

***Cryptosporidium* spp. em *Aratinga jandaia*, *Diopsittaca nobilis* e *Pionus menstruus* no Brasil***Cryptosporidium* spp. in *Aratinga jandaia*, *Diopsittaca nobilis* and *Pionus menstruus* in BrazilDayane Barbosa de Vasconcelos<sup>1</sup>, Edison Eduardo Vasconcellos Goulart do Amarante<sup>2</sup>, Mariane Marques da Guarda Pinto<sup>2</sup>, Daniel de Almeida Balthazar<sup>2,3</sup> & Fabiano Borges Figueiredo<sup>2</sup>

## ABSTRACT

**Background:** *Cryptosporidium* is an important protozoan in public health and veterinary medicine that often causes diarrhea in an array of hosts in developed/developing countries. Infection of the gastrointestinal system is the most common, but the respiratory system and other sites can also be affected, especially in birds and immunocompromised individuals. Transmission occurs through ingestion or inhalation of oocysts. The number of wild animals, including those in the class of birds, infected with this parasite has grown in recent years. This study aimed to report parasitism by *Cryptosporidium* spp. in captive-raised birds of family Psittacidae at the Rio City Zoo in Rio de Janeiro, Brazil.

**Materials, Methods & Results:** Thirty-three pools of fecal samples of the species *Amazona aestiva*, *Amazona amazonica*, *Anodorhynchus hyacinthinus*, *Ara auricollis*, *Ara canga*, *Ara glaucogularis*, *Ara macao*, *Ara manilapa*, *Ara maracana*, *Ara rubrogenys*, *Aratinga erythrogastra*, *Aratinga cactorum*, *Aratinga auerea*, *Aratinga mitrata*, *Aratinga auricapilla*, *Aratinga jandaia*, *Aratinga wagleri*, *Aratinga leucophthalmus*, *Brotogeris acuticaudata*, *Cynoliseus patagonus*, *Caracopsis vasa*, *Diopsittaca nobilis*, *Graydidascalus brachyurus*, *Muopsitta monachus*, *Nangayus nenday*, *Pionites melancephala*, *Pionites leucogaster*, *Pionus menstruus*, *Pionus chalcopterus*, *Pionus maxiliani*, *Pyrrhura perlata*, *Pyrrhura leucotis*, and *Tricharia malachitacea*, kept in separate enclosures, were analyzed using Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of parasitic antigens. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) was conducted in order to identify the species *Cryptosporidium* in the positive samples targeting the small subunit ribosomal RNA gene (SSU rRNA), followed by sequencing and analysis of the DNA amplicons. *Cryptosporidium* spp. antigen was detected in three (9%) of the thirty-three pools assessed, corresponding to the following species of family Psittacidae: Jandaya parakeet (*Aratinga jandaya*), Red-shouldered macaw (*Diopsittaca nobilis*), and Blue-headed parrot (*Pionus menstruus*). Positivity of the three samples was confirmed by qPCR analysis, but it was not possible to identify the species of *Cryptosporidium* by this technique.

**Discussion:** Zoonotic diseases, such as cryptosporidiosis, have been reported in wild and captive-bred animals worldwide. Several species of the class of birds are parasitized by *Cryptosporidium* spp. Infection in order Psittaciformes has been described in some species raised in captivity in Brazil; however, no reports of *Cryptosporidium* spp. infecting the following species of order Psittaciformes: Jandaya parakeet (*Aratinga jandaia*), Red-breasted macaw (*Diopsittaca nobilis*), and Blue-headed parrot (*Pionus menstruus*), were found in the specific scientific literature. The present study detected infection by *Cryptosporidium* spp. in three species of order Psittaciformes using ELISA and confirmed the positivity of the samples by qPCR, but the species of *Cryptosporidium* could not be identified. These infected birds should be carefully investigated, with identification of the species and analysis of their zoonotic potential, because they can be sources of environmental contamination and infection for the caregivers, visitors, and other animals of the Zoo. This is the first report of parasitism by *Cryptosporidium* spp. in these species of family Psittacidae in Brazil.

**Keywords:** *Cryptosporidium*, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Quantitative Polymerase Chain Reaction, Psittaciformes.

