



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ROBERTA DOS SANTOS TOLEDO

***Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM AMOSTRAS DE ÁGUA  
E DE FEZES DE ANIMAIS E HUMANOS, PRESENÇA DE  
PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS  
EM ÁGUA E LEITE E ASSOCIAÇÃO À FATORES DE  
EXPOSIÇÃO EM PROPRIEDADES DE BOVINOCULTURA  
LEITEIRA.**

ROBERTA DOS SANTOS TOLEDO

***Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM AMOSTRAS DE ÁGUA  
E DE FEZES DE ANIMAIS E HUMANOS, PRESENÇA DE  
PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS  
EM ÁGUA E LEITE E ASSOCIAÇÃO À FATORES DE RISCO  
EM PROPRIEDADES DE BOVINOCULTURA LEITEIRA.**

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

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roberta Lemos Freire

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

T649c Toledo, Roberta dos Santos.

*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. e amostras de água e de fezes de animais e humanos, presença de praguicidas organofosforados e carbamatos em água e leite e associação à fatores de risco em propriedades de bovinocultura leiteira / Roberta dos Santos Toledo. – Londrina, 2015.  
105 f. : il.

Orientador: Roberta Lemos Freire.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. *Cryptosporidium* – Teses. 2. *Giardia* – Teses. 3. Pesticidas – Teses. 4. Água – Qualidade – Teses. 5. Protozoologia – Teses. 6. Propriedade rural – Teses. I. Freire, Roberta Lemos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:616.993.192.1

ROBERTA DOS SANTOS TOLEDO

***Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM AMOSTRAS DE ÁGUA E DE FEZES DE ANIMAIS E HUMANOS, PRESENÇA DE PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS EM ÁGUA E LEITE E ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO EM PROPRIEDADES DE BOVINOCULTURA LEITEIRA.**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa Dra. Roberta Lemos Freire  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. João Luis Garcia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Regina Mitsuka Breganó  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

---

Profa. Dra. Sílvia Cristina Osaki  
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Londrina, 16 de março de 2015.

## AGRADECIMENTO (S)

Agradeço aos meus pais, Carlos (*in memoriam*) e Nilse, por abdicarem de seus sonhos para que os meus se realizassem e aos meus irmãos Alexandre, André (*in memoriam*) e Heloísa por serem exemplos de superação, ética e sabedoria.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Roberta Lemos Freire, pela amizade, paciência, compreensão e ensinamentos nestes 12 anos de convivência acadêmica.

Aos professores Dr. Itamar Teodorico Navarro e Dr. João Luis Garcia pelos ensinamentos e orientações durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às professoras Dra. Daisy Pontes Netto e Dra Emília Kiyomi Kuroda pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Aos professores Dr. Itamar Teodorico Navarro, Dr. Selwyn Arlington Headley e Dra. Liza Ogawa pelas consideráveis sugestões fornecidas durante participação na banca de qualificação.

À secretária de pós graduação em ciência animal Helenice Kieski, por toda dedicação ao curso.

À técnica de nível superior Dra Elizabete Regina Marangoni Marana pelo auxílio durante processamento de amostras no laboratório de Zoonoses e Saúde Pública.

Aos técnicos de laboratório Beatriz de Souza Lima Nino e Dalva Maria Navarro Fabrício pelo auxílio nos laboratórios de Protozoologia e Parasitologia.

À médica veterinária da EMATER de Campo Mourão Iole Elsa Canali, pelo auxílio no contato com os produtores rurais.

À todos os produtores rurais que confiaram em meu trabalho e abriram as portas de sua propriedade para que eu o desenvolvesse.

Aos meus ex-alunos da Faculdade Integrado de Campo Mourão Ricardo Lima e Neno Xavier pelo auxílio nas coletas de campo.

À mestranda Laura Fernanda Condota Borba de Souza e aos residentes Daniel França Horta e Thalysie do Carmo Drape pelo auxílio nas análises toxicológicas.

Aos pós graduandos Liza Ogawa, Victor Bittencourt Dutra Tabacow, Hannah Lia Ethiene Peruch Lemos dos Santos, Jonatas Campos Almeida, Ana Carolina Miura Gimenez, Maria Paula de Carvalho Ewald, José Maurício Ferreira Neto, Thais Agostinho Martins, Mércia Seixas e aos estagiários de iniciação científica Maíra Moreira dos Santos, Filipe Aguera, Winni Alves Ladeia e Aline Ticiani Paschoal pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Por último, gostaria de agradecer especialmente aos meus anjos da guarda científicos Fernanda Pinto Ferreira e Felipe Danyel Cardoso Martins pelo auxílio nas diferentes etapas do projeto, pelas discussões científicas, por buscarem meios para solucionar os problemas, enfim, por se dedicarem integralmente ao desenvolvimento deste projeto.

TOLEDO, Roberta dos Santos. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água e de fezes de animais e humanos, presença de praguicidas organofosforados e carbamatos em água e leite e associação com fatores de risco em propriedades de bovinocultura leiteira: 2015. 105 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência e identificar *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de fezes e de água, além de verificar a presença de organofosforados e carbamatos em amostras de água e leite em propriedades de bovinocultura leiteira e associar os resultados a fatores de exposição. Amostras de fezes de bovinos, suínos, e humanos e de água foram coletadas em 55 propriedades localizadas em Araruna e Campo Mourão, PR. Pesquisa de (oo)cistos nas fezes foi realizada por meio da coloração de Ziehl Neelsen e centrifugo-flutuação em sulfato de zinco. Amostras positivas nestas técnicas foram submetidas à *nested*-PCR para amplificação do gene SSU rRNA. Análise microbiológica foi realizada em amostras de água de todas as propriedades. Análise parasitológica da água foi realizada em 31 propriedades por imunofluorescência direta e *nested*-PCR. A identificação das espécies de *Cryptosporidium* foi realizada por sequenciamento e, no caso de infecções mistas, por PCR-RFLP. A pesquisa de organofosforados e carbamatos foi realizada pela técnica de cromatografia em camada delgada. Variáveis de exposição foram obtidas por meio de questionário epidemiológico. A prevalência de infecção por *Giardia* spp em todos os bovinos foi 7,6% e em bezerros até dois meses 17,1%; por *Cryptosporidium* spp. foi 10,2% em todos os bovinos e 25,3% em bezerros até dois meses. Entre as amostras de fezes de bovino positivas na PCR, *C. parvum* foi identificado em 41 (64%), *C. ryanae* em 8 (12,5%), *C. bovis* em 4 (6,3%), *C. andersoni* em 5 (7,8%) e infecção mista em 20 (31,3%). Apenas um *pool* de fezes de suíno foi positivo para *Giardia* spp. e cinco foram positivos para *Cryptosporidium* spp. Estes parasitos não foram identificados nas amostras de fezes humanas. Em amostras de água, coliformes termotolerantes foram identificados em 25 (45,5%) propriedades. *Giardia* e *Cryptosporidium* foram identificados em três amostras de água, as quais também possuíam coliformes termotolerantes. *C. parvum* foi identificado em uma das amostras, cuja propriedade possuía bezerros positivos para a mesma espécie. A presença de coliformes foi associada à origem da água, estrutura e degradação de nascentes, chuva e turbidez. Organofosforado e carbamato foram identificados em 51% e 23,6% das amostras de leite e em 31% e 9,1% das amostras de água respectivamente. Organofosforados se destacaram entre os mais utilizados como praguicidas nas lavouras e ectoparasiticidas nos animais. O uso de organofosforados nas lavouras demonstrou associação com sua presença em leite e água. Conclui-se maior prevalência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em bezerros e presença de *C. parvum* e *Giardia duodenalis* em água de propriedades leiteiras. A maioria das fontes de água não possui proteção adequada, principalmente nascentes, com alta frequência de coliformes de origem fecal. Resíduos de praguicidas também estão presentes em água e leite, principalmente organofosforados. Há a necessidade de monitoramento de resíduos no leite, conscientização e assistência a produtores rurais para uso de praguicidas, manejo de animais, preservação de fontes naturais de água e tratamento da água de consumo humano e animal.

**Palavras-chave:** *Cryptosporidium*. *Giardia*. Praguicidas. Prevalência. Nascentes. Coliformes.

TOLEDO, Roberta dos Santos. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in fecal samples and water, presence of organophosphorus and carbamate pesticides in water and milk and association with exposure factors in dairy farms.: 2015. 105 p. Thesis (Doctorate Degree in Animal Sciences) – Londrina State University, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

This study aimed to determine the prevalence and identify *Cryptosporidium* spp and *Giardia* spp in fecal samples and water, verify the presence of organophosphorus and carbamates in water and milk samples in dairy farms and associate the exposure factors. Samples of cattle feces, swine, human and water were collected in 55 dairy farms of Araruna and Campo Mourao, PR, Brazil. Presence of *Cryptosporidium* and *Giardia* were determined by Ziehl Neelsen modified and zinc sulfate centrifugal flotation methods. Positive samples were submitted to nested-PCR for amplification of the SSU rRNA gene. Microbiological analysis was performed on water samples from all properties. Parasitological water analysis was performed in 31 farms by immunofluorescence assay and nested-PCR. *Cryptosporidium* species were determined by DNA sequencing analyses or restriction fragment length polymorphism, in the case of mixed infections. The presence of organophosphorus and carbamates was established by thin layer chromatography. Exposure variables were obtained using an epidemiological questionnaire. The prevalence of infection with *Giardia* spp was 7.6% in cattle and 17.1% in calves up to two months; for *Cryptosporidium* spp. was 10.2% in cattle and 25.3% in calves up to two months. In fecal samples of cattles, which were positive in PCR, *C. parvum* was identified in 41 (64%), *C. ryanae* 8 (12.5%), *C. bovis* 4 (6.3%), *C. andersoni* 5 (7, 8%) and mixed infection in 20 (31.3%). Only one swine pool was positive for *Giardia* spp. and five were positive for *Cryptosporidium* spp. These protozoans have not been identified in samples of human faeces. Fecal coliforms were identified in water samples of 25 (45.5%) farms. *Giardia* and *Cryptosporidium* were identified in three water samples, which also had fecal coliform. *C. parvum* was identified in a water sample from a farm with positive calf. The presence of fecal coliform was associated with the origin of water, structure and degradation of springs, rain and turbidity. Organophosphorus and carbamate were identified in 51% and 23.6% of milk samples and in 31% and 9.1% of water samples respectively. Organophosphorus stood out among the most used as pesticides in crops and animals ectoparasiticides. The use of these compounds in crops were associated with the presence in milk and water. In conclusion there is a higher prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves and presence of *C. parvum* and *G. duodenalis* in water of the dairy farms. Most water sources are unprotected, mainly springs, with high frequency of fecal coliforms. Pesticide residues are present in water and milk, especially organophosphorus. There is need for waste monitoring in milk, awareness and assistance to farmers to use pesticides, animal management, preservation of natural water sources and treatment of water for human consumption or animal

**Keywords:** *Cryptosporidium*. *Giardia*. Pesticides. Prevalence. Springs. Coliforms.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1** - Movimento dos Agrotóxicos no Ecossistema Aquático..... 17
- Figura 2** - Número de surtos de protozooses de veiculação hídrica no mundo, 1946-2010..... 22

### ARTIGO A

- Figura 1** - Fluxograma da obtenção e análise de amostras de fezes e água de 30 propriedades leiteiras de Campo Mourão e 20 de Araruna, PR, 2012-2014..... 56

### APÊNDICES

#### APÊNDICE A

- Figura 1** - Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas *SspI* (A), *Asel* (B), e *MbolI* (C) em dez amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* spp. Gel de agarose 2,5% corado com Sybr Safe. .... 100
- Figura 2** - Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas *SspI* (A), *AseI* (B), *DdeI* (C) e *MboII* (D) em duas amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* spp. Gel de agarose 2,5% corado com Sybr Safe. .... 101

## LISTA DE QUADROS

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Quadro 1</b>	- Espécies de <i>Cryptosporidium</i> e seus hospedeiros principais .....	26
<b>Quadro 2</b>	- Espécies, grupos genéticos de <i>Giardia duodenalis</i> e hospedeiros do gênero <i>Giardia</i> .....	31

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO A

- Tabela 1** – Prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em fezes de bovinos, de propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR .....63
- Tabela 2** – Variáveis com associação estatística significativa com a presença de cistos de *Giardia* spp./oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de 937 bovinos leiteiros de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014.....63
- Tabela 3** – Distribuição das espécies de *Cryptosporidium* de acordo com a faixa etária, identificadas por sequenciamento genético e PCR-RFLP em fezes de bovinos de Araruna e Campo Mourão, PR, 2012 a 2014.....65
- Tabela 4** – Prevalência de coliformes termotolerantes em 155 amostras de água obtidas na primeira e segunda visita às propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014. ....67
- Tabela 5** – Variáveis com associação estatística significativa com a presença de coliformes termotolerantes em 124 amostras de água de 55 propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014.....68
- Tabela 6** – Fonte de origem, turbidez, parâmetros bacteriológicos de amostras de água positivas para *Cryptosporidium* spp. ou *Giardia* spp., espécies identificadas por sequenciamento genético e dados de precipitação hídrica 24 e 48 horas antes da coleta em quatro propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2014.....69

### ARTIGO B

- Tabela 1** Prevalência de resíduos de organofosforados e carbamatos em amostras de água de 55 propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014. ....90
- Tabela 2** – Principais tipos de culturas agrícolas e número de propriedades que utilizam organofosforados e carbamatos nestas culturas em 55 propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014.....90
- Tabela 3** – Variáveis com associação estatística significativa com a presença de organofosforados em 55 amostras de leite e água de propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012-2014 .....91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB	Carbamato
CTT	Coliformes termotolerantes
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC	Intervalo de Confiança
OF	Organosforado
OR	Odds Ratio
p	Probabilidade
PCR	Reação em Cadeia Pela Polimerase
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
RID	Reação de Imunofluorescência Direta
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SINDIVEG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal
UNESCO	United Nation Educational, Scientific and Cultural Organization
uT	Unidade de Turbidez
VMP	Valor Máximo Permitido
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1	ÁGUA: IMPORTÂNCIA E DISTRIBUIÇÃO .....	15
2.2	QUALIDADE DA ÁGUA: IMPACTO À SAÚDE PÚBLICA .....	16
2.2.1	Resíduos Químicos Veiculados pela Água.....	16
2.2.2	Patógenos Veiculados pela Água .....	19
2.2.2.1	Bactérias .....	20
2.2.2.2	Parasitas.....	21
2.3	<i>CRYPTOSPORIDIUM</i> E <i>GIARDIA</i> : PATÓGENOS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA EMERGENTES .....	22
2.3.1	<i>Cryptosporidium</i> .....	23
2.3.1.1	Ciclo biológico .....	23
2.3.1.2	Taxonomia e hospedeiros .....	24
2.3.1.3	Epidemiologia da criptosporidiose humana .....	27
2.3.1.4	Epidemiologia da criptosporidiose bovina .....	28
2.3.2	<i>Giardia</i> .....	30
2.3.2.1	Ciclo biológico .....	30
2.3.2.2	Taxonomia e hospedeiros .....	30
2.3.2.3	Epidemiologia da giardiase humana.....	32
2.3.2.4	Epidemiologia da giardiase bovina .....	32
2.3.3	<i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> : veiculação hídrica.....	34
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	37
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	52
3.1	OBJETIVO GERAL .....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	52

<b>4</b>	<b>ARTIGO A – <i>Cryptosporidium</i> spp. E <i>Giardia</i> spp. EM AMOSTRAS DE FEZES E ÁGUA E FATORES DE EXPOSIÇÃO ASSOCIADOS EM PROPRIEDADES DE BOVINOCULTURA LEITEIRA .....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO B – ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS EM ÁGUA E LEITE DE PROPRIEDADES DE BOVINOCULTURA LEITEIRA INSERIDAS EM REGIÃO DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>98</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE A (ARTIGO A) – Questionário Epidemiológico (Humanos).....</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICE A/B (ARTIGO A/B) – Questionário Epidemiológico (Propriedade) .....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A água representa um importante veículo de agentes nocivos à saúde humana e animal, pois sua ampla dispersão abrange diferentes populações (KARANIS; KOURENT; SMITH, 2007; CANEPARI; PRUZO, 2008). O risco de veiculação de patógenos e produtos químicos tem aumentado devido à degradação de recursos hídricos pelo despejo de esgoto doméstico, fezes de animais e defensivos agrícolas (FRANCO, 2007; AUGUSTO, 2012).

