.**, v.21, p.664–666, 1974.

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

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

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

READ, C.M., MONIS, P.T., THOMPSON, R.C.A. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infect. Genet. Evol.**, v.4, p.125-130, 2004.

RICHTER, D. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von Kryptosporidien bei Hausflügel, Zier- und Wildvögeln. Thesis, Justus Liebig Universität, **Giessen**, p.1-107, 1991.

RICHTER, D.; WIEGAND-TRIPP, G.; BRUCKHARDT, E.; KALETA, E.F. Natural infections by *Cryptosporidium* sp. **Avian Pathol.**, v.23, p.277-286, 1994.

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., XIAO, L.H.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A.A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.4302-4307, 2003a.

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 for Parasitology**, v.89, p.809-813, 2003b.

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*). **J. Parasitol.**, 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*). **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.55, p.22–26, 2008.

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

SAMRA, N.A.; THOMPSON, P.N.; JORI, F.; FREAN, J. POONSAMY, B.; du PLESSIS, D.; MOGOYE, B.; XIAO, L. Genetic Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Diarrhoeic Children from Four Provinces in South Africa. **Zoonoses Public Health**, doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01507.x., 2012.

SANTIN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairly calves. **Vet. Parasitol.**, v.21, n.122(2), p.103-117, 2004.

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. **Vet. Parasitol.**, v.175, p.27-32, 2011.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. Nov.). **J. Comp. Pathol.**, v.65, p.262-266, 1955.

SMITH, H.V.; BROWN, J.; COULSON, J.C.; MORRIS, G.P.; GIRDWOOD, R.W.A. Occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in *Larus* sp. gulls. **Epidemiol. Infect.**, v.110, p.135–143, 1993.

SOBA, B.; LOGAR, J. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. **Parasitology**, v.135, p.1263–1270, 2008.

SOLTANE, R., GUYOT, K., DEI-CAS, E., AYADI, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporidiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. *Parasite*, v.14, p.335–338, 2007.

SRETER, T.; KOVACS, G.; DA SILVA, A.J.; PIENIAZEK, N.J.; SZELL, Z.; DOBOS-KOVACS, M.; MARIALIGETI, K.; VARGA, I. Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.735–738, 2000.

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

SULAIMAN, I.M.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A.; LAL, A.A.; XIAO, L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70- kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.2385–2391, 2000.

SULAIMAN, I.M.; LAL, A.A.; XIAO, L.H. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **J. Parasitol.**, v.88, p.388–394, 2002.

THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; MELONI, B. P. Genetic Variation in *Giardia* Kunstler, 1882 taxonomic and epidemiological significance. **Protozool. Abs.**, v.14, p.1-28, 1990.

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

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

THOMPSON, R.C.A. Towards a better understanding of host specificity and transmission of *Giardia*: The impact of molecular epidemiology. In: OLSON, B. E.; OLSON, M. E.; WALLIS, P. M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. **CAB International**, p.55- 69, 2002.

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

TYZZER, E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.5, p.12–13, 1907.

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

TRAVIS, B. V. Descriptions of 5 new species of flagellate protozoa of the genus *Giardia*. **J. Parasitol.**, v.25, p.11-17, 1939.

VAN KEULEN, H., MACECHKO, T., WADE, S., SCHAAF, S., WALLIS, P. M. and Erlandsen, S. L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Vet. Parasitol.**, v.108 , p.97–107, 2002.

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. **J. Protozool.**, 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 Trop.**, v.102, p.10-19, 2007.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, n.3, p.1097-1101, 2001.

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

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, n.1, p.72-97, 2004.

XIAO, L., FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **Int. J. Parasitol.**, v.38, p.1239–1255, 2008.

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

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

Anexos

Anexo A: Análise final da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) para o protocolo 111/11.



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 235/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 111/11

Projeto Pesquisa: "Giardia spp., Cryptosporidium spp. e hemoparasitos em aves silvestres de cativeiro e vida livre".

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.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 15 de fevereiro de 2012

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU

Anexo B: Autorização do coordenador do Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS).

Eu, André Luiz Quagliatto Santos, autorizo a aluna Maria Júlia Rodrigues da Cunha a desenvolver a pesquisa intitulada “*Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., e hemoparasitos em aves silvestres de cativeiro e vida livre”, no Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia.

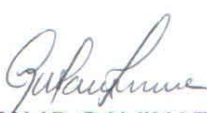
Uberlândia, 07 de Julho de 2011.

André Luiz Quagliatto Santos
(Coordenador)

Anexo C: Autorização do diretor do zoológico do Parque Municipal do Sabiá.**AUTORIZAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que Maria Júlia Rodrigues da Cunha está autorizada a fazer coleta de fezes no recinto das aves aquáticas no Zoológico Municipal.

Atenciosamente,


GUSTAVO CAVINATO HERRERA
Diretor do Zoológico Municipal