**Descritores:** *Cryptosporidium*, Ensaio de Imunoadsorção Enzimática, Psittaciformes, Real time PCR.

DOI: 10.22456/1679-9216.84085

Received: 20 January 2018

Accepted: 28 June 2018

Published: 30 July 2018

<sup>1</sup>Curso de Medicina Veterinária, Universidade Castelo Branco (UCB), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozoonoses em Animais Domésticos, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro. <sup>3</sup>Fundação Jardim Zoológico da cidade do Rio de Janeiro-RIOZOO, Rio de Janeiro. CORRESPONDENCE: M. Pinto [mmarquesgp@gmail.com - Tel.: +55 (21) 3865-9553]. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozoonoses em Animais Domésticos, INI, FIOCRUZ. Av. Brasil n. 4365. Manguinhos. CEP 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

## INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma protozoonose de importância para saúde pública e veterinária causada pelo *Cryptosporidium* spp. Protozoário que acomete o sistema gastrointestinal e respiratório de várias espécies de hospedeiros, incluindo aves, sendo relatada em mais de 30 espécies de aves dentro das ordens Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes e Estrutiniiformes [16].

Dentre as espécies de *Cryptosporidium* descritas, *Cryptosporidium meleagridis* [23], *C. baileyi* [3] e *C. galli* [15] são relacionadas a infecção em aves, além de 11 genótipos descritos [17]. Para a saúde pública, *C. meleagridis* é a terceira espécie mais relatada infectando os seres humanos [27].

A criptosporidiose nas aves pode afetar, além de todo complexo respiratório e gastrointestinal, a bursa de Fabricius, conjuntiva ocular, ouvido médio, pâncreas e rins, podendo ser causa primária ou secundária a outras etiologias e levar a óbito [10,25].

No Brasil, foram descritas a ocorrência do protozoário em aves domésticas, silvestres e exóticas [5,11,13,21]. O presente trabalho teve como principal objetivo pesquisar a ocorrência de *Cryptosporidium* em psitacídeos mantidos em cativeiro no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (Fundação RioZoo).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta e processamento das amostras

Para a realização deste estudo foram coletados 33 pools de fezes em recintos separados por espécies de psitacídeos no Jardim Zoológico da cidade do Rio de Janeiro (Fundação Rio Zoo), no período de agosto a setembro de 2015. As amostras correspondem as 33 espécies: *Amazona aestiva*, *Amazona amazonica*, *Anodorhynchus hyacinthinus*, *Ara auricollis*, *Ara canga*, *Ara glaucogularis*, *Ara macao*, *Ara manilapa*, *Ara maracana*, *Ara rubrogenys*, *Aratinga erythrogenys*, *Aratinga cactorum*, *Aratinga auerea*, *Aratinga mitrata*, *Aratinga auricapilla*, *Aratinga jandaia*, *Aratinga wagleri*, *Aratinga leucophthalmus*, *Brotogeris acuticaudata*, *Cynoliseus patagonus*, *Caracopsis vasa*, *Diopsittaca nobilis*, *Graydidascalus brachyurus*, *Muopsitta monachus*, *Nangayus nenday*, *Pionites melancephala*, *Pionites leucogaster*, *Pionus menstruus*, *Pionus chalcopteus*, *Pionus maxiliani*, *Pyrrhura perlata*, *Pyrrhura leucotis* e *Trichharia malachitacea*.

De cada recinto, com auxílio de espátulas descartáveis foram coletadas amostras de fezes frescas e que não se encontravam em contato com o solo, sendo colocadas em recipientes plásticos estéreis devidamente identificados e acondicionadas sob refrigeração em caixa térmica para o transporte. No Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos-INI/FIOCRUZ as amostras foram homogeneizadas com água destilada e filtradas com o auxílio de um tamis plástico descartável revestido com gaze para a retirada de resíduos grosseiros. Após a filtragem, a solução foi distribuída em tubos cônicos de 15 mL e centrifugada durante 10 min a 402 × g. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi acondicionado, identificado e armazenado em refrigeração a 4°C até a análise.

### Análise imunológica

A detecção de antígenos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais foi realizada através da utilização de um kit ELISA comercial (*Cryptosporidium stool antigen detection*)<sup>2</sup>, seguindo as recomendações do fabricante.