No ambiente rural, o uso intenso de agrotóxicos e a criação de animais podem favorecer a contaminação ambiental e, conseqüentemente da água, por praguicidas e parasitos intestinais (TOMITA; BEYRUTH, 2002). Nos últimos anos a venda de agrotóxicos aumentou consideravelmente, com destaque para organofosforados e carbamatos, inseticidas amplamente utilizados na agropecuária brasileira e responsáveis pelo maior número de intoxicações agudas no meio rural (NERO et al., 2007; SINDIVEG, 2013). Além destas há evidências de que a exposição crônica a baixas doses de organofosforados podem resultar em déficits neurológicos e neurocomportamentais (ROSS et al., 2013).

Os protozoários entéricos *Cryptosporidium* e *Giardia* tem emergido no mundo todo como patógenos de veiculação hídrica, sendo frequentemente responsáveis por surtos (CARMENA et al., 2006). Os mananciais utilizados para o abastecimento de populações urbanas e rurais recebem o efluente de esgoto doméstico tratado e não tratado, o que ameaça a saúde humana e animal (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

*C. hominis*, espécie antroponótica e *C. parvum*, espécie zoonótica de alta prevalência em bovinos jovens, são as principais espécies associadas com a doença em humanos (CACCIÒ; PUTIGNANI, 2014). Assembleias A e B de *G. duodenalis*, são as mais frequentes em humanos (RYAN; CACCIÓ, 2013) e a sub-assembleia AI frequentemente identificada em humanos e animais de produção (SPRONG et al., 2009; RYAN; CACCIÒ, 2013). Neste contexto, a contaminação de mananciais por fezes de bovinos tem se tornado uma constante preocupação, pois estes animais são responsáveis pela eliminação de milhões de (oo)cistos (CROCKETT; HAAS, 1997).

Apesar de a Portaria do Ministério da Saúde 2.914/2011 (BRASIL, 2011) estabelecer o monitoramento de resíduos e de *Cryptosporidium* e *Giardia* em água de manancial de abastecimento, o acesso à água potável no Brasil é divergente entre a área urbana e rural, na qual a maior parte da população é abastecida por fontes alternativas, sem monitoramento de potabilidade (SILVA; HELLER; CARNEIRO, 2012). Desta forma,

investigar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em animais, humanos e na água de propriedades rurais, além do uso de organofosforados e carbamatos na lavoura e sua presença em água e leite é bastante relevante do ponto de vista de saúde pública e saúde

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. ÁGUA: IMPORTÂNCIA E DISTRIBUIÇÃO

A água é um bem indispensável à sobrevivência do planeta, pois é utilizada para abastecimento doméstico e industrial, irrigação agrícola, geração de energia elétrica, lazer, recreação e preservação de flora e fauna (GRIZA; ORTIZ; GEREMIAS, 2008). É necessário que o desenvolvimento econômico e social seja compatível com a conservação do meio ambiente, no entanto os recursos naturais não têm sido utilizados adequadamente pela população humana, o que tem causado deterioração das águas disponíveis (REBOUÇAS, 2006).

O mundo possui dois terços de sua superfície cobertos por água e apenas 2,5% são compostos por água doce, dos quais 0,3% constitui a água doce disponível para o uso em diferentes atividades (UNESCO, 2003). Várias partes do mundo já sofrem pela escassez de água potável disponível para consumo humano e animal, devido ao aumento da população humana e à sua intervenção nos ambientes urbano e rural (AMARAL et al., 2006), seja pelo consumo em ritmo mais acelerado que sua renovação, seja pela geração de produtos residuais orgânicos e inorgânicos (MORAES; JORDÃO, 2002). A ampla dispersão e abrangência populacional da água facilitam a veiculação de agentes nocivos à saúde (KARANIS; KOURENT; SMITH, 2007; CANEPARI; PRUZO, 2008). Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde, cerca de 750 milhões de pessoas não têm acesso à água potável de forma sustentável, 1,8 bilhão usam fonte contaminada com fezes, 2,5 bilhões não têm acesso a saneamento adequado e um bilhão defeca ao ar livre, sendo nove em cada dez de áreas rurais (WHO, 2014).

O Brasil se destaca no cenário mundial devido à grande descarga de água doce dos seus rios, que representa 53% da produção de água doce do continente sul-americano e 12% do total mundial (REBOUÇAS, 2006). Apesar desta abundância, existem áreas bastante carentes com recursos hídricos limitados. Em regiões onde o desenvolvimento ocorreu de forma desordenada, deteriorando os recursos hídricos disponíveis devido ao lançamento de esgotos domésticos, despejos industriais, agrotóxicos e outros poluentes, a escassez é bastante grave (MOITA e CUDO, 1991; REBOUÇAS, 2006).

Apesar do conhecimento de que a má qualidade da água leva a graves problemas de saúde pública, ainda é grande a discrepância no acesso à água potável, já que

em grandes centros urbanos o abastecimento de água é próximo da universalidade e em pequenos municípios e áreas rurais isso não ocorre (SILVA; HELLER; CARNEIRO, 2012). Em pesquisa realizada sobre o abastecimento de água em área urbana e rural, foi observado que aproximadamente um terço dos domicílios rurais recebe água da rede de distribuição, enquanto 66,8% utiliza soluções alternativas, como o uso de poços freáticos ou profundos e a coleta direta das nascentes de água, sem tratamento ou monitoramento de potabilidade (BRASIL, 2012).

## 2.2. QUALIDADE DA ÁGUA: IMPACTO À SAÚDE PÚBLICA

A água exerce influência decisiva na qualidade de vida das populações, pois a qualidade e infraestrutura de saneamento tem forte impacto sobre a saúde pública, uma vez que as fontes de água doce utilizadas para dessedentação humana vem sofrendo processo de degradação devido ao despejo de esgoto, fezes de animais, defensivos agrícolas e efluentes industriais, aumentando o risco de veiculação de patógenos e produtos químicos (FRANCO, 2007; AUGUSTO, 2012). No ambiente rural, destacam-se os agrotóxicos, devido ao intenso uso em cultivos agrícolas brasileiros, além de bactérias e parasitos, em decorrência do grande volume de dejetos da criação de animais (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

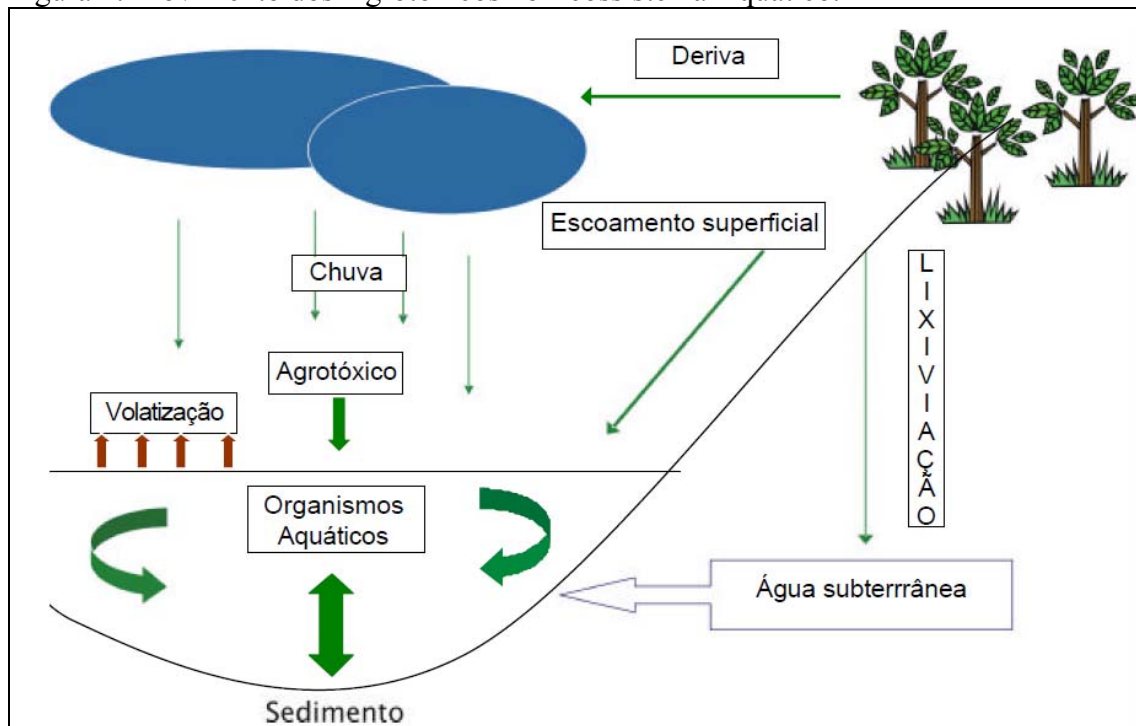
### 2.2.1 Resíduos Químicos Veiculados pela Água

A poluição das águas pode ser causada por compostos orgânicos e inorgânicos, cuja presença ocorre devido ao lançamento de efluentes de esgotos industriais e de fertilizantes e defensivos agrícolas utilizados na agropecuária, sendo metais pesados e agrotóxicos os mais frequentes (NETO; FERREIRA, 2007).

Embora a agricultura seja uma das muitas fontes de poluição, geralmente é apontada como a principal contribuinte de diferentes categorias de poluentes, com destaque para os agrotóxicos, cujo consumo mundial tem aumentado exponencialmente (ONGLEY, 1996; PEREZ; MOREIRA, 2007). Os agrotóxicos, também conhecidos como praguicidas ou pesticidas, são utilizados como principal estratégia no combate e prevenção de pragas agrícolas, atuando como agentes herbicidas, inseticidas e fungicidas (JARDIM; ANDRADE; QUEIRÓZ; HELLER; SILVA, 2009). A grande expansão do uso destes compostos na agropecuária ocorreu após a Segunda Guerra Mundial, com a chamada “Revolução Verde”, cujo objetivo foi aumentar a produção de cereais, forragens e proteína

animal (MOLENTO, 2009). Estes produtos favoreceram maior produtividade agrícola e auxiliaram no controle de vetores e doenças, porém o uso excessivo e desordenado vem provocando impacto ambiental, com acúmulo de resíduos em água, solo, ar, plantas e animais, podendo também atingir a população humana por meio da cadeia alimentar (FONTENELE et al., 2010). Os praguicidas podem alcançar os cursos de águas superficiais através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial; águas subterrâneas, principalmente lençóis freáticos, podem ser contaminados pelo processo de lixiviação (TOMITA; BEYRUTH, 2002). O movimento que os agrotóxicos realiza no ecossistema aquático (Figura 1), permite evidenciar que sua contínua interação entre água e o sedimento pode resultar em maior tempo de exposição dos organismos aquáticos a estes compostos (SPADOTTO et al., 2004).

Figura 1: Movimento dos Agrotóxicos no Ecossistema Aquático.



Fonte: TOMITA; BEYRUTH, 2002

Originalmente, os agrotóxicos eram pouco solúveis e com alto potencial de adesão ao solo; com a evolução tecnológica passaram a ser mais solúveis em água e voláteis e com menor capacidade de adesão, tornando-se mais tóxicos e persistentes, o que aumentou a preocupação com a contaminação dos sistemas hídricos (VEIGA et al., 2006). Entre eles, destaca-se o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), organoclorado, cuja característica de persistência auxiliou na eliminação de um grande número de pragas por maior período de tempo, porém também representou danos ao ambiente e à saúde pública, uma vez que são bioacumulados e biomagnificados (SMITH; GANGOLLI,

2002; TOMITA; BEYRUTH, 2002). Danos causados ao meio ambiente por organoclorados foram notificados a partir da década de 1960 e seu uso foi proibido em 1985, sendo substituídos por compostos mais eficazes no controle de pragas e menos persistentes no ambiente como organofosforados e carbamatos e, posteriormente, piretróides (STOPELLI e MAGALHÃES, 2005; ARAÚJO et al., 2007; BASTOS et al., 2011). Os efeitos de praguicidas sobre a fauna aquática variam de acordo com os tipos de substâncias empregadas, com sua toxicidade e com a estabilidade em ambientes aquáticos, podendo se caracterizar por alterações fisiológicas em alguns organismos ou pela morte maciça de populações (ARIAS et al., 2007).

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e consome, anualmente, cerca de um milhão de toneladas (PEDLOWSKI, 2012). Entre os diferentes defensivos agrícolas, a venda de inseticidas no Brasil aumentou nos últimos anos, atingindo 40% em 2013 (SINDIVEG, 2013). Organofosforados e carbamatos são inseticidas amplamente utilizados na agropecuária e responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural (NERO et al., 2007). Em regiões de intensa produção de agrícola, o consumo destes compostos é bastante elevado, podendo afetar o ecossistema da região, conforme demonstrado por estudo realizado no Rio de Janeiro que identificou baixa atividade da acetilcolinesterase em músculo de peixes devido à presença de organofosforados e carbamatos (ARIAS et al., 2007). Estes compostos são inibidores da acetilcolinesterase, fazendo com que impulsos nervosos não se interrompam entre as sinapses, levando a morte dos insetos, principais alvos; como a acetilcolinesterase é uma enzima presente também em animais e humanos, estes compostos podem atingir outros organismos além de seus alvos primários (VITAL, 2002; SPADOTTO, 2006).

Os efeitos colinérgicos causados pela intoxicação aguda por organofosforados e carbamatos, assim como os efeitos neurotóxicos tardios em decorrência da intoxicação aguda por organofosforados, são bem estabelecidos (COLOSIO et al., 2009). Diferentemente dos organoclorados, estes compostos são menos persistentes no ambiente e degradam-se rapidamente, porém níveis baixos acumulam-se em água e alimentos (GOMATHY et al., 2015). Desta forma, a intoxicação aguda está associada à ingestão de água e alimento com concentração superior ao valor máximo permitido (VMP) ou à aspiração e/ou penetração pela pele durante a aplicação (VITAL, 2002). No entanto, há evidências de que a exposição crônica a baixas doses de organofosforados pode resultar em prolongados déficits neurológicos e neurocomportamentais (ROSS et al., 2013). Estudo realizado por Hernandez et al., 2015,

identificou persistentes alterações no transporte axonal no cérebro de ratos experimentalmente expostos a baixas doses de clorpirifós, um organofosforado utilizado com frequência no controle de pragas agrícolas. Neste contexto, o monitoramento de águas contaminadas por estes praguicidas é de extrema importância, principalmente em áreas de intenso cultivo agrícola.

