

Infecção natural de pombos (*Columba livia*) por *Cryptosporidium* spp.*

Natural infection of pigeons (*Columba livia*) with *Cryptosporidium* spp.

Alexandre de Pina Costa, ** Teresa Cristina Bergamo do Bomfim***

Resumo

O estudo teve como objetivo diagnosticar microscopicamente e molecularmente a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras fecais de pombos (*Columba livia*) no município do Rio de Janeiro. As amostras fecais foram coletadas frescas, logo após as aves defecarem e acondicionadas sob refrigeração e encaminhadas para o processamento e pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. ao laboratório de Protozoologia do Departamento de Parasitologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As amostras foram submetidas a técnica de centrifugação e flutuação com solução saturada de açúcar e as lâminas observadas com objetiva de 40X. Nas amostras positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi realizada a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) para uso nas reações em cadeia pela polimerase (PCR) e Nested-PCR. Um total de 387 amostras fecais de pombos foram obtidas, no diagnóstico microscópico foi possível a observação de oocistos deste parasita em 81 amostras (20,93%). Destas, 53 amostras amplificaram DNA específico para *Cryptosporidium* spp. na reação da Nested-PCR. Mundialmente, *Cryptosporidium* spp. parasitando pombos é assinalado em apenas quatro países: Turquia, China, Irã e Tailândia. O resultado encontrado neste trabalho, em três bairros populosos do município do Rio de Janeiro, revelou ser preocupante, por serem áreas onde há uma quantidade acentuada da população animal e humana, facilitando a dispersão e contaminação ambiental dos oocistos. Este é o primeiro registro no Brasil de parasitismo de *Cryptosporidium* spp. tendo como hospedeiro o pombo e estes resultados, não devem ser negligenciados.

Palavras-chave: Columbidae, Rio de Janeiro, Criptosporidiidae, diagnóstico microscópico, diagnóstico molecular.

Abstract

The aim of this study was to diagnose microscopically and molecularly the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts from pigeons (*Columba livia*) faecal samples in Rio de Janeiro city. The fecal samples were collected fresh, after the birds defecated and conditioned under refrigeration and sent to the processing and research of *Cryptosporidium* spp. oocysts to the protozoology laboratory of the Parasitology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. The samples were submitted to centrifugation and flotation with saturated sugar solution technique and the slides observed with a 40X objective. In the positive samples for the *Cryptosporidium* spp. oocysts the extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) for polymerase chain reaction (PCR) and Nested-PCR was performed. A total of 387 pigeons faecal samples were obtained, in the microscopic diagnosis it was possible to observe oocysts of this parasite in 81 samples (20.93%). Of these, 53 samples amplified DNA specific for *Cryptosporidium* spp. in the Nested-PCR reaction. Worldwide, *Cryptosporidium* spp. parasitizing pigeons is reported in only four countries: Turkey, China, Iran and Thailand. The results found in this study, in three populated neighborhoods of Rio de Janeiro city, were worrisome because they are areas where there is a marked quantity of animal and human population, facilitating the dispersion and environmental contamination of oocysts. This is the first record in Brazil of parasitism of *Cryptosporidium* spp. having as host the pigeon and these results, should not be neglected.

Keywords: Columbidae, Rio de Janeiro, Criptosporidiidae, microscopic diagnosis, molecular diagnostics.

Introdução

A grande concentração de pombos (*Columba livia*) em determinadas áreas no mundo vem aumentando sua interação com os humanos. Dessa forma, essas aves vêm representando risco à saúde pública, de forma direta, através da inalação das excretas contaminadas, ou de forma indireta, pela contaminação de fontes de água e alimentos destinados ao consumo animal e humano (Adang et al., 2008; Koompapong et al., 2014; Li et al., 2015).