### Extração de DNA, qPCR e genotipagem

Um volume de 220 µL das amostras positivas no ELISA passaram por processo de extração de DNA utilizando a plataforma de extração automatizada (QIAcube®)<sup>1</sup> com kit comercial (*QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit*)<sup>1</sup>, seguindo as recomendações do fabricante. Ao final da extração foram armazenadas a -20°C até análise molecular.

A qPCR foi utilizada para amplificação da região SSU rRNA (-300 pb). As reações foram realizadas num volume final de 25 µL, sendo 4 µL de amostra e 21 µL da mistura de reação, contendo 12,5 µL do reagente Universal Mastermix<sup>3</sup>, 1,5 µL dos iniciadores CRU18S (*Forward* CRU18S GAG GTA GTG ACA AGA AAT AAC AAT ACA GG e *Reverse* CTG CTT TAA GCA CTC TAA TTT TCT CAA AG) a 900nM, 2,5 µL da sonda (TaqMan® MGB)<sup>3</sup> (TAC GAG CTT TTT AAC TGC AAC AA) a 200nM e 3 µL de soro albumina bovina (BSA)<sup>4</sup> numa concentração de 400 ng/µL, segundo Hadfield *et al.* [7] e Staggs *et al.* [26]. Utilizando o seguinte protocolo de amplificação: 1 ciclo de 50°C por 2 min, 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 10 min e 55 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 s e de anelamento/extensão a 60°C por 1 min.

O produto da qPCR foi enviado a empresa Macrogen Inc. (Coreia do Sul) [ <https://dna.macrogen.com/esp/index.jsp>], onde foi feito o sequenciamento unidirecional utilizando o *primer Forward* original e sendo realizada a análise no sequenciador automatizado ABI 3730XL. As sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando o programa MEGA 7, com ajuste manual e sequências resultantes foram pesquisadas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/Index.html>) para encontrar homologia e semelhanças com outras sequências de *Cryptosporidium* depositadas no *GenBank*.

#### Análise estatística

A análise foi realizada de forma descritiva.

### RESULTADOS

O presente estudo realizado no Jardim Zoológico da cidade do Rio de Janeiro (Fundação Rio Zoo) apresentou detecção de antígeno de *Cryptosporidium* spp. a partir da técnica ELISA, em três (9%) dos 33 *pools* de amostras fecais entre as espécies de psitacídeos analisadas, sendo a positividade referente às espécies Jandaia-verdadeira (*Aratinga jandaia*), Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*), Maitaca-de-cabeça-azul (*Pionus menstruus*) [Figura 1].

Na técnica de qPCR foi possível a confirmação da positividade nas três amostras analisadas, entretanto, a identificação da espécie não pode ser determinada com o sequenciamento.

### DISCUSSÃO

A identificação de doenças zoonóticas como a criptosporidiose em inúmeras espécies de animais em cativeiro e selvagem é relatada em muitos países [1,6,8,19-21]. Em aves são várias as espécies parasitadas por este agente [10] e a taxa de infecção varia entre 3-8% em diferentes países [11,14,18,19,28]. No presente estudo, a positividade encontrada foi de

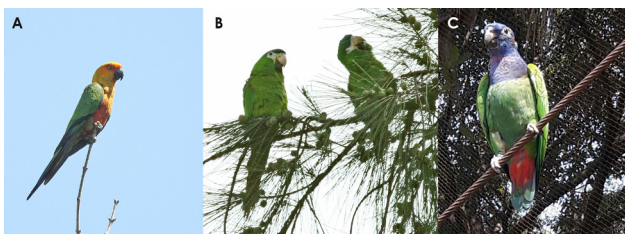
9% que condiz com a variação da taxa de infecção encontrada nos estudos citados acima.

A variação da taxa de infecção pode estar relacionada a forma de coleta das amostras fecais, a amostragem e idade do hospedeiro. Amostras coletadas em *pools* tendem a elevar a frequência de positividade nas espécies analisadas, superestimando a infecção individual [14,24], assim como uma amostragem pequena. A faixa etária das aves examinadas também pode influenciar, fato que pode estar relacionado ao sistema imunológico dos animais adultos que tendem a eliminar menores números de oocistos nas fezes [17]. Para conhecimento real da prevalência nas espécies torna-se importante a amostragem de forma individual das espécies estudadas.