No Brasil, a portaria 2914/2011 prevê um plano de amostragem para os parâmetros de agrotóxicos de acordo com a avaliação do uso destes na bacia hidrográfica do manancial de contribuição e com a sazonalidade das culturas agrícolas, de forma que o VMP de organofosforados e carbamatos varia de 0,03 a 120µg/L dependendo do princípio ativo (BRASIL, 2011).

### 2.2.1. Patógenos veiculados pela água

Enfermidades gastroentéricas estão diretamente relacionadas com condições de abastecimento de água, saneamento básico e higiene (JOVENTINO et al., 2010). Apesar dos avanços na medicina e no saneamento, patógenos de veiculação hídrica são responsáveis por parte dos quatro bilhões de casos de diarreia no mundo e 1,6 milhão de mortes por ela (WHO, 2009). Vários estudos elucidaram os benefícios do saneamento, melhorias na qualidade da água e educação sanitária familiar na diminuição de casos de diarreia (FEWTREL et al., 2005; CLASEN et al., 2009; JOVENTINO et al., 2010; SILVA; HELLER; CARNEIRO, 2012). Em estudo realizado em Canindé, CE, foi possível verificar que a construção de cisternas para abastecimento de populações que utilizavam água de cacimbões e açudes, teve associação inversamente proporcional com casos de diarreia em crianças menores de cinco anos (JOVENTINO et al., 2010). Em Vitória, ES, ao relacionarem dados de qualidade da água obtidos do Programa de Controle e Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (VIGIÁGUA), Queiróz, Heller e Silva (2009) observaram maior frequência de casos de diarreia em períodos com presença de coliformes termotolerantes na água.

Diferentes patógenos como vírus, bactérias, fungos e parasitos podem ser transmitidos pela água (CANEPARI; PRUZZO, 2008). A maioria destes patógenos são de origem entérica, humana ou animal, transmitidos pela via fecal-oral, ou seja, são eliminados nas fezes e ingeridos com a água ou alimento contaminado com fezes (GRABOW, 1996). Dentre os fatores que podem comprometer a qualidade da água e contribuir para a sua contaminação fecal destacam-se o destino inadequado de esgotos

sanitários e o escoamento de fezes de animais em propriedades de criação (MALHEIROS et al., 2009). A presença de atividades agropecuárias impactantes pode interferir na qualidade da água de mananciais (ROCHA et al., 2006). Em propriedades rurais, como poços e nascentes são as principais fontes de água, é maior o risco de doenças de veiculação hídrica devido à proximidade destas fontes de água a fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagens (STUKEL et al., 1990; AMARAL et al., 2003). Poços antigos e/ou inadequadamente vedados, nascentes desprotegidas, destruição de mata ciliar e manejo inadequado de solo facilitam a contaminação das águas subterrâneas e superficiais em áreas rurais, sendo bovinos e suínos importantes fontes de contaminação, uma vez que são reservatórios de diversos patógenos, muitos dos quais zoonóticos (AMARAL et al., 2003).

#### 2.2.1.1. Bactérias

Entre os micro-organismos patogênicos, as bactérias de origem fecal são bastante comuns, porém a melhoria nos processos de tratamento da água, principalmente cloração, foi bastante eficiente para reduzir o número de doenças causadas por patógenos entéricos bacterianos, principais responsáveis por doenças transmitidas pela água até a década de 80 (SMITH et al., 2006). No entanto, a maioria dos domicílios rurais não possui um sistema de cloração da água, facilitando a infecção da população por bactérias. Estudo realizado no Canadá, isolou *Escherichia coli* O157:H7 das fezes de uma criança com diarreia sanguinolenta, da água do poço da residência e das fezes dos bovinos da fazenda (JACKSON et al., 1998). Em propriedades rurais de produção leiteira, a água de qualidade microbiológica insatisfatória também é importante veiculadora de micro-organismos ao leite, o qual é um excelente meio para o desenvolvimento dos mesmos, transformando-se em um produto de risco para a saúde dos consumidores (AMARAL et al., 2004). Além disso, a água de má qualidade também pode prejudicar a saúde animal e diminuir o valor econômico do produto, uma vez que pode colaborar para a infecção da glândula mamária e aumentar a contagem bacteriana total no leite (LEITE et al., 2003; AMARAL et al., 2004).

Como muitos micro-organismos patogênicos estão presentes de forma intermitente e em pequena quantidade na água, a pesquisa de bactérias que coexistam com estes microrganismos é de extrema importância, atuando como indicadores de

poluição fecal; é o caso dos coliformes termotolerantes, que habitam o intestino de humanos e animais (MALHEIROS et al., 2009). Estudo realizado por Wilkes et al. (2009) demonstrou correlação significativa entre a presença de bactérias indicadoras e a presença de *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Campylobacter*, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais no interior de propriedades agrícolas.

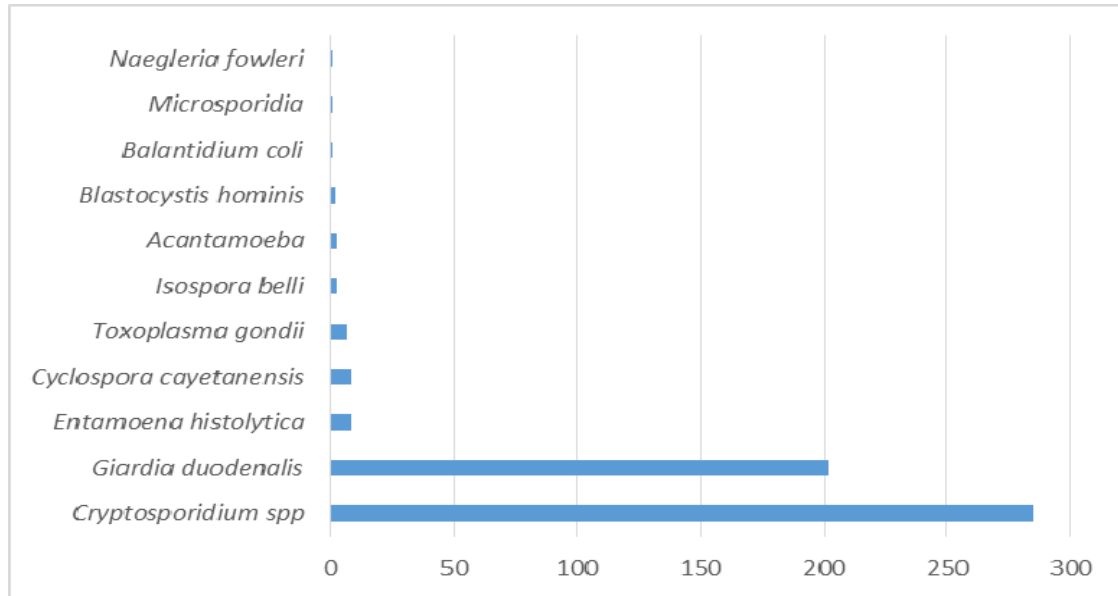
#### 2.2.1.2. Parasitos

As parasitoses transmitidas pela água ocorrem no mundo todo, principalmente pela contaminação de sistemas de tratamento e abastecimento de água à comunidades, já que possui o potencial de atingir um grande número de pessoas (KARANIS; KOURENT; SMITH, 2007). Os parasitos são agentes mais resistentes que bactérias à condições ambientais adversas e, portanto, são mais preocupantes com relação à veiculação hídrica, além de causarem infecção mesmo em baixas doses (GALE E STANFIELD, 2000). Entre os parasitos entéricos, surtos causados por protozoários são mais comuns que por helmintos, devido ao menor tamanho de seus estágios infectantes (SLIFKO; SMITH; ROSE 2000). Nas últimas décadas, houve aumento do número de registros de surtos causados por protozoários de veiculação hídrica como *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp, *Balantidium coli*, *Sarcocystis* spp, *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayettannensis* (KARANIS; KOURENT; SMITH, 2007, BALDURSSON; KARANIS 2011). Como a maioria destes protozoários possui como via de transmissão a rota fecal-oral, a contaminação de solo e rios por fezes de humanos e animais favorece a disseminação dos mesmos por meio da água (LANATA, 2003).

No mundo, foram registrados 524 surtos de protozooses transmitidas pela água entre 1946 e 2010 (KARANIS; KOURENT; SMITH, 2007; BALDURSSON; KARANIS 2011), nos quais *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. foram responsáveis pela maior parte dos casos (Figura 2). Os países desenvolvidos como EUA, Nova Zelândia e Reino Unido, lideram o número de surtos registrados, provavelmente por apresentarem órgãos eficientes de vigilância e notificação de surtos de veiculação hídrica, o que não ocorre em países em desenvolvimento, os quais apresentam os menores números de surtos registrados (BALDURSSON & KARANIS 2011). Além disso, países desenvolvidos apresentam animais domésticos mais frequentemente parasitados por *Cryptosporidium* ou *Giardia*, devido ao manejo mais intensivo dos

animais, e maior contaminação das águas, devido á degradação ambiental (SLIFKO; SMITH; ROSE, 2000).

Figura 2. Número de surtos de protozooses de veiculação hídrica no mundo, 1946-2010.



Fonte: KARANIS; KOURENT; SMITH, 2007; BALDURSSON & KARANIS 2011.

### 2.3. *CRYPTOSPORIDIUM* E *GIARDIA*: PATÓGENOS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA EMERGENTES.

Os protozoários entéricos *Cryptosporidium* e *Giardia* tem emergido no mundo todo como os principais patógenos de veiculação hídrica, sendo frequentemente responsáveis por surtos, principalmente em países desenvolvidos (CARMENA et al., 2006); em países em desenvolvimento, estes parasitas são mais frequentemente associados à doença em imunossuprimidos, principalmente portadores do vírus HIV e crianças (SHIKANI; WEISS, 2014). Entre os vários fatores que contribuem para a transmissão destes protozoários pela água está a resistência de oocistos e cistos ao cloro e outros desinfetantes químicos convencionalmente utilizados nos processos de tratamento da água (HELLER et al., 2004). Além disso, características relacionadas a ciclo biológico do parasito também contribuem para a ampla dispersão de (oo)cistos no ambiente e consequente transmissão pela água, entre elas: completam seu ciclo de vida em um único hospedeiro, o qual elimina milhões de (oo)cistos infectantes no ambiente; apresentam espécies ou genótipos zoonóticos, ampliando a gama de reservatórios que

contaminam o ambiente; possuem estágios infectantes pequenos, capazes de ultrapassar barreiras físicas do sistema de tratamento da água; oocistos de *Cryptosporidium* spp. possuem a capacidade de compressibilidade, sendo sua remoção por filtração inferior à dos cistos de *Giardia* spp.; são resistentes às condições ambientais adversas (HELLER et al., 2004; FRANCO, 2007; KARANIS; KOURENT; SMITH, 2007).

Os mananciais utilizados para o abastecimento de populações urbanas e rurais recebem o efluente de esgoto doméstico tratado e não tratado, o que ameaça a saúde humana e animal (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012). Além do esgoto doméstico, a contaminação de mananciais de abastecimento por fezes de bovinos tem se tornado uma constante preocupação, uma vez que estes animais são reservatórios de espécies e genótipos zoonóticos de *Cryptosporidium* e *Giardia* e são responsáveis por grande contaminação ambiental, pois eliminam aproximadamente  $10^7$  (oo)cistos nas fezes (CROCKETT; HAAS, 1997; O'HANDLEY et al., 2003; MARTINS-VIEIRA et al., 2009).

### 2.3.1. *Cryptosporidium*

#### 2.3.1.1. Ciclo biológico

O ciclo biológico do *Cryptosporidium* é monoxeno, ou seja, se completa em apenas um hospedeiro e envolve tanto a replicação sexual quanto assexual. O oocisto é o estágio ambiental do *Cryptosporidium*, cuja rota de transmissão é a via fecal-oral e a infecção envolve tanto a via de transmissão direta animal-humano, animal-animal e humano-humano, quanto a via de transmissão indireta por meio da ingestão de água ou alimento contaminado por oocistos (XIAO, 2010). Após ingestão do oocistos, a temperatura e o pH estomacais estimulam a excitação e liberação dos esporozoítos, que invadem a célula hospedeira e se replicam no interior de um vacúolo parasitóforo intracelular e extracitoplasmático. A reprodução sexuada caracteriza-se pela geração de merontes tipos I e II após divisão de trofozoítos, cujos merozoítos formados rompem o meronte e invadem outras células hospedeiras; merozoítos de merontes tipo II podem se diferenciar em microgamontes e macrogamontes e iniciar a fase sexuada, na qual cada macrogamonte é fecundado por um microgameta, formando o zigoto. Este se diferencia em quatro esporozoítos no

interior do oocisto, o qual, totalmente esporulado, é liberado no lúmen intestinal e eliminado nas fezes, onde são imediatamente infecciosos para outros hospedeiros (CACCIÒ; PUTIGNANI, 2014).

### 2.3.1.2. Taxonomia e hospedeiros

O gênero *Cryptosporidium* é atualmente classificado no reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Cryptosporidiidae; o filo Apicomplexa é composto por parasitas eucariotos que possuem o complexo apical em algum estágio de seu ciclo de vida. Espécies de *Cryptosporidium* infectam células epiteliais do trato respiratório e das microvilosidades do trato gastrointestinal em grande variedade de hospedeiros vertebrados (RYAN; XIAO, 2014). Estes protozoários são considerados coccídios por possuírem ciclo biológico e morfologia semelhantes a outros protozoários da subclasse Coccidiasina (LEVINE, 1988), porém apresentam características peculiares que os diferem de protozoários desta classe, tais como: localização intracelular, porém extracitoplasmática, na célula hospedeira; ausência de esporocisto, micrópila e grânulos polares; menor tamanho de oocistos; dois tipos morfo-funcionais de oocistos, sendo um auto infectante; presença de organela de alimentação; vias biossintéticas simplificadas; resistência a medicamentos anticoccídios; entre outros (BARTA; THOMPSON, 2006).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares e, devido a necessidade de reavaliar a afinidade de espécies de *Cryptosporidium* no filo Apicomplexa e melhor entender a biologia e a ecologia destes parasitos, vários estudos de filogenia têm demonstrado que espécies de *Cryptosporidium* estão relacionados a primitivos parasitos apicomplexas, os archgregarinas (CARRENO; MARTIN; BARTA, 1999; ROSALES et al., 2005; BARTA; THOMPSON 2006). Parasitos da classe Gregarinasida são grandes parasitos unicelulares apicomplexas que habitam o intestino de invertebrados e vertebrados inferiores (BARTA; THOMPSON, 2006; CARRENO; MARTIN; BARTA, 1999; LEVINE, 1988). Estudos de sequenciamento genômico têm demonstrado afinidade filogenética de gregarinas e *Cryptosporidium*, em que ambos formam um clado separado de coccídios e outros apicomplexas, além da identificação de proteínas e estrutura mitocondrial em *C. muris*, que estão ausentes em *C. parvum* e

*C. hominis*, mas presentes em gregarinas (CARRENO; MARTIN; BARTA, 1999; TEMPLETON et al., 2010; WIDMER E SULLIVAN, 2012). Além disso, archigregarinas e *Cryptosporidium* possuem características semelhantes como, ciclo monoxeno, quatro esporozoítos, localização no trato gastrointestinal do hospedeiro, gamontes e trofozoítos extracelulares (LEANDER; KEELING, 2004).