Outro aspecto importante a ser considerado é que o pombo (*Columba livia*), é um potencial reservatório e transmissor de patógenos no ambiente tais como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Chlamydomphila psittaci*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptosporidium* spp. (Radfar et al., 2012; Caballero et al., 2015; Li et al., 2015). O gênero *Cryptosporidium* possui grande relevância na medicina das aves infectando tanto as domésticas, silvestres de vida livre ou aquelas mantidas em cativeiro. Além disso dependendo da espécie e do subtipo diagnosticado,

*Recebido em 13 de maio de 2016 e aceito em 12 de fevereiro de 2017.

**Doutorando em Ciências Veterinárias, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica-RJ, Brasil.

***Docente do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica-RJ, Brasil. Autor para correspondência: tccb@superig.com.br.

apresenta importância em saúde pública (Papini et al., 2012; Hamidinejat et al., 2014; Reboredo-Fernández et al., 2015).

Até o momento, são descritas 30 espécies de *Cryptosporidium* (Slapeta et al., 2013; Ryan e Hijawi, 2015; Li et al., 2015; Zahedi et al., 2015), com capacidade de infectar todas as classes de vertebrados. As infecções podem se apresentar assintomáticas até variadas manifestações clínicas (Santin, 2013). São reconhecidas como válidas, tendo as aves como hospedeiros, três espécies: *C. meleagridis*; *C. baileyi* e *C. galli* (Qi et al., 2011; Quah et al., 2011; Nakamura et al., 2014).

Neste contexto, no mundo, diversos estudos vêm sendo conduzidos para se estabelecer o real impacto da Criptosporidiose como um zoonose e suas consequências para a saúde pública. Além de parasitar aves, *Cryptosporidium meleagridis* também é considerado um patógeno emergente em humanos e é a terceira espécie mais comumente diagnosticada neste hospedeiro (Xiao, 2010; Rafiei et al., 2014; Stensvold et al., 2014).

Em adição às três espécies de *Cryptosporidium* são reconhecidas como válidas para aves, 13 genótipos com "status" de espécies desconhecidas (Abe e Makino, 2010; Ryan et al., 2014).

Devido à ausência de pesquisas sobre o gênero *Cryptosporidium* em pombos no Brasil, o presente estudo teve como objetivo diagnosticar microscopicamente e molecularmente a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras fecais de pombos no município do Rio de Janeiro-RJ.

Material e métodos

As amostras fecais dos pombos foram obtidas em três regiões administrativas localizadas no município do Rio de Janeiro. As regiões de coleta foram denominadas de áreas A, B e C. A área A corresponde a localidade de Campo Grande, que totalizou 98 amostras fecais, a área B correspondeu à localidade de Bangu com 187 amostras fecais e a área C correspondeu à área de Madureira com 102 amostras fecais.

As amostras fecais dos pombos foram coletadas frescas, logo após as aves defecarem e acondicionadas sob refrigeração e encaminhadas para o processamento e pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. No laboratório de Protozoologia do Departamento de Parasitologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, as amostras foram submetidas a técnica de centrifugação e flutuação com solução saturada de açúcar, de acordo com a metodologia descrita por Huber et al., 2007.

As lâminas foram preparadas e observadas com objetiva de 40X. Naquelas amostras positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi realizada a extração de DNA sendo utilizado o kit comercial da Qiagen ('QIAamp DNA Stool Mini Kit' - QIAGEN®, Mainz/Germany) (Coklin et al., 2009; Das et al., 2011), seguindo as recomendações especificadas pelo fabricante.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em duas etapas. Na primeira reação de PCR tendo como gene alvo o 18S, utilizando os 'primers' 18SF: 5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' ('forward') e 18SR: 5'- CCC ATT TCC TTC GAAACA GGA-3' ('reverse'), obtendo-se amplicons com aproximadamente 1.325 pb (Xiao et al., 1999; Fayer et al., 2010).