A infecção pelo genótipo aviária II, genótipo aviária III, genótipo aviário V, *Cryptosporidium Meleagridis*, *C. baileyi*, *C. galli* e *C. parvum* foram descritas em Psitacíformes [9,11,12,21]. No Brasil, *Cryptosporidium* spp. foi identificado em Psitacíformes de cativeiro nas seguintes espécies: *Nymphicus hollandicus* [5,11] e *Agapornis roseicollis* [11], infectados pelo genótipo aviária III; *Anodorhynchus hyacinthinus* [4], *Agapornis fisher*, *Ara ararauna*, *N. hollandicus*, *Amazona aestiva* e *A. pretrei* [22]. No entanto, não há nenhum relato na literatura analisada sobre a infecção por *Cryptosporidium* spp. nas espécies *Aratinga jandaia*, *Diopsittaca nobilis*, *Pionus menstruus*, sendo este a primeira descrição.

A identificação da espécie de *Cryptosporidium* não foi possível, provavelmente devido ao baixo número de oocistos presentes nas amostras e a pouca concentração de *amplicons* gerados na amplificação de DNA, o que pode acarretar baixa qualidade do sequenciamento [11,21]. Porém, a positividade das amostras pôde ser confirmada, uma vez que a qPCR apresenta alta sensibilidade [2].

A detecção de aves parasitadas com *Cryptosporidium* spp. deve ser analisada com cuidado, uma vez que podem ser potenciais fontes de infecção para tratadores e visitantes do zoológico, assim como para outros animais. Com esse achado a eliminação dos resíduos provenientes da limpeza dos recintos devem ter destino adequado para que se evite disseminação dos oocistos.



**Figura 1.** Fotos das espécies de psitacídeos positivas para *Cryptosporidium* spp. A- Jandaia-verdadeira (*Aratinga jandaia*). B- Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*). C- Maitaca-de-cabeça-azul (*Pionus menstruus*).

## CONCLUSÕES

Este é o primeiro relato da infecção de *Cryptosporidium* nos psitacídeos das espécies Jandaia-verdadeira (*Aratinga jandaia*), Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*), Maitaca-de-cabeça-azul (*Pionus menstruus*) mantidos em cativeiro no Jardim Zoológico da Cidade do Rio de Janeiro. Apesar de não ter sido possível chegar a espécie do protozoário, não se pode descartar a possibilidade dessas aves estarem parasitadas por espécies de importância zoonótica, mais estudos são necessários para entender se existe implicações em saúde pública.

Estudos futuros devem ser desenvolvidos para identificação das espécies de *Cryptosporidium* circulantes nos animais e no ambiente do zoológico para uma melhor avaliação do risco zoonótico.

## MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Qiagen. Hilden, Germany.

<sup>2</sup>IVD Research Inc. Carlsbad, CA, USA.

<sup>3</sup>Applied Biosystems. Carlsbad, CA, USA.

<sup>4</sup>Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA.

**Funding.** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (Grants: JCNE E-26/201.495/2014 and GEP E-26/110.109/2014) and for the research productivity grant, F. B. Figueiredo.

**Acknowledgements.** The authors would like to thank the workers of the Zoological Gardens of Rio de Janeiro City (RIO ZOO) for their cooperation in sample collection, to the photographer José Felipe Monteiro to make available the photos to illustrate the article and the digital design Wagner Nagib for the assistance in the configuration of the image.