O oocisto de *Cryptosporidium* corresponde ao menor estágio exógeno dentre os apicomplexas, o que dificulta a diferenciação de características morfológicas por meio de microscópio óptico entre as diferentes espécies, portanto, apenas a morfologia não é suficiente para diferenciá-las (FALL et al., 2003). O desenvolvimento de ferramentas moleculares para caracterização e análise filogenética do gênero *Cryptosporidium* colaborou para entender a classificação taxonômica e, conseqüentemente, a biologia, epidemiologia e importância em saúde pública e animal das diferentes espécies (MORGAN et al., 1999).

Espécies de *Cryptosporidium* são normalmente agrupadas de acordo com a classe de hospedeiros vertebrados: mamíferos, aves, peixes, répteis e anfíbios. Espécies de *Cryptosporidium* descritas em aves, répteis e peixes são específicas destes animais, com exceção de *C. meleagridis* que já foi descrita parasitando humanos (SIVERLAS et al., 2012; RUECKER, 2013). Há, atualmente, 26 espécies de *Cryptosporidium* formalmente descritas e consideradas válidas (Quadro 1), além de 40 genótipos, os quais não possuem *status* taxonômico, apenas um nome temporário e são identificados por diferenças na sequência de DNA (RYAN; FAYER; XIAO, 2014). Muitos dos genótipos descritos podem atingir o grau de espécie com a melhor caracterização biológica e molecular de *Cryptosporidium* (RYAN; XIAO, 2014). O gene 18S de RNA ribossômico (rRNA) e a glicoproteína de 60 kDa (gp60) têm sido utilizados para identificar espécies e genótipos e, conseqüentemente, possíveis fontes de infecção (XIAO, 2010).

Quadro 1. Espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros principais

<b>Espécies</b>	<b>Hospedeiros principais</b>
<i>C. muris</i>	Roedores
<i>C. wrairi</i>	Porcos da Guinéa
<i>C. felis</i>	Gato doméstico
<i>C. serpentis</i>	Cobras e lagartos
<i>C. meleagridis</i>	Aves e humanos
<i>C. parvum</i>	Ruminantes
<i>C. baileyi</i>	Aves
<i>C. varanii</i>	Lagartos
<i>C. andersoni</i>	Bovinos
<i>C. canis</i>	Cães
<i>C. molnari</i>	Peixes
<i>C. hominis</i>	Humanos
<i>C. galli</i>	Aves
<i>C. suis</i>	Suíno
<i>C. bovis</i>	Bovinos
<i>C. fayeri</i>	Marsupiais
<i>C. fragile</i>	Sapos
<i>C. macropodum</i>	Marsupial
<i>C. ryanae</i>	Bovinos
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos e Caprinos
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, roedores e primatas
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos
<i>C. tyzzeri</i>	Roedores
<i>C. viatorum</i>	Humanos
<i>C. scrofarum</i>	Suíno
<i>C. erinacei</i>	Ouriços e Cavalos

Fonte: RYAN; FAYER; XIAO, 2014.

Técnicas moleculares de subtipagem por meio da análise da glicoproteína de 60KDa têm sido amplamente utilizadas para estudar a transmissão de *C. hominis* em humanos e *C. parvum* em humanos e ruminantes. De forma que as famílias de subtipos de *C. hominis* são identificados por Ia, Ib, Ic, Id e as famílias de *C. parvum* são identificadas por IIa, IIb, IIc, IId (RYAN; FAYER; XIAO, 2014). Subtipos IIa e IId de *C. parvum* são identificados em humanos e ruminantes, portanto são zoonóticos. Em regiões onde os dois estão presentes, IIa ocorre com maior frequência em bezerros e IId em cordeiros e cabritos (XIAO, 2010).

### 2.3.1.3. Epidemiologia da criptosporidiose humana

*Cryptosporidium* spp foi descrito pela primeira vez por Ernest Edward Tyzzer em 1907, em glândulas gástricas de ratos de laboratório (CACCIÒ; PUTGNANI, 2014). O primeiro caso de criptosporidiose humana foi relatado na década de 70, porém foi apenas na década de 80 que este protozoário emergiu no mundo todo como causador de graves infecções em pacientes imunocomprometidos, especialmente portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e como gastroenterite autolimitante em pacientes imunocompetentes, especialmente crianças (SHIKANI; WEISS, 2014). No entanto, foi em 1993 que ocorreu o maior surto de criptosporidiose humana, em Milwaukee, Wisconsin (EUA), atraindo o interesse mundial pela doença, principalmente por ela ter sido transmitida pela água, o que demonstrou a habilidade do parasito de resistir aos métodos de tratamento existentes (MACKENZIE et al., 1995).

A criptosporidiose humana se encontra distribuída no mundo todo, porém não há uma estimativa verdadeira sobre o número de infectados anualmente, uma vez que a doença não é de notificação obrigatória na maioria dos países, há baixa procura de assistência médica pelos doentes com diarreia, não são utilizadas técnicas adequadas para pesquisa dos parasitos nas fezes, infecções assintomáticas não são investigadas (DIETZ et al., 2000). A prevalência tende a variar de 2,6 a 31,5% em países em desenvolvimento e de 0,1 a 14,1% em países desenvolvidos, provavelmente devido às melhores condições de saneamento e abastecimento e água potável nestes últimos (FAYER, 2004). Nos países em desenvolvimento, a criptosporidiose é mais frequentemente descrita em crianças, naturalmente suscetíveis ao parasitismo (ORTEGA-PIERRES et al., 2009). Estudos conduzidos com crianças na Ásia e África demonstraram que *Cryptosporidium*, juntamente com *Rotavirus*, *Shiguela* e *Escherichia coli* é responsável por diarreia grave em crianças com até cinco anos de idade e a segunda maior causa de morte por diarreia (KOTLOFF et al., 2013; STRIEPEN, 2013). No Brasil, estudos realizados em áreas urbanas e rurais encontraram prevalência variando entre 0,03% e 12,9%, com as maiores taxas identificadas em crianças que frequentam creches (GONÇALVES et al., 2006; ANARUMA FILHO et al., 2007; BRANCO; LEAL; FRANCO, 2011; LANDER et al., 2012). Porém, em crianças com diarreia a prevalência tende a aumentar, com registro de até 32,4% (NASCIMENTO et al., 2009).

Aproximadamente 20 espécies e genótipos de *Cryptosporidium* foram identificados em humanos (RYAN; FAYER; XIAO, 2014), porém a infecção é causada principalmente por *C. hominis*, espécie que parasita essencialmente os humanos e *C. parvum*, espécie zoonótica de alta prevalência em bovinos jovens (CACCIÒ; PUTIGNANI, 2014). Com o desenvolvimento de métodos de genotipagem, novas espécies e genótipos têm sido identificadas em humanos, porém com prevalência mais baixa que as duas citadas anteriormente, entre elas *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum* e *C. viatorum* (RYAN; FAYER; XIAO, 2014).

A distribuição de *C. hominis* e *C. parvum* em humanos é variada, com predominância do primeiro na maioria dos países, principalmente nos desenvolvidos. *C. parvum* é mais comumente detectado em áreas rurais, provavelmente devido às diferenças nas fontes de infecção (XIAO et al., 2010; RYAN; FAYER; XIAO, 2014). No Brasil, estudos em área urbana identificaram maior frequência de *C. hominis* em humanos infectados, porém não foram realizados estudos com caracterização molecular em amostras obtidas em área rural, não sendo possível avaliar diferenças na distribuição destas espécies neste local (GONÇALVES et al., 2006; BUSHEN et al., 2007; LUCCA et al., 2009; ROLANDO et al., 2012).

#### 2.3.1.4. Epidemiologia da criptosporidiose bovina

A criptosporidiose bovina tem sido relatada no mundo todo desde sua primeira descrição, realizada em um bezerro de oito meses de idade com diarreia crônica, em 1971 (ROBERTSON et al., 2014). Em bovinos, *Cryptosporidium* é responsável por diarreia grave em bezerros neonatos, cuja recuperação pode levar de quatro a seis semanas, gerando prejuízo econômico devido a menor produção animal e aos custos com cuidados especiais (TIRANTI et al., 2011). Além disso, bovinos são fonte de infecção para humanos por serem importantes reservatórios de *C. parvum*, espécie com alto potencial zoonótico (SANTÍN; TROUT; FAYER, 2008; MEIRELLES et al., 2011).

A infecção pode ocorrer em todas as faixas etárias, tanto de bovinos leiteiros quanto de bovinos de corte. A prevalência varia consideravelmente entre diferentes estudos, no entanto ela tende a diminuir com o aumento da idade do animal (SANTÍN et al., 2008; BUDU-AMOAKO et al., 2012). As espécies de *Cryptosporidium* mais frequentemente identificadas em bovinos são *C. parvum*, *C.*

*bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni* (XIAO, 2010). Estudos de prevalência realizados em fazendas leiteiras demonstraram diferenças na prevalência de espécies com relação à idade dos animais. Nestes estudos, *C. parvum* foi mais frequente em bezerros com até dois meses de idade, *C. bovis* e *C. ryanae* em bezerros mais velhos e novilhos, e *C. andersoni* em novilhos e adultos (SANTÍN et al., 2004; FAYER; SANTÍN; TROUT, 2007; SANTÍN; TROUT; FAYER, 2008). Apesar da baixa prevalência de *C. parvum* em novilhos e adultos, alguns estudos identificaram esta espécie nesta faixa etária (FAYER; SANTÍN; TROUT, 2007; BUDU-AMOAKO et al., 2012; WEELS et al., 2015). No Brasil, *C. parvum* também é mais frequente em bezerros com até dois meses de idade (THOMAS et al., 2007; MEIRELLES et al., 2011; COUTO; LIMA; BONFIM, 2014) porém, outros estudos identificaram alta prevalência de *C. andersoni* nesta faixa etária (SEVÁ et al., 2010; PAZ E SILVA; LOPES; ARAÚJO JÚNIOR, 2013; COUTO; LIMA; BONFIM, 2014).

A síndrome diarreica devido à criptosporidiose atinge mais frequentemente os bezerros neonatos, que normalmente se infectam na primeira semana de vida; esta é vista até seis semanas e a mortalidade é baixa quando a diarreia é causada exclusivamente por *Cryptosporidium*, no entanto, em associação com outros enteropatógenos ou dependendo do estado imunológico e nutricional do animal, a mortalidade pode ser alta (ROBERTSON et al., 2014). Nas duas primeiras semanas de vida, um bezerro infectado pode eliminar milhões de oocistos nas fezes, o que resulta em intensa contaminação ambiental e disseminação do parasito na propriedade. Assim, vários fatores relacionados ao manejo colaboram para a ocorrência de infecção e/ou sinais clínicos, como bezerreiros coletivos, alta densidade populacional, não estratificação dos animais por idade, baixas condições de higiene das instalações e proximidade dos bezerreiros com os currais (FEITOSA et al., 2004; ALMEIDA; OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2008; ROBERTSON et al., 2014).

Bovinos tem sido identificados como fatores de risco para a criptosporidiose em humanos (HUNTER et al., 2004; SMITH et al., 2004), sendo maior em propriedades que apresentam diarreia neonatal em bezerros (ROBERTSON et al., 2014). Infecções com subtipo IIA de *C. parvum* ocorrem frequentemente em humanos de área rural nos EUA e na Europa (XIAO; FAYER, 2008). Em países desenvolvidos, a criação intensiva de animais, em propriedades leiteiras, facilita a persistência da transmissão de subtipo IIA de *C. parvum* (XIAO, 2010). No Brasil, poucos estudos realizaram subtipagem de isolados de bovinos, porém, os mesmos

identificaram alta frequência de subtipos zoonóticos (MEIRELLES et al., 2011; COUTO et al., 2014). A identificação de mesmo subtipo de *C. parvum* em humanos e bovinos pode indicar infecção zoonótica, porém quando estes subtipos são identificados em humanos, não necessariamente o bovino é a única fonte de infecção, uma vez que subtipos zoonóticos podem se propagar entre a população humana da mesma formas que os antroponóticos (ROBERTSON et al., 2014)

### 2.3.2. *Giardia*

#### 2.3.2.1. Ciclo biológico

*Giardia* é um protozoário que se multiplica de forma assexuada na superfície das microvilosidades do intestino delgado de hospedeiros vertebrados (THOMPSON, 2004). Seu ciclo biológico possui apenas dois estágios de desenvolvimento: o trofozoíto, responsável pela replicação, e o cisto, estágio infectante que se mantém no ambiente (RYAN; CACCIÓ, 2013). Os cistos são eliminados nas fezes e ingeridos, diretamente, pela via fecal-oral entre humanos e animais ou, indiretamente, por meio da água ou alimento contaminado com fezes. A excitação ocorre no estômago e os trofozoítos realizam a divisão binária no intestino delgado. Cistos são infectantes já no momento em que são liberados nas fezes e sobrevivem no ambiente por semanas a meses, podendo contaminar água e alimento (FENG; XIAO, 2011).

#### 2.3.2.2. Taxonomia e hospedeiros

De acordo com a nova sistemática baseada em dados genéticos, estruturais e bioquímicos, o gênero *Giardia* é classificado no reino Excavata, filo Metamonada, subfilo Trichosoa, superclasse Eopharyngea, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa, ordem Diplomonadida e família Giardiidae (ADL et al., 2012). Há seis espécies classificadas de acordo com morfologia de trofozoítos e/ou de cistos, mas apenas *Giardia duodenalis* foi identificada parasitando humanos e outros mamíferos como animais de produção e de companhia (FENG; XIAO, 2011; RYAN; CACCIÒ, 2013). A espécie *G. duodenalis* é dividida em oito grupos genéticos ou assembleias, classificados de acordo com a diversidade genética; porém, a distância genética que separa as assembleias é bastante grande, havendo a proposta de separá-las em

diferentes espécies (THOMPSON et al., 2008; MONIS; CACCIÒ; THOMPSON, 2009). (Quadro 2).

Quadro 2. Espécies, grupos genéticos de *Giardia duodenalis* e hospedeiros do gênero *Giardia*.

<b>Espécies</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Assembleias</b>	<b>Hospedeiros</b>
<i>Giardia duodenalis</i>	Mamíferos	A	Humanos, outros primatas, animais de produção, cães, gatos, alguns mamíferos selvagens
		B	Humanos, outros primatas, bovinos, equinos, cães, gatos, alguns mamíferos selvagens
		C	Cães e outros canídeos
		D	Cães e outros canídeos
		E	Animais de produção ungulados
		F	Gatos
		G	Ratos
		H	Mamíferos marinhos
<i>Giardia agilis</i>	Anfíbios	-	-
<i>Giardia ardeae</i>	Aves	-	-
<i>Giardia psittaci</i>			
<i>Giardia microti</i>	Roedores	-	-
<i>Giardia muris</i>			

Fonte: FENG; XIAO, 2011; RYAN;CACCIÒ, 2013.