Para a segunda etapa, Nested-PCR, que teve o mesmo gene como alvo, desta vez utilizando os 'primers' 18SNF: 5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3' ('forward') e 18SNR: 5'- AAG GAG TAA GGAACAACC TCC A-3' ('reverse'), obtendo-se amplicons entre 826 a 864 pb, dependendo da espécie de *Cryptosporidium* e/ou genótipos diagnosticados (Xiao et al., 1999; Fayer et al., 2010).

Na realização das reações da PCR, foram utilizados 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 µM de cada 'primer' (18SF e 18SR - Invitrogen®, Carlsbad/Califórnia-EUA), Tampão Taq 1X (Invitrogen), 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs - Invitrogen®, Carlsbad/Califórnia-EUA), 1,0 U 'Platinum Taq Polymerase' (Invitrogen®, Carlsbad/Califórnia-EUA), 2 µL de DNA da amostra e água ultrapura ('Nuclease-free water' - Promega®, Madison/Wisconsin-EUA) até completar o volume final de 25 µL.

Para a reação da Nested-PCR foram utilizadas as mesmas condições da PCR, exceto pela diminuição da concentração de MgCl₂ que passou a ser 2 mM e a utilização de 0,2 µM do 'primer' 18SNF e 0,2 µM do 'primer' 18SNR, com 1 µL de DNA da amostra obtidas da reação da PCR e água ultrapura ('Nuclease-free water' - Promega®, Madison/Wisconsin-EUA) até completar o volume final de 25 µL.

Os ciclos termais utilizados para a realização das reações da PCR tiveram como ponto de partida a temperatura de 94°C por três minutos ('hot start'), seguida de um total de 35 ciclos onde ocorreu a desnaturação do DNA a 94°C por 45 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos na temperatura que variou de 58°C (PCR) e 59°C (Nested PCR) por 45 segundos e a extensão da cadeia de DNA dos produtos formados a 72°C por um minuto. Ao final dos 35 ciclos foi realizada uma etapa de extensão a 72°C por sete minutos.

Após a execução de todos os ciclos, os microtubos contendo 25 µL de amostra foram retirados do termociclador e 10 µL do material visualizado através da eletroforese em gel de agarose a 2 % (100V por 60 minutos), corado com brometo de etídio (5µg/mL). O tampão de amostra utilizado foi 'loading buffer' 6X - tipo III (Sambrook e Russel, 2001) usando o marcador de peso molecular '1Kb Plus DNA Ladder' (Invitrogen®, Carlsbad/Califórnia-EUA). Todas as amostras obtidas através da reação da Nested-PCR foram coradas pelo brometo de etídio e observadas em gel de agarose.

Resultados e discussão

Neste estudo, de um total de 387 amostras fecais de pombos, após a realização do diagnóstico microscópico utilizando a técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar, foi possível a observação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 81 amostras analisadas. Neste trabalho, nas amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. foram encontrados números variáveis de oocistos por campo de observação microscópica por lâmina (< 5 ≤ 30) analisada. Na tabela 1, encontra-se o número total de amostras de fezes por área de coleta e número de amostras positivas e seus respectivos percentuais.

Tabela 1: Amostras de fezes provenientes de pombos (*Columba livia*) de acordo com a localidade da coleta após o diagnóstico parasitológico de fezes para *Cryptosporidium* spp. utilizando a técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar

Área	Região	Número de amostras fecais	Número de amostras positivas
A	Campo Grande	98	28 (28,82%)
B	Bangu	187	43 (22,99%)
C	Madureira	102	10 (9,80 %)
TOTAL		387	81 (20,93%)

Nas 81 amostras fecais dos pombos que foram diagnosticadas positivas para *Cryptosporidium* spp. pela visualização de oocisto na microscopia, foram submetidas ao diagnóstico molecular. Destas, 53 amostras amplificaram DNA específico para *Cryptosporidium* spp. na reação da Nested-PCR (tabela 2).