**Declaration of interest.** The authors declare no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## REFERENCES

- 1 Alves M., Xiao L., Lemos V., Zhou L., Cama V., Cunha M.B., Matos O. & Antunes F. 2005. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. *Parasitology Research*. 97(2): 108-112.
- 2 Chalmers R.M. & Katzer F. 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*. 29(5): 237-251.
- 3 Current W.L., Upton S.J. & Haynes T.B. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *Journal of Protozoology*. 33(2): 289-296.
- 4 Farret M.H., Fanfa V.R., Ragagnin L., Silva A.S. & Monteiro S.G. 2010. Primeiro registro de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em amostras de fezes de arara azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) na região sul do Brasil. *Biotemas*. 23(3): 219-221.
- 5 Gomes R.S., Huber F., da Silva S. & Bomfim T.C. 2012. *Cryptosporidium* spp. Parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries, and pet shops. *Parasitologia Veterinária*. 110(4): 1363-1370.
- 6 Gómez M.S., Torres J., Gracenea M., Fernandez-Morán J. & Gonzalez-Moreno O. 2000. Further report on *Cryptosporidium* in Barcelona zoo mammals. *Parasitology Research*. 86(4): 318-23.
- 7 Hadfield S.J., Robinson G., Elwin K. & Chalmers R.M. 2011. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(3): 918-924.
- 8 Matsubayashi M., Takami K., Kimata I., Nakanishi T., Tani H., Sasai K. & Baba E. 2005. Survey of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in various animals at a zoo in Japan. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 36(2):331-335.
- 9 Morgan U.M., Xiao L., Limor J., Gelis S., Raidal S.R., Fayer R., Lal A., Elliot A. & Thompson R.C. 2000. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). *Australian Veterinary Journal*. 78(3): 182-183.
- 10 Nakamura A.A. & Meireles M.V. 2015. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 24(3): 253-267.
- 11 Nakamura A.A., Simões D.C., Antunes R.G., da Silva D.C. & Meireles M.V. 2009. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 166(1-2): 47-51.
- 12 Ng J., Pavlasek I. & Ryan U. 2006. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(12): 7548-7553.
- 13 Oliveira F.C.R., Ederli N.B., Ederli B.B., Albuquerque M.C. & Santos M.D. 2008. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) em avestruzes, *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*. 17(Suppl.1): 322-325.

- 14 Qi M., Wang R., Ning C., Li X., Zhang L., Jian F., Sun Y. & Xiao L. 2011. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Experimental Parasitology*. 128(4): 336-340.
- 15 Reboredo-Fernández A., Ares-Mazás E., Cacciò S.M. & Gómez-Couso H. 2015. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology*. 142(7): 917-925.
- 16 Rohela M., Lim Y.A., Jamaiah I., Khadijah P.Y., Laang S.T., Nazri M.H. & Nurulhuda Z. 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in Wrinkled Hornbill and other birds in the Kuala Lumpur National Zoo. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 36(Suppl 4): 34-40.
- 17 Ryan U. 2010. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology*. 124(1): 113-20.
- 18 Ryan U., Fayer R. & Xiao L. 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. 141(13): 1667-1685.
- 19 Ryan U. & Power M. 2012. *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology*. 139(13): 1673-1688.
- 20 Ryan U.M., Xiao L., Read C., Sulaiman I.M., Monis P., Lal A.A., Fayer R. & Pavlasek I. 2003. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Protozoology*. 89(4): 809-813.
- 21 Sevá A.P., Funada M.R., Richtzenhain L., Guimarães M.B., Souza S.O., Allegretti L., Sinhorini J.A., Duarte V.V. & Soares R.M. 2011. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 175(1-2): 27-32.
- 22 Silva A.S., Monteiro S.G., Silva M.K., Soares J.F., Oliveira C.B., Lima F.P., Zanette R.A., Souza C.P. & Salomão E.L. 2008. Parasitismo por *Cryptosporidium* spp. em psitacídeos mantidos em cativeiro no município de Cachoeira do Sul- RS, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*. 15(2): 234-338.
- 23 Slavin D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*. 65(3): 262-266.
- 24 Snak A., Garcia G.F., Delgado L.E.S. & Osaki S.C. 2015. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in wild animals living in the Cascavel city park, Paraná, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 36(Suppl 2): 4323-4332.
- 25 Sreter T. & Varga I. 2000. Cryptosporidiosis in birds - a review. *Veterinary Parasitology*. 87(4): 261-279.
- 26 Staggs S.E., Beckman E.M., Keely S.P., Mackwan R., Ware M.W., Moyer A.P., Ferretti J.A., Sayed A., Xiao L. & Villegas E.N. 2013. The Applicability of TaqMan-Based Quantitative Real-Time PCR Assays for Detecting and Enumerating *Cryptosporidium* spp. oocysts in the Environment. *PLoS One*. 8(6): e66562.
- 27 Zahedi A., Papparini A., Jian F., Robertson I. & Ryan U. 2016. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 5(1): 88-109.
- 28 Zhang X.X., Zhang N.Z., Zhao G.H., Zhao Q. & Zhu X.Q. 2015. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* infection in pet parrots in north China. *BioMed Research International*. 2015: 549798.