Pequenas alterações genéticas tem sido identificadas em isolados de uma mesma assembleia, sendo denominados de sub-assembleias, e em uma mesma sub-assembleia, denominados de genótipos. Na literatura, há variação na denominação destas assembleias (LALLE et al., 2005; ZHANG et al., 2012), porém Cacciò et al. (2008) propuseram que as sub-assembleias sejam denominados pela letra da assembleia, seguida por numeral romano (AI, AII, etc) e que os genótipos sejam denominados pela identificação da sub-assembleia seguida de numeral arábico (AI-1, AII-2). Considerando esta denominação, as assembleias A e B são divididas em quatro sub-assembleias: AI, AII, AIII e AIV e BI, BII, BIII e BIV (MONIS et al., 2003). Sub-assembleias AI e AII são identificadas em ambos animais e humanos, com AI preferencialmente em animais e AII em humanos; AIII é quase exclusivamente identificada em animais selvagens. Sub assembleias BIII e BIV são mais

frequentes em humanos enquanto BI e BII em animais (SPRONG; CACCIÒ; VAN DER GIESSEN, 2009).

#### 2.3.2.3. Epidemiologia da giardíase humana

*G. duodenalis* é um protozoário de ampla distribuição e um dos mais comuns parasitas intestinais de humanos (FRANCO et al., 2007). Em países desenvolvidos a prevalência da infecção em humanos é geralmente baixa, sendo mais comum em crianças, especialmente em creches (THOMPSON, 2000; 2004). A infecção é mais frequente em países em desenvolvimento, nos quais cerca de 200 milhões de pessoas possuem a forma sintomática, porém a forma assintomática da doença é a mais comum, cujos portadores são importantes fontes de infecção para suscetíveis (YASON; RIVERA, 2007). A maioria dos estudos realizados com crianças assintomáticas em países desenvolvidos revelou prevalência inferior a 10%, enquanto aqueles realizados em países em desenvolvimentos variou de 8 a 30% (FENG; XIAO, 2011).

Por muitos anos após a descoberta da *Giardia* houve controvérsia sobre o papel deste protozoário como causador de doença ou como comensal, mas atualmente não há dúvidas sobre o impacto da doença no ganho de peso e deficiências do crescimento em crianças (THOMPSON, 2008). Os sintomas são bastante variáveis, mas geralmente se caracterizam por esteatorreia, dor abdominal, vômitos e perda de peso (MONIS; THOMPSON, 2003). Crianças menores de cinco anos são mais suscetíveis à infecção devido aos hábitos higiênicos em formação nessa faixa etária, favorecendo a transmissão de pessoa a pessoa, e à ausência de imunidade a reinfecções (PUPULIN et al., 2004).

Humanos são parasitados por assembleias A e B de *G. duodenalis*, com maior prevalência mundial de assembleia B e maior prevalência de infecções mistas em países em desenvolvimento que em países desenvolvidos (RYAN; CACCIÒ, 2013). Sub-assembleia AI possui maior potencial zoonótico, uma vez que é mais frequentemente identificada em humanos, animais de companhia e animais de produção (SPRONG; CACCIÒ; VAN DER GIESSEN, 2009; RYAN; CACCIÒ, 2013).

#### 2.3.2.4. Epidemiologia da giardíase bovina

Estudos realizados em diferentes países tem identificado *G. duodenalis* em fezes de bovinos de corte e leite com prevalências que variam de 5,1 a

100% dos animais (RALSTON; MCALLISTER; MERLE, 2003; SANTÍN; TROUT; FAYER, 2009; OTERO-NEGRETE et al., 2011; TIRANTI et al., 2011; BUDU-AMOAKO et al., 2012; HERNÁNDEZ-GALLO; CORTÊZ-VECINO, 2012; OUCHENE et al., 2014) e no Brasil, de 7,5 a 25,56% (GUIMARÃES; GUEDES; CARVALHO, 2001; MARQUES; BANDEIRA; QUADROS, 2005; SILVA JÚNIOR et al., 2011; PAZ E SILVA; LOPES; ARAÚJO JÚNIOR, 2012). Esta grande variação na prevalência da infecção é reflexo de diversos fatores como a faixa etária da população de estudo, sistema de manejo da propriedade e delineamento do estudo (OLSON et al., 2004; PAZ E SILVA; LOPES ARAÚJO JÚNIOR, 2012). Infecções por *G. duodenalis* têm sido identificadas em alta frequência em bezerros jovens, principalmente entre dois e três meses de idade, quando ocorre estresse e queda da imunidade devido ao processo de desmame (TROUT et al., 2005; MADDOX-HYTELL et al., 2006; SILVA JÚNIOR et al., 2011).

Animais jovens são considerados as principais fontes de infecção para hospedeiros suscetíveis, uma vez que podem liberar até  $10^6$  cistos por grama de fezes (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010). Apesar da excreção de cistos ser mais baixa a partir de seis meses de idade, vacas devem ser consideradas como potencial fonte de infecção em propriedades positivas devido ao aumento da eliminação de cistos no período do parto (GEURDEN et al., 2012). Abrigos e piquetes coletivos, instalações com condições precárias de higiene e limpeza e bezerreiros próximos e em planos mais baixos que o curral têm sido considerados fatores de risco, devido à maior contaminação ambiental presente nestas condições (STURDEE et al., 2003; HAMNES; GJERDE; ROBERTSON, 2006; SILVA JÚNIOR et al., 2011).

Embora os sinais clínicos associados com a infecção por *G. duodenalis* já tenham sido documentados em bovinos, este protozoário não é considerado uma das principais causas de doença clínica em ruminantes. A patogênese da giardíase depende de uma combinação de fatores relacionados ao parasita, hospedeiro e ambiente, de modo que a pressão de infecção é amplamente dependente de sistemas de gestão com alto impacto sobre a saúde e produção animal, como os sistemas intensivos de criação, quando comparados aos extensivos (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2006, 2010). Apesar de alguns estudos associarem a infecção com a diarreia (MCALLISTER et al., 2005; GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010; OUCHENE et al., 2014) sabe-se que a diarreia e a liberação de

cistos em animais parasitados são intermitentes, o que dificulta estabelecer esta associação (GEURDEN et al., 2012).

Cistos identificados em fezes de bovinos são morfologicamente semelhantes àqueles identificados em fezes de outros animais e humanos, mas podem pertencer a populações geneticamente diferentes (PAZ E SILVA; LOPES; ARAÚJO JÚNIOR, 2012). A assembleia E é hospedeiro específico e foi predominante em bovinos em estudos realizados na Alemanha, Reino Unido, Itália, Estados Unidos, Canadá, Austrália e Brasil (SANTÍN; TROUT; FAYER, 2009; ABEYWARDENA et al., 2012; BUDU-AMOAKO et al., 2012; GEURDEN et al., 2012; PAZ E SILVA; LOPES ARAÚJO JÚNIOR, 2012). Apesar disso, a assembleia zoonótica A tem sido cada vez mais identificada nestes animais, seja isoladamente ou em infecções mistas (RYAN; CACCIÒ, 2013). Em um estudo realizado em quatro países da Europa Geurden et al. (2012), identificaram a assembleia A de *G. duodenalis* em 43% das 942 amostras de fezes de bezerros positivas para *G. duodenalis* e, em 32%, infecção mista com A e E.

Bovinos são mais frequentemente parasitados por sub-assembleia AI (especialmente genótipo 1), diferentemente de humanos que são mais frequentemente parasitados por genótipos da sub-assembleia AII (XIAO; FAYER, 2008). Porém, em estudo realizado por KHAN et al. (2011), na Índia, foi identificada sub-assembleia AI-1 em bezerros e trabalhadores da mesma propriedade rural sugerindo transmissão zoonótica. Apesar de não ser comumente identificada em bovinos, a assembleia B foi identificada em estudos realizados na Nova Zelândia, China e México (WINKWORTH et al., 2008; LIU et al., 2012; OTERO-NEGRETTE et al., 2011). Neste contexto, bovinos podem ser importantes fontes de infecção para humanos, uma vez que assembleias zoonóticas de *G. duodenalis* são mais frequentemente identificadas em animais jovens, que também excretam maior quantidade de cistos no ambiente, podendo contaminar fontes de água de abastecimento humano (TROUT et al., 2004; GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010; ABEYWARDENA et al., 2012).

### 2.3.3. *Cryptosporidium* e *Giardia*: veiculação hídrica

O primeiro grande surto de criptosporidiose ocorreu em 1983, no Texas (EUA), no qual a água do poço que abastecia a comunidade foi contaminada com esgoto doméstico e gerou cerca de 2000 casos (SOLO-GABRIELE; NEUMEISTER, 1996). Embora vários surtos associados à ingestão de água potável

tenham sido relatados na década de 1980, foi em 1993 que a criptosporidiose foi reconhecida como um problema de saúde pública (FAYER, 2004). Neste ano ocorreu o maior surto de criptosporidiose de veiculação hídrica do mundo na cidade de Milwaukee, Wisconsin, EUA, no qual 403.000 pessoas desenvolveram sintomas de gastroenterite em um período de dois meses após ingestão de água da rede de abastecimento (CORSO et al., 2003). Após este período cerca de 150 surtos foram registrados até 2010, a maioria deles relacionada com deficiências no sistema de tratamento da água (KARANIS; KOURENT; SMITH, 2007; BALDURSSON; KARANIS, 2011). No Reino Unido, o aumento dos surtos de criptosporidiose levou a modificação na legislação quanto à rotina de avaliação da presença deste protozoário na água, de acordo com o risco dos parâmetros que afetam a presença do mesmo, sendo o mais alto coeficiente de risco dado à presença de gado próximo à bacia, cujo valor dobra se houver bezerros e cordeiros (WELLS et al., 2015). Como os bovinos são importantes reservatórios deste protozoário, a descarga de material fecal de pastos em cursos de água pode gerar maior concentração de oocistos que a descarga de esgoto humano, principalmente em períodos com maior quantidade de chuvas (MARTINS-VIEIRA; BRITO; HELLER, 2009). Em recente estudo realizado por Wells et al. (2015) na Escócia, foi possível comparar a alta prevalência de *C. parvum* em bovinos e cervos que habitam a região de um manancial de abastecimento com histórico de surtos após ingestão de água obtida no mesmo, sugerindo transmissão cíclica e sazonal.

O primeiro surto registrado de giardíase de veiculação hídrica ocorreu entre o final de 1965 e início de 1966 em Aspen (Colorado, EUA), no qual dois poços que abasteciam um lado da cidade foram contaminados por esgoto, atingindo cerca de 120 pessoas. Porém, o maior surto de giardíase devido a ingestão de água ocorreu na Noruega, em 2004, atingindo cerca de 1500 pessoas (ROBERTSON et al., 2006). Entre 1965 e 2010, aproximadamente 40% dos surtos de protozooses de veiculação hídrica registrados no mundo foram causados por *Giardia* spp, entre os quais a maioria ocorreu devido a deficiências no processo de filtração da água. (THOMPSON, 2004; KARANIS; KOURENT; SMITH, 2007; BALDURSSON; KARANIS, 2011). O gado bovino já foi incriminado como fonte de contaminação de água, porém há poucas evidências de que estes animais foram a principal fonte em surtos de veiculação hídrica, sendo a contaminação com efluente sanitário de origem doméstica a fonte mais provável (THOMPSON, 2004; SMITH et al., 2006; THOMPSON, 2008). Pecuária e

precipitação pluviométrica em captações com filtração inadequada favorecem a ocorrência de surtos, principalmente em áreas onde as concentrações ambientais são mais altas (RISEBRO et al., 2007; PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010). Heitman et al. (2002) investigaram, em um período de dois anos, a significância de diferentes fontes na contaminação ambiental e encontrou maior prevalência de cistos de *Giardia* em efluentes de esgoto, porém a concentração de cistos foi bem maior em fezes de bovinos. A interpretação da importância de cada fonte deve ser feita em conjunto com a identificação de genótipos, porém deve-se levar em consideração a importância destes animais na eliminação de grande quantidade de cistos no ambiente e por serem reservatórios também de espécies zoonóticas (THOMPSON 2004; XIAO; FAYER, 2008; FENG; XIAO, 2011).

No Brasil, grandes epidemias de doenças causadas por protozoários de veiculação hídrica foram recentemente descritos. Entre o final de 2001 e início de 2002, ocorreu o maior surto de toxoplasmose do mundo em Santa Isabel do Ivaí, Paraná, no qual 426 pessoas apresentaram sorologia sugestiva de infecção aguda devido a contaminação da água de um reservatório da cidade por oocistos (MOURA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2011). Em Antonina, Paraná, foi descrito um surto de diarreia aguda por *Cyclospora cayetanensis*, cuja origem foi a água distribuída pela estação de tratamento da cidade (MOURA et al., 2002). Apesar de não haver dados documentados que comprovem a ocorrência de surtos de criptosporidiose e giardiose de transmissão hídrica no Brasil (FRANCO, 2007), a presença destes parasitos em água de abastecimento humano foi identificada em estudos realizados em diferentes regiões (FRANCO; ROCHA-EBERHARDT; CANTUSIO NETO, 2001; HELLER et al., 2004; DIAS et al., 2008; NISHI et al., 2009a,b; MACHADO et al., 2009). Em um dos mananciais de abastecimento de água à população de Viçosa, MG, localizada em área de intensa atividade agropecuária, foi verificado que em determinados locais de coleta de água, a presença de cistos de *Giardia* spp. estava mais relacionada com o despejo de efluentes da estação de tratamento de esgoto, porém a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp apresentou maior relação com a criação de animais próxima ao local (DIAS et al., 2008).

Como a giardiase e a criptosporidiose são reconhecidas como zoonoses e a contaminação das águas de abastecimento público e de fontes particulares pode ocorrer pelo efluente de esgoto doméstico e dejetos da agropecuária, é de se

esperar que a contaminação de águas superficiais no meio rural seja maior devido a maior quantidade de resíduos humanos e animais (HELLER et al., 2004).

A carência no tratamento da água que alguns sistemas de abastecimento apresentam no Brasil levou à revisão da Portaria 518/2004 substituída pela Portaria 2.914/2011, que dispõe sobre controle e vigilância da qualidade da água e seu padrão de potabilidade. Esta estabelece a avaliação da presença de protozoários patogênicos, como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. quando a média geométrica anual de *Escherichia coli* encontrada na água bruta superficial for maior ou igual a 1000 *E. coli* /100 mL, além de recomendar que o efluente resultante da filtração rápida esteja com valores de turbidez menores ou iguais a 0,3 uT em 95% das amostras, ou que se utilize um processo de desinfecção com eficiência comprovada na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp, quando a concentração identificada for maior ou igual a 3,0 oocistos/L na captação (BRASIL, 2011).

#### 2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi exposto é evidente que o sistema hídrico é ameaçado pela contaminação por praguicidas e parasitos resultantes da agropecuária, os quais são prejudiciais à saúde humana e animal e foram identificados por diferentes estudos em mananciais de abastecimento público. A legislação de monitoramento destes contaminantes abrange os mananciais de abastecimento público, porém numerosas propriedades rurais não são abastecidas por este sistema, obtendo água de fontes particulares que não recebem nenhum tipo de tratamento e monitoramento. Portanto, há a necessidade de avaliar a presença destes contaminantes no ambiente rural, bem como os fatores que colaboram para a presença dos mesmos, de forma que futuramente medidas de controle e prevenção sejam recomendadas.

#### Referências

ABEYWARDENA, H.; JEX, A. R.; FIRESTONE, S. M.; MCPHEE, S.; DRIESSEN, N.; KOEHLER, A. V.; HAYDON, S. R.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. Assessing calves as carriers of *Cryptosporidium* and *Giardia* with zoonotic potential on dairy and beef farms within a water catchment area by mutation scanning. **Electrophoresis**, v. 34, p. 2259-2267, 2013.