Mundialmente, *Cryptosporidium* spp. parasitando pombos é assinalado em apenas quatro países: Turquia (Özkuş e Aydin, 1994), China (Qi et al., 2011; Li et al., 2015; Li et al., 2016), Irã (Radfar et al., 2012; Bahrami et al., 2012; Badparva et al., 2014; Mirzaghavami et al., 2016) e Tailândia (Koompapong et al., 2014), totalizando nove publicações e todas estas utilizaram a técnica de microscopia como triagem. A utilização de fezes de pombos livres e dispersos no ambiente para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. foram descritas apenas em três trabalhos: Koompapong et al., 2014; Badparva et al., 2014; e Mirzaghavami et al., 2016.

Tabela 2: Amostras de fezes provenientes de pombos (*Columba livia*) que foram positivas no diagnóstico parasitológico de fezes para *Cryptosporidium* spp., e submetidas na técnica de PCR e Nested-PCR de acordo com a região do estudo.

Área	Região	Amostras positivas na microscopia	Amostras positivas na nested-pcr
A	Campo Grande	28	23 (82,14%)
B	Bangu	43	21(48,83%)
C	Madureira	10	9 (90%)
TOTAL		81	53 (65,43%)

O resultado encontrado neste trabalho, em três bairros populosos do município do Rio de Janeiro, revelou que 20,93% das amostras de fezes de pombos analisados, apresentaram positividade para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Este percentual foi considerado elevado e preocupante, por serem áreas onde há uma quantidade acentuada da população animal e humana, que possivelmente facilitaríamos a dispersão e contaminação ambiental. Além disso, deve-se ressaltar que devido à capacidade de voo dos pombos, estes podem interagir com outras aves de vida livre e cativas, facilitando a dispersão de patógenos, dentre estes *Cryptosporidium* spp. A questão da interação entre espécies de aves e a dispersão de patógenos, especificamente *Cryptosporidium* spp., já foi mencionada por Graczyk et al. (2008), Qi et al. (2011), Koompapong et al. (2014), Li et al. (2016) e Mirzaghavami et al. (2016).

As amostras obtidas neste estudo no município do Rio de Janeiro, foram de áreas urbanas densamente povoadas tanto pelos pombos quanto pela população humana, uma vez que a oferta de alimentos era elevada, atraindo estas aves, tornando sua proximidade um risco para a saúde pública. Semelhanças neste sentido, também foram observadas em Bangcoc na Tailândia (Koompapong et al., 2014) e em Teerã, no Irã (Mirzaghavami et al., 2016).

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. são eliminados para o meio ambiente através das fezes de hospedeiros infectados, permanecendo viável durante meses, dependendo das condições ambientais (Hong et al., 2014). Diversos estudos vêm sendo realizados, com objetivo de detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais, tais como solo, vegetais, esgoto e fontes de água, evidenciando a presença de oocistos. Este agente vem sendo responsável por surtos de origem alimentar e de veiculação hídrica em diversas regiões do mundo (Balderrama-Carmona et al., 2014; Dreelin et al., 2014; Hong et al., 2014; Moss et al., 2014). A detecção do *Cryptosporidium* spp. continua sendo de grande interesse para a saúde pública e o monitoramento para sua detecção direta é justificada pela constante poluição fecal, principalmente em regiões de baixas condições sanitárias (Hong et al., 2014; Parsons et al., 2014; Ehsan et al., 2015; Freitas et al., 2015; Chuah et al., 2016).

Devido às características de urbanização e a alta densidade de pombos encontradas no Rio de Janeiro, o potencial desta ave albergar e disseminar oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente com risco de infecção à população humana é grande, principalmente em áreas com baixas condições socio-econômicas e saneamento básico deficiente. No Brasil, a investigação do *Cryptosporidium* spp. na classe das aves tem sido conduzido por vários autores (Cardozo et al., 2005; Huber et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Gomes et al., 2009; Nakamura et al., 2009; Silva et al., 2010; Sevá et al., 2011; Holsback et al., 2013; Nakamura et al., 2014; Cunha et al., 2016), porém nenhum estudo até o momento utilizou o hospedeiro pombo.