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; LANE, C. E.; LUKES, J.; BASS, D.; BOWER, S. S.; BROWN, M. W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; LE GALL, L.; LYNN, D. H.; MCMANUS, H.; MITCHELL, E. A.; MOZLEY-STANRIDGE, S. E.; PARFREY, L. W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, R. S.; SCHOCH, C. L.; SMIRNOV, A.; SPIEGEL, F. W. The revised classification of eukaryotes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59 (5), p. 429-493, 2012.

ALMEIDA, A. J.; OLIVEIRA, F. C. R.; TEIXEIRA, C. S. Risco relativo da infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* em bezerros bovinos no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 243-241, 2008.

ALMEIDA, M. J.; OLIVEIRA, L. H. H.; FREIRE, L. R.; NAVARRO, I. T. Aspectos sociopolíticos da epidemia de toxoplasmose em Santa Isabel do Ivaí (PR). **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, p. 1363-1373, 2011.

AMARAL, L.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Água de consumo humano como fator de risco em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n. 4, p. 510-514, 2003.

AMARAL, L. A.; ROMANO, A. P. M.; NADER FILHO, A.; ROSSI-JUNIOR, O. D. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n. 4, p. 417-421, 2004.

AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; SOARES E BARROS, L. S.; SILVARES, P. M. Água utilizada em propriedades rurais para o consumo humano e na produção de leite como veículo de bactérias do gênero *Aeromonas*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 103-107, 2006.

ANARUMA FILHO, F.; CORRÊA, C. R. S.; RIBEIRO, M. V. S. A.; CHIEFFI, P. P. Parasitoses intestinais em áreas sob risco de enchente no município de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, 159-169, 2007.

ARIAS, A. L. R.; BUSS, D. F.; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Uso de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

ARAÚJO, J., A.; LIMA, S., J.; MOREIRA, C., J.; JACOB, C. S.; SOARES, O. M.; MONTEIRO, M., C., M.; AMARAL, A. M.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZA, C. A. N.; DAS NEVES, C.; MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115-130, 2007.

AUGUSTO, L. G. S.; CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; FARIA, N. M. X. BÚRIGO, A.C.; FREITAS, V.M.T.; GUIDUCCI FILHO, E. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. ABRASCO: Rio de Janeiro, 2012. 98p.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – na update 2004-2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603-6614, 2011.

BARTA, J. R.; THOMPSON, R. C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 463–468, 2006.

BASTOS, L. H. P.; CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A.W.; JACOB, S. C. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite por agrotóxicos e estudo de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 19, n. 1, p. 51-60, 2011.

BRANCO, N.; LEAL, D. A. G.; FRANCO, R. M. B. A Parasitological Survey of Natural Water Springs and Inhabitants of a Tourist City in Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.5, p.410-417, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 2011. n. 239, Seção 1, página 39.

BRASIL, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa nacional por amostras de domicílio – PNAD, 2012. Rio de Janeiro: Diretoria de Pesquisa e Coordenação de Trabalho e Rendimento, 2012. 132p.

BUDU-AMOAKO, E.; GREENWOOD, S. J.; DIXON, B. R.; BARKEMA, H.W.; MCCLURE, J. T. Giardia and Cryptosporidium on dairy farms and the role these farms may play in contaminating water sources in Prince Edward Island, Canada. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p. 668–673, 2012.

BUSHEN, O. Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R. C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; FAYER, R.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: Comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 378–384, 2007.

CACCIO, S.M.; BECK, R.; LALLE, M.; MARINCULIC, A.; POZIO, E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v. 38, 1523–1531, 2008.

CACCIÒ, S. M.; PUTIGNANI, L. Epidemiology of human cryptosporidiosis. In: CACCIÒ, S. M., WIDMER, G. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Nova York: Springer, 2014. 563p.

CANEPARI, P.; Pruzzo, C. Human pathogens in water: insights into their biology and detection. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 19, p. 241-243, 2008.

CARMENA, D.; AGUINAGALDE, C.; ZIGORRAGA, C.; FERNANDEZ-CRESPO, J. C.; OCIO, J. A. Presence of *Giardias* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 619-629, 2006.

- CARRENO, R. A.; MARTIN, D. S.; BARTA, J. R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v. 85, p. 899-904, 1999.
- CLASEN, T. F.; ROBERTS, I. G.; RABIE, T.; SCHMIDT, W.P.; CAIRNCROSS, S. **Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea (Review)**, Wiley. 2009. 115p.
- COLOSIO, C.; TIRMANI, M.; BRAMBILLA, G.; COLOMBI, A.; MORETTO, A. Neurobehavioural effects of pesticides with special focus on organophosphorus compounds: which is the real size of the problem? **NeuroToxicology**, v. 30, p. 1155-1161, 2009.
- CORSO, P. S.; KRAMER, M. H.; BLAIR, K. A.; ADDISS, D. G.; DAVIS, J.P.; HADDIX, A. C. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, p. 426-431, 2003.
- COUTO, M. C. M.; LIMA, M. F.; BOMFIM, T. C. B. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. **Acta Tropica**, v. 130, p. 117-122, 2014.
- CROCKETT, C.S.; HAAS, C.N. Understanding protozoa in your watershed. **Journal American Water Works Association**. v.89, p.62-73, 1997.
- DIAS, G. M. F.; BEVILACQUA, P. D.; BASTOS, R. K. X.; OLIVEIRA, A. A.; CAMPOS, G. M. M. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1291-1300, 2008.
- DIETZ, V.; VUGIA, D.; NELSON, R.; WICKLUND, J.; NADLE, J.; MCCOMBS, K. G.; REDDY, S. Active, multisite, laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium parvum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, p. 368-372, 2000.
- FALL, A.; THOMPSON, R. C.; HOBBS, R. P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**, v. 89, p 399–402, 2003.
- FAYER, R.; GASBARRE, L.; PASQUALI, P.; CANALS, A.; ALMERIA, S.; ZARLENGA, D. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical parasitic and immunologic patterns. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 49–56, 1998.
- FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 37-56, 2004.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 260–266, 2007.
- FEITOSA, F. L. F.; SHIMAMURA, G. M.; ROBERTO, T.; MEIRELE, M. V.; NUNES, C. M.; CIARLINI, P. C.; BORGES, A. S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 189-193, 2004.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 110–140, 2011.

FEWTRELL, L.; KAUFMANN, R.B.; KAY, D.; ENANORIA, W.; HALLER, L.; COLFORD JUNIOR, J.M. Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhea in less developed countries: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Disease**, v. 5, n. 1, p. 42-52, 2005.

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO JÚNIOR, R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 9, n. 4, p. 36-43, 2007.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in raw water from Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v.43, p.109-111, 2001.

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. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n. 2, p.119-135, 2012.

GALE, P.; STANFIELD, G. *Cryptosporidium* during a simulated outbreak. **Journal American Water Works Association**, v. 92, p. 105-116, 2000.

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural *Giardia* infection in calves. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 367–371, 2006.

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 98-106, 2010.

GEURDEN, T.; VANDERSTICHEL, R.; POHLE, H.; EHSAN, A.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; MORGAN, E.R.; CAMUSET, P.; CAPELLI, G.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E.; A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. **Veterinary Parasitology**, v.190, p. 383–390, 2012.

GOMATHY, N.; SUMATRAN, V. N.; SHABNA, A.; SULOCHANA, K. N. Tolerance of ARPE 19 cells to organophosphorus pesticide chlorpyrifos is limited to concentration and time of exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 117, p. 24-30, 2015.

GONÇALVES, E. M. N.; SILVA, A. J.; EDUARDO, M. B. P.; UEMURA, I. H.; MOURA, I. N. S.; CASTILHO, V. L. P.; CORBETT, C. E. P. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, n. 2, p. 119-126, 2006.

GRABOW, W.O.K. Waterborne diseases: Update on water quality assessment and control. **Water AS**, v. 22, n. 2, p. 193–202, 1996.

GRIZA, F. T.; ORTIZ, K. S.; GEREMIAS, D. Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de Rondinha – Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.31, n. 7, p. 1631-1635, 2008.

GUIMARÃES, A. M.; GUEDES, E.; CARVALHO, R. A. Ocorrência de *Giardia* spp, em bovinos leiteiros no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 652-653, 2001.

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

HEITMAN, T. L.; FREDERICK, L. M.; VISTE, J. R.; GUSELLE, N. J.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M. E. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 530–541, 2002.

HELLER, L.; BASTOS, R. K. X.; VIEIRA, M. B. C. M.; BEVILACQUA, P. D.; DE BRITO, L. L. A.; MOTA, S. M. M.; OLIVEIRA, A. A.; MACHADO, P. M.; SALVADRO, D. P.; CARDOSO, A. B.. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia & Serviços de Saúde**, v. 13, p. 79-92, 2004.

HERNANDEZ, C. M.; BECK, W. D.; NAUGHTON, S. X.; PODDAR, I.; ADAM, B. L.; YANASAK, N.; MIDDLETON, C.; TERRY JUNIOR, A. V. Repeated exposure to chlorpyrifos leads to prolonged impairments of axonal transport in the living rodent brain. **NeuroToxicology**, v. 47, p. 17-26, 2015.

HERNÁNDEZ-GALLO, N.; CORTÉZ-VECINO, J. A. Prevalencia y factores de riesgo de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. em terneiros de ganado lechero de la zona noroccidental de la Sabana de Bogotá. **Revista de Salud Pública**, v. 14, n. 1, p. 169-181, 2012.

HUNTER, P. R.; HUGHES, S.; WOODHOUSE, S.; SYED, Q.; VERLANDER, N. Q.; CHALMERS, R. M.; MORGAN, K.; NICHOLS, G.; BEECHING, N.; OSBORN, K. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1241–1249, 2004.

JACKSON, S. G.; GOODBRAND, R. B.; JOHNSON, R. P.; ODORICO, V. G.; ALVES, D.; RAHN, K.; WILSON, J. B.; WELCH, M. K.; KHAKIRIA, R. Escherichia coli 0157:H7; diarrhea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. **Epidemiology and Infection**, v. 120, p.17-20, 1998.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 2009.

JOVENTINO, E. S.; SILVA, S. F.; ROGERIO, R. F.; FREITAS, G. L.; XIMENES, L. B.; MOURA, E. R. F. Comportamento da diarreia infantil antes e após consumo de água pluvial em município do semiárido brasileiro. **Texto e Contexto – Enfermagem**, v. 19, n. 4, p. 691-699, 2010.

KARANIS, P.; KOURENT, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, n.1, p. 1-38, 2007.

KHAN, S. M.; DEBNATH, C.; PRAMANIK, A. K.; XIAO, L.; NOZAKI, T.; GANGULY, S. Molecular evidence for zoonotic transmission in West Bengal, Índia. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3-4, p. 342-345, 2011.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S. et al. Burden and a etiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, 209–222, 2013.

LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIO, S.M. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic sub-genotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 207–213, 2005.

LANATA, C. F. Studies of food hygiene and diarrhoeal disease. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 13, p. 175-183, 2003.

LANDER, R. L.; LANDERI, A. G.; HOUGHTONI, L.; WILLIAMSII, S. M.; COSTA-RIBEIRO, H.; BARRETO, D. L.; MATTOS, A. P.; GIBSONI, R. S. Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast Region of Brazil, **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 11, 2012.

LEANDER, B.S.; KEELING, P.J. Early evolutionary history of dinoflagellates and apicomplexans (Alveolata) as inferred from HSP90 and actin phylogenies. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 341–350, 2004.

LEITE, M. O.; ANDRADE, N. J.; SOUZA, M. R.; FONSECA, L. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; PENNA, C. F. A. M. Controle de qualidade da água em indústrias de alimentos. **Leite & Derivados**, v.69, p.38-45, 2003.

LEVINE, N.D. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 35, p. 518–520, 1988.

LIU, A.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; WANG, R.; LI, X.; SHU, J.; ZHANG, X.; SHEN, Y.; ZHANG, W.; LING, H. Occurrence of bovine giardiasis and endemic genetic characterization of *Giardia duodenalis* isolates in Heilongjiang Province, in the Northeast of China. **Parasitology Research**, v. 111, p. 655–661, 2012.

LUCCA, P.; DE GASPARI, E. N.; BOZZOLI, L. M.; FUNADA, M. R.; SILVA, S. O. S.; WILMA, I.; SOARES, R. M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp from HIV

infected patients from an urban area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 341-343, 2009.

MACHADO, E. C. L.; STAMFORD, T. L.M.; MACHADO, E. H. L.; SOARES, D. S.; ALBUQUERQUE, M. N. L. Ocorrência de *Cryptosporidium* em águas superficiais na região metropolitana de Recife, PE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1459-1462, 2009.

MACKENZIE, W. R.; SCHELL, W. L.; BLAIR, K. A.; ADDISS, D. G.; PETERSON, D. E.; HOXIE, N. J.; KAZMIERCZAK, J. J.; DAVIS, J. P. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clinical Infectious Disease*, v. 21, n.1, p.57–62, 1995.

MADDOX-HYTTEL, C.; LANGKJAER, R. B.; ENEMARK, H. L.; HAKAN, V. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-Occurrence and management associated risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 141:48-59, 2006.

MALHEIROS, P. S.; SCHÄFER, D. S.; HERBERT, I. M.; CAPUANI, S. M.; SILVA, E.M.; SARDIGLIA, C. U.; SCAPIN, D.; ROSSI, E .M.; BRANDELLI, A. Contaminação bacteriológica de águas subterrâneas da região oeste de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, n.2, p. 305-308, 2009.

MARQUES, S. M. T.; BANDEIRA, C.; QUADROS, R. M. Prevalência de enteroparasitoses em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 60, p. 78-81, 2005.

MARTINS-VIEIRA, M. B. C.; BRITO, L. A. L.; HELLER, L. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerro infectado experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1454-1458, 2009.

MCALLISTER, T. A.; OLSON, M. E.; FLETCH, A.; WETZSTEIN, M.; ENTZ, T. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 46, p. 47-55, 2005.

MEIRELES, M. V.; DE OLIVEIRA, F. P.; TEIXEIRA, W. F.; COELHO, W. M.; MENDES, L. C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 949-951, 2011.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 229-234, 2009.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G.; EY, P.L.; Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infections, Genetic and Evolution**, v. 3, p. 29–38, 2003.

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

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

- MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.
- MORGAN, U. M.; BUDDLE, J. R.; ELLIOTT, A.; THOMPSON, R. C. Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, p. 44-47, 1999.
- MOURA, E. J.; PENAFORTE, C.; KERTI, R.; DAUFENBACH, L. C.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R., et al. Surto de doença diarreica aguda por *Cyclospora cayetanensis* Antonina - Parana. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. 2, n.3, p.3-5, 2002.
- MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; WADA, M. Y.; LONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W.M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRACA, R. M. T.; SILVA, A. J.; MOURA, L.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborn toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p. 2, p.326-329, 2006.
- NASCIMENTO, W. R.; CAVALCANTI, I. M.; IRMÃO, J. I.; ROCHA, F. L. Presence of *Cryptosporidium* spp in children with acute diarrhea in a public daycare center in Recife, State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 175-178, 2009.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; FRANCO, B, D, G, M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n. 1, p. 201-204, 2007.
- NETO, M. L. F.; FERREIRA, A. P. Perspectivas da sustentabilidade ambiental diante da contaminação química da água: desafios normativos. **Revista de Gestão Integrada entre Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 2, n. 4, 2007.
- NISHI, L.; BAESSO, M. L.; SANTANA, R. G.; FREGADOLLI, P.; FALAVIGNA, D. L.M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in A Public Water-Treatment System. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, p. 221-228, 2009a.
- NISHI, L.; BERGAMASCO, R.; TOLEDO, M. J. O.; FALAVIGNA, D. L. M.; GOME, M. L.; MOTA, L. T.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in the Ivaí Indigenous Land, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.9, n. 5, p. 543-547, 2009b.
- O'HANDLEY, R. M.; CERI, H.; ANETTE, C.; OLSON, M.E. Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 89-98, 2003.
- OLSON, M.E.; O'HANDLEY, R.M.; RALSTON, B.J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R.C. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, n.4, p. 185-381, 2004.
- ONGLEY, E. D. Control of water pollution from agriculture. **FAO Irrigation and Drainage**, v.55, p. 1-101,1996.