Após o diagnóstico molecular, tendo como o gene alvo 18S, na Nested-PCR foram observados amplicons com aproximadamente 830 pb, confirmando que a região do gene foi amplificada para *Cryptosporidium* spp.

Alguns fatores contribuem significativamente para o sucesso de *Cryptosporidium* spp. como um parasito, tais como, a eliminação de um número considerável de oocistos no ambiente pelo hospedeiro infectado; o oocisto já é eliminado através das fezes esporulado, apto a infectar outros hospedeiros; pequenas quantidades de oocistos podem estabelecer uma infecção; baixa especificidade de algumas espécies por hospedeiros; grande diversidade de hospedeiros para uma única espécie; o pequeno tamanho dos oocistos que favorece a sua dispersão, seja em água, alimentos ou aerossóis e a resistência do oocisto às adversidades ambientais e aos tratamentos de águas convencionais, causando uma maior dispersão (Xiao et al., 2004).

Assim os dados obtidos nesta pesquisa são de extrema relevância pois comprovam os riscos de contaminação ambiental e nesta cadeia epidemiológica vários hospedeiros poderiam estar inseridos incluindo humanos.

Conclusões

Este é o primeiro registro no Brasil de parasitismo de *Cryptosporidium* spp. tendo como hospedeiro o pombo (*Columba livia*) e estes

resultados não devem ser negligenciados. Maiores estudos deverão ser realizados para determinar a caracterização molecular das espécies e ou genótipos de *Cryptosporidium* para a verificação do potencial zoonótico.

Agradecimentos

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado.