ORTEGA-PIERRES, G.; SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M., THOMPSON, R. C. A. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 410–416, 2009.

OTERO-NEGRETE, J. J.; IBARRA-VELARDE, F.; MARTINEZ-GORDILLO, M. N.; PONCE-MACOTELA, M. Prevalencia de *Giardia intestinalis* y predominio de genotipos zoonóticos em ovinos e bovinos de traspatio de cinco estados de la República Mexicana. **Veterinária México**, v. 42, n. 3, p. 219-226, 2011.

OUCHENE, N.; OUCHENE-KHELIFI, N. A.; ZEROUAL, F.; BENAKHLA, A.; ADJOU, K. Study of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. infections in dairy cattle in Algeria. **Journal of Parasitology and Vector Biology**, v. 6, n. 4, p. 61-65, 2014.

PAZ E SILVA, F. M.; LOPES, R. S.; ARAUJO JÚNIOR, J. P.; Genetic characterisation of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 59, n. 1, p. 15-20, 2012.

PAZ E SILVA, F. M.; LOPES, R. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. P. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 22-28, 2013.

PEDLOWSKI, M. A.; CANELA, M. C.; TERRA, M. A. C.; DE FARIA, R. M. R.; Modes of pesticides utilization by brazilian smallholders na their implications for human health and environment. **Crop Protection**, v. 31, p. 113-118, 2012.

PEREZ, F. MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um polo agrícola do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 5612-5621, 2007.

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

PUPULIN, A. R. T.; GOMES, M. L.; DIAS, M. L. G. G.; ARAÚJO, S. M.; GUILHERME, A. L. F.; KUHL, J. B. Giardíase em creches do município de Maringá, PR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, p. 147-149, 2004.

QUEIRÓZ, J. T. M.; HELLER, L.; SILVA, S. R. Análise da correlação de ocorrência da doença diarreica aguda com a qualidade da água para consumo humano no município de Vitória – ES. **Saúde e Sociedade**, v. 18, n. 3, p. 479-489, 2009.

RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; MERLE, E. Olson prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. **Veterinary Parasitology**, v.114, p. 113-122, 2003.

REBOUÇAS, A. C. Água doce no mundo e no Brasil. In: Tundisi, J. G.; REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. **Águas Doces no Brasil - Capital Ecológico, Uso e Conservação**. São Paulo: Escrituras. 2006. 704p.

- RISEBRO, H.L.; DORIA, M.F.; ANDERSSON, Y.; MEDEMA, G.; OSBORN, K.; SCHLOSSER, O.; HUNTER, P.R. Fault tree analysis of the causes of waterborne outbreaks. **Journal of Water and Health**, v. 5, p. 1–18, 2007.
- ROBERTSON, L. J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B. K.; STRAND, E.; ALVSVAG, J. O.; LANGELAND, N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 72, 2212-2217, 2006.
- ROBERTSON, L. J.; BJÖRKMAN, C.; AXÉN, C.; FAYER, R. Cryptosporidiosis in Farmed Animals. In: CACCIÒ, S. M., WIDMER, G. **Cryptosporidium: parasite and disease**. Nova York: Springer, 2014. 563p.
- ROCHA, C. M. B. M.; RODRIGUES, L. S.; COSTA, C. C.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, I. J.; JESUS, E. F. M.; ROLIN, R. G. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de saúde Pública**, v. 22, n. 9, p. 1967-1978, 2006.
- ROLANDO, R. F. R.; DA SILVA, S.; SARAMAGO, S. H.; PERALTA, R. H.; DA SILVA, A. J.; CUNHA, F. S.; BELLO A. R.; PERALTA, J. M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 476-479, 2012.
- ROSALES, M. J.; CORDON, G. P.; MORENO, M. S.; SANCHEZ, C. M.; MASCARO, C. Extracellular like gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. **Acta Tropica**, v. 95, p. 74–78, 2005.
- ROSS, S. M.; MCMANUS, I. C.; HARRISON, V.; MASON, O. Neurobehavioral problems following lowlevel exposure to organophosphate pesticides: a systematic and meta-analytic review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 21–44, 2013.
- RUECKER, N. J.; MATSUNE, J. C.; LAPEN, D. R.; TOPP, E.; EDGE, T. A.; NEUMANN, N. F. The detection of *Cryptosporidium* and the resolution of mixtures of species and genotypes from water. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 15, p. 3-9, 2013.
- RYAN, U.; CACCIÒ, S. M.; Zoonotic Potential of *Giardia*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 943-956, 2013.
- RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, 2014.
- RYAN, U.; XIAO, L. Taxonomy and molecular taxonomy. In: CACCIÒ, S. M., WIDMER, G. **Cryptosporidium: parasite and disease**. Nova York: Springer, 2014. 563p.
- SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 103–117, 2004.
- SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of criptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 15-23, 2008.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 40-45, 2009.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M.R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 249-253, 2010.

SHIKANI, H.; WEISS, L. M. Human Cryptosporidiosis: A Clinical Perspective. In: CACCIÒ, S. M., WIDMER, G. *Cryptosporidium*: parasite and disease. Nova York: Springer, 2014. 563p.

SILVA, C. V.; HELLER, L.; CARNEIRO, M. Cisternas para armazenamento de água de chuva e efeito na diarreia infantil: um estudo na área rural do semiárido de Minas Gerais. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 17, n. 4, p. 393-400, 2012.

SILVA-JÚNIOR, F. A.; CARVALHO, A, H. O.; ROCHA, C. M. B. M.; GUIMARÃES, A. M. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros nas fases de cria e recria na mesorregião de Campo das Vertentes de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n. 8, p. 690- 696. 2011.

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

SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1379 – 1393, 2000.

SMITH, A. G.; GANGOLLI, S. D. Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 767-779, 2002.

SMITH, K. E.; STENZEL, S. A.; BENDER, J. B.; WAGSTROM, E.; SODERLUND, D.; LEANO, F. T.; TAYLOR, C. M.; BELLE-ISLE, P. A.; DANILA, R. Outbreaks of enteric infections caused by multiple pathogens associated with calves at a farm day camp. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 23, p. 1064–1104, 2004.

SMITH, A.; REACHER, M.; SMERDON, W.; ADAK, G. K.; NICHOLS, G.; CHALMERS, R. M. Outbreaks of water borne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiology & Infection**, v. 134, p. 1141-1149, 2006.

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **Resultados do setor 2013**. Disponível em: < <http://www.sindiveg.org.br/imp-releases.php>>, acesso em 08 jan. 2015.

SOLO-GABRIELE, H.; NEUMEISTER, S. US outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal American Water Works Association**, v. 88, p. 76-86, 1996.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente: Documentos**, v. 42, 2004, 29p.

SPADOTTO, C. A. Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras. **Embrapa Meio Ambiente: Documentos**, v. 58, 2006, 21p.

SPRONG, H.; CACCIÒ, S. M.; VAN DER GIESSEN, J. W. B. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, e558, 2009.

STOPELLI, M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, [S.l.], v.10, p. 91-100, abr. 2005.

STRIEPEN, B. Time to tackle cryptosporidiosis. **Nature**, v. 503, p. 189–191, 2013.

STUKEL, T. A.; GREENBERG, E. R.; DAIN, B. J.; REED, F. C.; JACOBS, N. J. A. Longitudinal study of rainfall and coliform contamination in small community drinking Water supplies. **Environmental Science & Technology**, v.24, p.571-575, 1990.

STURDEE, A. P.; BODLEY-TICKELL, A. T.; ARCHER, A.; CHALMERS, R. M. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 97-113, 2003.

TEMPLETON, T. J.; ENOMOTO, S.; CHEN, W. J.; HUANG, C. G.; LANCTO, C. A.; ABRAHAMSEN, M. S.; ZHU G. A. A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 235–248, 2010.

THOMAZ, A.; MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 4, p. 291-296, 2007.

THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p.1259–1267, 2000.

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

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis: Modern Concepts in Control and Management. **Annales Nestlé**, v. 66, p. 23-29, 2008.

THOMPSON, J.; YANG, R.; POWER, M.; HUFSCHMID, J.; BEVERIDGE, I.; REID, S.; NG, J.; ARMSON, A.; RYAN, U. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in marsupials in Australia. **Experimental Parasitology**, v. 120, p. 88–93, 2008.

TROUT, J. M.; SANTÍN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.179–186, 2004.

TROUT, J. M.; SANTÍN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.177–183, 2005.

TIRANTI, K.; LARRIESTRA, A.; VISSIO, C.; PICCO, N.; ALUSTIZA, F.; DEGIOANNI, A.; VIVAS, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 140-147, 2011.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v, 64, n. 2, p. 135-142, 2009.

UNESCO - United Nation Educational, Scientific and Cultural Organization. **Water for people, Water for life**. The United Nations World Water Development Report. 2003. Disponível em:<<http://unesdoc.unesco.org/images/0012/001295/129556e.pdf>> Acesso em 27 jan. 2015.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

VITAL, M. A. B. F. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 59-70.

WELLS, B.; SHAW, H.; HOTCHKISS, E.; GILRAY, J.; AYTON, R.; GREEN, J.; KATZER, K.; WELLS, A.; INNES, E. Prevalence, species identification and genotyping *Cryptosporidium* from livestock and deer in a catchment in the Cairngorms with a history of a contaminated public water supply. **Parasites and Vectors**, v. 8, p.1-13, 2015.

WIDMER, G.; SULLIVAN, S. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. **Parasite Immunology**, v. 34, p. 61–71, 2012.

WILKES, G.; EDGE, T.; GANNON, V.; JOKINEN, C.; LYAUTEY, E.; MEDEIROS, D.; NEUMANN, N.; RUECKER, N.; TOPP, E.; LAPEN, D.R. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. **Water Research**, v. 43, p. 2209-2223, 2009.

WINKWORTH, C. L.; LEARMONTH, J. J.; MATTHAEI, C. D.; TOWNSEND, C. R. Molecular characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a region in which dairy farming has recently intensified. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, p. 5100-5105, 2008.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Diarrhea: Why children are still dying and what can be done*. Geneva: WHO. 2009. 58p.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Investing in water and sanitation: increasing access, reducing inequalities*. Geneva: WHO/GLASS. 2014. 15p.

YASON, J. A. D. L.; RIVERA, W. L. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. **Parasitology Research**, v. 101, p. 681–687, 2007.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 80–89, 2010.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1239-1255, 2008.

ZHANG, W.; ZHANG, X.; WANG, R.; LIU, A.; SHEN, Y.; LING, H.; CAO, J.; YANG, F.; ZHANG, X.; ZHANG, L. Genetic characterizations of *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Heilongjiang Province, China and possibility of zoonotic transmission. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. e1826, 2012.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a prevalência e identificar *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em fezes de humanos, animais e na água de consumo humano e animal de propriedades leiteiras, pesquisar a presença de resíduos de organofosforados e carbamatos em amostras de água e leite cru destas propriedades e associar a fatores de exposição.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar e quantificar coliformes totais e termotolerantes em amostras de água de consumo humano e animal.

Verificar a prevalência e quantificar *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em fezes de bovinos, suínos e humanos e em água de consumo humano e animal.

Identificar as espécies de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. por meio de análises moleculares.

Determinar os fatores associados à presença de coliformes termotolerantes em amostras de água e à presença de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp em amostras de fezes e de água.

Verificar a presença de resíduos de organofosforados e carbamatos em amostras de leite cru e água e determinar os fatores associados.

#### 4 ARTIGO A

### ***Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM AMOSTRAS DE FEZES E ÁGUA E FATORES DE EXPOSIÇÃO ASSOCIADOS EM PROPRIEDADES DE BOVINOCULTURA LEITEIRA.**

#### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp em amostras de fezes de animais e na água de consumo de propriedades de bovinocultura leiteira, além de relacionar fatores de exposição à presença destes parasitos. Amostras de fezes de bovinos, suínos, e humanos e de água foram coletadas em 55 propriedades de Araruna e Campo Mourão, PR. Pesquisa de (oo)cistos nas fezes foi realizada por meio da coloração de Ziehl Neelsen modificado e centrifugo-flutuação em sulfato de zinco. Amostras positivas nestas técnicas foram submetidas à *nested*-PCR para amplificação do gene SSU rRNA. Análise microbiológica da água foi realizada por técnica de tubos múltiplos e substrato cromogênico e análise parasitológica de 31 amostras por imunofluorescência direta e *nested*-PCR. A identificação das espécies de *Cryptosporidium* foi realizada por sequenciamento e, no caso de infecções mistas, por PCR-RFLP. Variáveis de exposição foram obtidas por meio de questionário epidemiológico. A prevalência de infecção por *Giardia* spp em bovinos foi 7,6% e em bezerros até dois meses 17,1%, já por *Cryptosporidium* spp. foi 10,2% em bovinos e 25,3% em bezerros até dois meses. Entre as amostras de fezes de bovino *C. parvum* foi identificado em 41 (64%), *C. ryanae* em 8 (12,5%), *C. bovis* em 4 (6,3%), *C. andersoni* em 5 (7,8) e infecção mista em 20 (31,3%). Apenas um *pool* de suíno foi positivo para *Giardia* spp. e cinco foram positivos para *Cryptosporidium* spp. Estes parasitos não foram identificados nas amostras de fezes humanas. Coliformes termotolerantes foram identificados em amostras de água de 25 (45,5%) propriedades. *Giardia* e *Cryptosporidium* foram identificados em três amostras de água, as quais também possuíam coliformes termotolerantes. *C. parvum* foi identificado em uma das amostras, cuja propriedade possuía bezerros positivos para a mesma espécie. A presença de coliformes foi associada à origem da água, estrutura e degradação de nascentes, chuva e turbidez. Como conclusão, bezerros apresentaram maior prevalência dos protozoários que bovinos mais velhos e *C. parvum* foi identificado em bezerros e adultos, com maior prevalência em bezerros com até seis meses de idade. *C. parvum* e *Giardia duodenalis* estão presentes na água de propriedades leiteiras e a maioria das fontes de água não possui proteção adequada, principalmente nascentes, com alta frequência de coliformes de origem fecal, havendo necessidade de orientação sobre manejo dos animais, preservação de fontes e tratamento da água.

**Palavras-chave:** *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, coliformes termotolerantes, nascentes, prevalência, bezerros.