Referências

- ADANG, K.L.; ONIYE, S.J.; EZEALOR, A.U.; ABDU, P.A.; AJANUSI, O.J. Ectoparasites of Domestic Pigeon (*Columba livia domestica*, Linnaeus) in Zaria, Nigeria. *Reserch Journal Parasitology*, v. 3, p.79-84, 2008.
- ABE, N.; MAKINO, I. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels in Japan. *Parasitology Research*, v.106, p.14916–21497, 2010.
- BADPARVA, E.; EZATPOUR, B.; AZAMI, M.; BADPARVA, M. First report of birds infection by intestinal parasites in Khorramabad, west Iran. *Journal of Parasitology Diseases*, doi:10.1007/s12639-014-0427-5, 2014.
- BALDERRAMA-CARMONA, A.P. et al. Occurrence and quantitative microbial risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in soil and air samples. *International Journal Infectious Diseases*, v. 26, p. 123-127, 2014.
- BAHRAMI, A.M.; MONFARED, A.L.; RAZMJOO, M. Pathological study of parasitism in racing pigeons: an indication of its effects on community health. *African Journal of Biotechnology*, v.11, p.12364-12370, 2012.
- CABALLERO, M.; RIVERA, I.; JARA, L.M.; ULLOA-STANOJLOVIC, F.M.; SHIVA, C. Isolation and molecular identification of potentially pathogenic *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in feral pigeons from an urban area in the city of Lima, Peru. *Revista do. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 57, n. 5, p. 393-396, 2015.
- CARDOZO, S. V.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. Transmissão experimental de *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) isolado de frango de corte à codorna japonesa (*Coturnix japonica*). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.14, n.3, p.119-124, 2005.
- CHUAH, C.J.; MUKHAIDIN, N.; CHOY, S.W.; SMITH, G.J.; MENDENHALL, I.H.; LIM, Y.H.; ZIEGLER, A.D. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the water resources of the Kuang River catchment, Northern Thailand. *Science of the Total Environment*, v. 562, p. 701-713, 2016.
- COKLIN, T.; UEHLINGER, F.D.; FARBER, J.M.; BARKEMA, H.W.; O'HANDLEY, R.M.; DIXON, B.R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, v.160, n. 3-4, p. 323-326, 2009.
- CUNHA, M.J.; CURY, M.C.; SANTÍN, M. Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds. *Parasitology Research*, v. 116, n. 2, p. 487-493., 2016.
- DAS, G.; CHANGKIJA, B.; SARKAR, S.; DAS, P. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* isolates in bovine population in Kolkata and characterization of new bovine genotypes. *Research Veterinary Science*, v. 91, p. 246-250, 2011.
- DREELIN, E.A.; IVES, R.L.; MOLLOY, S.; ROSE, J.B. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Surface Water: A Case Study from Michigan, USA to Inform Management of Rural Water Systems. *International Journal Environment Research Public Health*, v.11, p.10480-10503, 2014.
- EHSAN, A.M.; GEURDEN, T.; CASAERT, S.; PARVIN, S.M.; ISLAM, T.M.; AHMED, U.M.; et al. Assessment of Zoonotic Transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* between Cattle and Humans in Rural Villages in Bangladesh. *PLoS ONE*, v.10, n. 2, p. 245-254, 2015.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; DARGATZ, D. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Veterinary Parasitology*, v.170, n. 3-4, p.187-192, 2010.
- FREITAS, D.A.; PAIVA, A.L.; FILHO, J.A.; PEREIRA CABRAL, J.J.; ROCHA, F.J. Occurrence of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. And other pathogenic intestinal parasites in the Beberibe River in the State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 1, 220-223, 2015.
- GOMES, R.S.; BOMFIM, T.C.; HUBER, F. Infecção natural por *Cryptosporidium* sp. em aves domésticas comercializadas em mercados municipais do Estado do Rio de Janeiro. *Ciência Rural*, v.39, n.7, p. 2128-2134, 2009.
- GRACZYK, T.K.; MAJEWSKA, A.C.; SCHWAB, K.J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends in Parasitology*, v. 24, n. 2, p.55-59, 2008.
- HAMIDINEJAT, H., et al. Molecular determination and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in fecal and respiratory samples of industrial poultry in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.1, p.517-520, 2014.
- HOLSBACK, L.; CARDOSO, M.J.; FAGNANI, R.; PATELLI, T.H. Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 2, p. 302-306, 2013.
- HONG, S.; KIM, K.; YOON, S.; PARK, W.Y.; SIM, S.; YU, JR. Detection of *Cryptosporidium parvum* in Environmental Soil and Vegetables. *Journal Korean Medicine Science*, v. 29, n.10, p.1367-1371, 2014.
- HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T.C.; TEIXEIRA, K.R.; BELLO, A.R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.150, p. 65-74, 2007.
- KOOMPAPONG, K.; MORI, H.; THAMMASANTHIJARERN, N.; PRASERTBUN, R.; PINTONG, A.R.; POPRUK, S.; ROJEKITTIKHUN, W.; CHAISIRI, K.; SUKTHANA, Y.; MAHITTIKORN, A. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. *Parasite*, v. 21, n. 52, p.1-7, 2014.
- LI, J., et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in Guangdong Province, Southern China. *Parasitology Research*, v.114, p. 2237-2241, 2015.

- LI, Q.; LI, L.; TAO, W.; JIANG1, Y.; WAN, Q.; LIN, Y.; LI, W. Molecular investigation of *Cryptosporidium* in small caged pets in northeast China: host specificity and zoonotic implications. *Parasitology Research*, v. 115, p. 2905-2911, 2016.
- MIRZAGHAVAMI, M.; SADRAEI, J.; FOROUZANDEH, M. Detection of *Cryptosporidium* spp. in free ranging animals of Tehran, Iran. *Journal of Parasitology Diseases*, v. 40, n. 4, p. 1528-1531, 2016.
- MOSS, J.A.; GORDY, J.; SNYDER, R.A. Effective Concentration and Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and the *Microsporidia* from Environmental Matrices. *Journal of Pathogens*, p.1-10, 2014.
- NAKAMURA, A.A.; SIMÕES, D.C.; ANTUNES, R.G.; DA SILVA, D.C.; MEIRELES, M.V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. From fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.166, p. 476-551, 2009.
- NAKAMURA, A.A.; HOMEM, C.G.; SILVA, A.M.; MEIRELES, M.V. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. *Veterinary Parasitology*, v. 205, p.7-13, 2014.
- OLIVEIRA, F. C.; et al. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) em aves, *Struthio camelus* L., 1758 (Aves, Struthionidae) criadas nas regiões norte e baixada litorânea do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.17, supl.1, p. 322-325, 2008.
- OZKUL, I.A.; AYDIN, Y. Small-intestinal cryptosporidiosis in a young pigeon. *Avian Pathology*, v. 23, n. 2, p. 369-372, 1994.
- PAPINI, R.; GIRIVETTO, M.; MARANGI, M.; MANCIANTI, F.; GIANGASPERO, A. Endoparasite infections in pet and zoo birds in Italy. *The Scientific World Journal Article*, p.1-9, 2012.
- PARSONS, M.B.; GILLESPIE, T.R.; LONDORF, E.V.; TRAVIS, D.; LIPENDE, I.; GILAGIZA, B.; KAMENYA, S.; PINTEA, L.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G.M. Global Positioning System Data-Loggers: A Tool to Quantify Fine-Scale Movement of Domestic Animals to Evaluate Potential for Zoonotic Transmission to an Endangered Wildlife Population. *PLoS One*, v. 9, n. 11, e110984, 2014
- QI, M.; WANG, R.; NING, C.; LI, X.;ZHANG, L.; JIAN, F.; SUN, Y.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Experimental Parasitology*, v.128, p. 336-340, 2011.
- QUAH, J. X.; AMBU, S.; LIM, Y. A.; MAHDY, M.A.; MAK, J.W. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* from avian hosts. *Parasitology*, v.138, p. 573-577, 2011.
- RADFAR, M.H.; ASL, E.N.; SEGHINSARA, H.R.; DEHAGHI, M.M.; FATHI, S. Biodiversity and prevalence of parasites of domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in a selected semiarid zone of South Khorasan, Iran. *Tropical Animal Health and Production*, v. 44, n. 2, p. 225-229, 2012.
- RAFIEI, A.; RASHNO, Z.; SAMARBAFZADEH, A.; KHADEM VATAN, S. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from immunocompromised patients and children. *Jundishapur Journal of Microbiology*, v.7, n. 4: e9183, 2014.
- REBOREDO-FERNÁNDEZ A., et al. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology*, v.142, n.7, p. 917-925, 2015.
- RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, v.141, p.1667-1685, 2014.
- RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. *International Journal Parasitology*, v. 45, n. 6, p. 367-373, 2015.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. p.
- SANTÍN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 61, n.1, p.1-10, 2013.
- SEVÁ, A.P.; FUNADA, M.R.; RICHTZENHAIN, L.J.; GUIMARÃES, M.B.; SOUZA, S.O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J.A.; DUARTE, V.V.; SOARES, R.M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.175, p. 276-332, 2011.
- SILVA, D.C.; HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; TEIXEIRA, W.F.; PERRI, S.H.; MEIRELES, M.V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. *Parasitology Research*, v.107, p. 2716-3277, 2010.
- SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *International Journal Parasitology*, v. 43, n.12-13, p. 957-970, 2013.
- STENSVOLD, C.R.; BESER, J.; AXÉN, C.; LEBBAD, M. High Applicability of a Novel Method for gp60-Based Subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 7, p. 2311-2319, 2014.
- XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J.; FAYER, R.; LAL, A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 4, p.1578-1583, 1999.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Review*, v. 17, p. 72-97, 2004.
- XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 80-89, 2010.
- ZAHEDI, A.; PAPANINI, A.; JIAN, F.; ROBERTSON, I.; RYAN, U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. *International Journal Parasitology: Parasites and Wildlife*, v.5, n.1, p.88-109, 2016.