***Cryptosporidium* spp. AND *Giardia* spp. IN FAECES AND WATER AND  
ASSOCIATED EXPOSURE FACTORS IN DAIRY FARMS.**

**ABSTRACT**

This study aimed to determine the prevalence and identify *Cryptosporidium* spp and *Giardia* spp in fecal samples and water, and to associate the exposure factors in dairy farms. Samples of cattle feces, swine, human and water were collected in 55 dairy farms Araruna and Campo Mourao, PR, Brazil. Presence of *Cryptosporidium* and *Giardia* were determined by Ziehl Neelsen modified and zinc sulfate centrifugal flotation methods. Positive samples were submitted to nested-PCR for amplification of the SSU rRNA gene. Microbiological analysis was performed on water samples from all properties. Parasitological analysis was performed in 31 farms by immunofluorescence assay and nested-PCR. *Cryptosporidium* species were determined by DNA sequencing analyses or restriction fragment length polymorphism, in the case of mixed infections. Exposure variables were obtained using an epidemiological questionnaire. The prevalence of infection with *Giardia* spp was 7.6% in cattle and 17.1% in calves up to two months; for *Cryptosporidium* spp. was 10.2% in cattle and 25.3% in calves up to two months. In fecal samples of cattles *C. parvum* was identified in 41 (64%), *C. ryanae* 8 (12.5%), *C. bovis* 4 (6.3%), *C. andersoni* 5 (7, 8%) and mixed infection in 20 (31.3%). Only one swine pool was positive for *Giardia* spp. and five were positive for *Cryptosporidium* spp. These protozoans have not been identified in samples of human faeces. Fecal coliforms were identified in water samples of 25 (45.5%) farms. *Giardia* and *Cryptosporidium* were identified in three water samples, which also had fecal coliform. *C. parvum* was identified in a water sample from a farm with positive calf. The presence of fecal coliform was associated with the origin of water, structure and degradation of springs, rain and turbidity. In conclusion, calves had a higher prevalence of protozoa that older cattle and *C. parvum* was identified in all ages; *C. parvum* and *G. duodenalis* are present in the water of dairy farms and most water sources are unprotected, mainly springs, with high frequency of fecal coliforms. There is need for assistance to farmers as to animal management, preservation of natural water sources and water treatment.

**Keywords:** *C. parvum*, fecal coliforms, springs, prevalence, calves, riparian forest

### **Introdução**

A água é um dos mais importantes veículos de patógenos responsáveis por diarreia no mundo todo (WHO, 2009). Apesar do reconhecimento de que a melhor qualidade da água fornecida para consumo humano diminui a ocorrência de doenças, no Brasil, o abastecimento de água em pequenos municípios e áreas rurais difere do encontrado em grandes centros urbanos (SILVA et al, 2012). No meio rural, cerca de 70% dos domicílios consomem água de fontes alternativas, sem monitoramento de potabilidade, enquanto apenas um terço é abastecido por rede de distribuição pública (BRASIL, 2012).

Bactérias e protozoários são comumente os principais responsáveis por surtos de veiculação hídrica, porém *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. têm se destacado nas últimas décadas como os principais patógenos (FRANCO, 2007; KARANIS et al., 2007, BALDURSSON; KARANIS, 2011). São protozoários cujo ciclo biológico se completa em apenas um hospedeiro e culmina na produção de cistos e oocistos, estádios ambientais eliminados nas fezes (FAYER, 2004). Estes protozoários parasitam o trato gastrointestinal de humanos, animais domésticos e silvestres (THOMPSON, 2004; THOMPSON; MONIS, 2004)

Bovinos são importantes fontes de infecção para humanos, principalmente bezerros lactentes, os quais são os principais reservatórios de *C. parvum*, espécie de alto potencial zoonótico (FAYER, 2004; THOMPSON, 2004; XIAO, 2010). Apesar de bovinos serem mais comumente parasitados pela assembleia E de *G. duodenalis*, também já foram identificadas as assembleias zoonóticas A e, ocasionalmente, B nestes animais (O'HANDLEY et al., 2000, TROUT et al., 2004; COKLIN et al., 2007). Bezerros possuem importante papel na contaminação ambiental, pois são mais intensamente parasitados e eliminam grandes quantidades de (oo)cistos no ambiente, podendo contaminar fontes de água utilizadas para consumo humano e animal (FRANCO, 2007; GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010).

Diante da necessidade de melhor compreensão da importância de bovinos na contaminação de fontes de água por estes protozoários patogênicos, este estudo teve o objetivo de verificar a prevalência e identificar *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de fezes de animais e na água de consumo humano e animal em propriedades de bovinocultura leiteira, além de associar fatores de exposição à presença destes parasitos.

## **Material e Métodos**

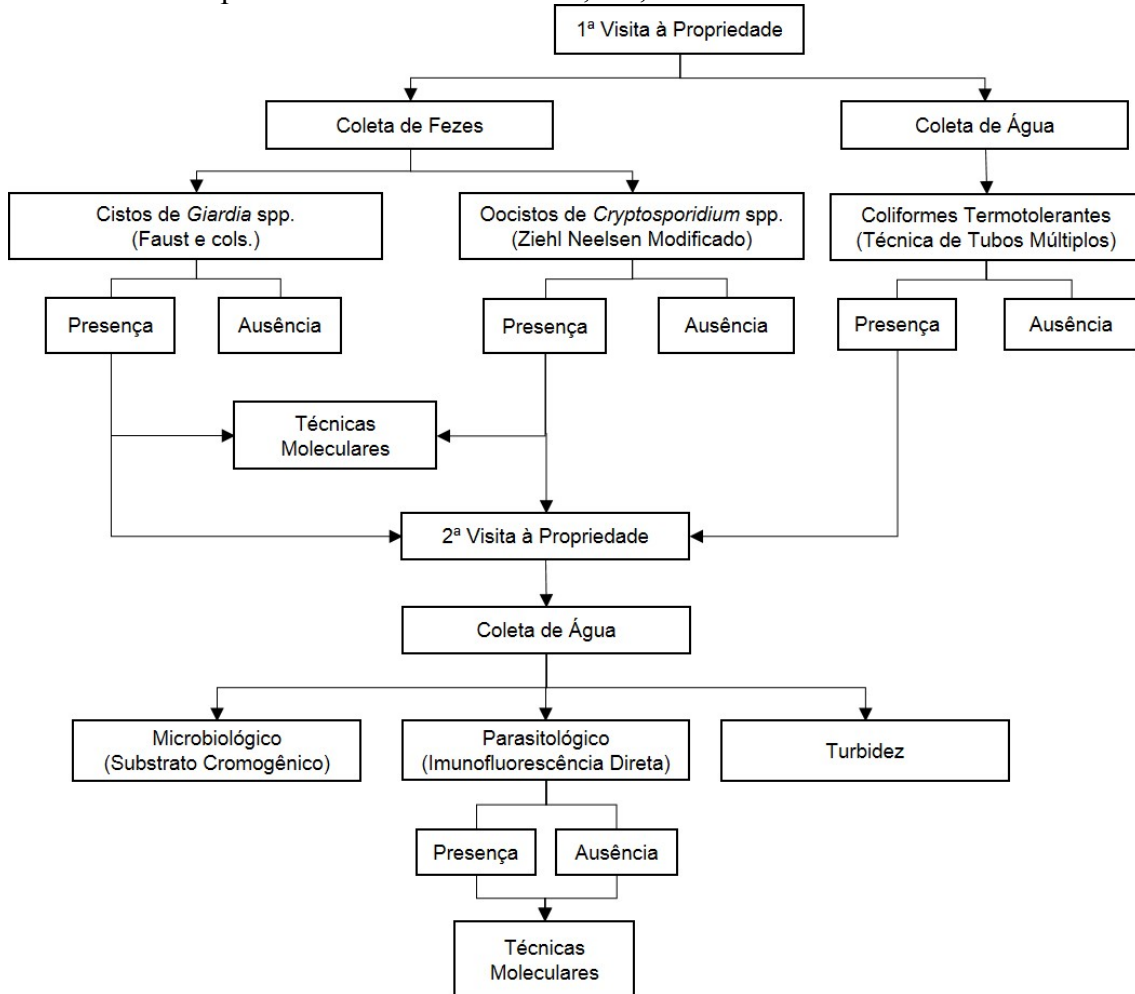
### **Local e População de Estudo**

Este estudo foi realizado nos municípios de Campo Mourão (latitude sul 24° 02' 45" e longitude oeste 52° 22' 58") e Araruna (latitude sul 23° 55' 55" e longitude oeste 52° 29' 45"), região centro ocidental do Paraná. Como critério de inclusão, admitiu-se pequenas propriedades leiteiras de produção familiar assistidas pelo Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) de Campo Mourão. Desta forma,

amostras de fezes e água foram coletadas de todas as propriedades assistidas pela EMATER, totalizando 55 propriedades, sendo 20 de Araruna e 35 de Campo Mourão.

O fluxograma das etapas de obtenção e análise das amostras de fezes e água está demonstrado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma da obtenção e análise de amostras de fezes e água de 30 propriedades leiteiras de Campo Mourão e 20 de Araruna, PR, 2012-2014



## Obtenção e Análises das Amostras de Fezes

### Coleta de Amostras

Este estudo foi aprovado Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade Integrado de Campo Mourão (242/2011) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP-UEL) da Universidade Estadual de Londrina (277/2011).

Foram coletadas amostras de fezes, diretamente na ampola retal de todos os bovinos de 0 a 24 meses de idade e, aleatoriamente, de metade do rebanho de vacas em lactação; exceto quando o rebanho era composto por até dez animais em lactação, nestes casos todos os animais eram analisados. Em propriedades que possuíam criação de suínos, amostras de fezes foram coletadas do solo em três pontos de cada baía, formando um *pool*.

A coleta de fezes de humanos foi realizada pelos moradores que concordaram voluntariamente em participar do inquérito coproparasitológico, para o qual receberam recipientes descartáveis e orientações para realizá-la no dia anterior ao recolhimento das amostras.

As amostras de fezes de animais e humanos foram mantidas em refrigeração até a análise, dentro de 24 horas.

#### *Análises Coproparasitológicas por Microscopia Óptica.*

As amostras de fezes foram diluídas em água destilada, filtradas em gaze e centrifugadas a 5000xg/5min, no caso de amostras de animais e 500xg/10 min, no caso de amostras de humanos e o sedimento utilizado para pesquisa de cistos e oocistos de protozoários. Para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi realizado esfregaço em lâmina e coloração pela técnica de Ziehl Neelsen modificada (HENRIKSEN; POLENZ, 1981). Para pesquisa de cistos de *Giardia* spp. foi realizada a técnica de centrifugo-flutuação em solução de sulfato de zinco à 33% (FAUST et al., 1939) em fezes de origem animal. Nas amostras de origem humana, além das técnicas citadas anteriormente, foram executadas as técnicas de sedimentação espontânea (LUTZ, 1919; HOFFMAN; PONS; JANER, 1934) e Kato-Katz (KATO; MIURA, 1954; KATZ; COELHO; PELLEGRINO, 1970). Todas as amostras de fezes foram armazenadas em dicromato de potássio, concentração final 2,5%, a 4°C, para posterior análise molecular.

#### **Obtenção e Análises das Amostras de Água**

##### *Coleta de Amostras de Água*

Amostras de água foram coletadas de fontes de abastecimento tanto da população humana quanto da população animal da propriedade. As coletas foram realizadas em duas etapas: uma para análise microbiológica e outra para pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

A primeira coleta de água foi realizada na primeira visita às propriedades, em dois pontos de cada fonte de água da propriedade, sendo uma no local de origem da água e a outra em uma torneira. A coleta foi realizada em frascos de vidro de 250mL previamente lavados e esterilizados. Procedimento de coleta foi realizado de acordo com Brasil (2013).

Em propriedades que apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes na água e/ou presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e/ou cistos de *Giardia* spp. nas amostras de fezes dos animais, foi realizada uma segunda visita e nova coleta de água diretamente na origem da fonte. Nesta segunda etapa, foi realizada nova análise microbiológica da água e coletado um volume de 10L de água em bombonas plásticas para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Previamente à coleta, estas bombonas foram higienizadas e enxaguadas com Tween 80 a 1% e água destilada.

#### *Análise Microbiológica da Água*

Amostras de água obtidas na primeira coleta foram submetidas à análise microbiológica por meio da Técnica de Tubos Múltiplos e aquelas obtidas na segunda coleta pela técnica do substrato cromogênico (APHA, 2005).

#### *Concentração das Amostras de Água*

Três litros da amostra de 10L de água obtida na segunda coleta foram filtrados em membrana de éster de celulose com 47mm de diâmetro e 1,2µm de porosidade (Millipore®), em sistema porta-filtro e bomba a vácuo (4L/min). Após a filtração, o material foi eluído mediante lavagem e raspagem da membrana, com alças plásticas flexíveis, em Tween 80 a 0,1%. O material obtido foi concentrado por dupla centrifugação a 1050xg/15min, a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspenso em água destilada e armazenado em microtubos de 2mL (BRANCO; LEAL; FRANCO, 2011). As amostras foram mantidas em refrigeração até a realização da Reação de Imunofluorescência Direta (RID) e, posteriormente, mantidas a -20°C até a extração de DNA genômico. Em amostras com alta turbidez, com as quais foi impossível realizar a filtração em membranas, foi realizada a técnica de floculação por carbonato de cálcio, conforme descrito por Vesey et al. (1993), para concentração da água.

### *Reação de Imunofluorescência Direta*

Alíquotas de 10 $\mu$ L do sedimento obtido na concentração de cada amostra foram utilizadas para realizar a RID por meio de anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* adquiridos comercialmente, (Merifluor® Meridian Bioscience). Cistos e oocistos identificados na RID foram contados para o cálculo de estimativa do número de cistos e oocistos/L (N(c/oo)) de água de acordo com a fórmula proposta por Cantusio Neto e Franco (2004):

$$N(c/oo) = \left( \frac{\text{Número de (oo)cistos}}{\text{Volume do pellet Avaliado } (\mu\text{L})} \right) \times \left( \frac{\text{Volume do pellet obtido (mL)}}{\text{Volume filtrado da amostra (L)}} \right)$$

### *Turbidez*

A turbidez das amostras de água foi calculada utilizando-se turbidímetro HACH 2100Q.

## **Análises Moleculares**

### *Extração de DNA genômico de Cryptosporidium e Giardia*

As amostras de fezes (200 $\mu$ L) que apresentaram cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas técnicas de microscopia óptica e o sedimento obtido na concentração das amostras de água (200 $\mu$ L) coletadas na segunda visita às propriedades foram submetidos à extração de DNA por meio do *kit* comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), conforme protocolo do fabricante. Antes da extração as amostras de fezes foram centrifugadas a 5.000xg/5min com água ultrapura, aproximadamente três vezes, até a remoção do dicromato de potássio.

### *Amplificação de DNA Genômico de Cryptosporidium spp. e Giardia spp. em Amostra de Fezes e Água*

Para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. fragmentos do gene 18SSU rRNA foram amplificados por reação de *nested*-PCR, na qual foram utilizados *primers* descritos por Xiao et al. (1999). Todas as amostras foram processadas em triplicata. Nas duas reações de PCR foram utilizados 17,5µL de água ultrapura autoclavada, 2,5µL de solução tampão 10X concentrado, 0,5µL de dNTP (10mM), 1,25µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,25µL de Taq Polimerase (5U/µL) e 2,0µL do DNA extraído de cada amostra, compondo um volume final de 25µL. O material obtido na primeira reação foi diluído em 50µL antes de ser submetido à segunda reação. As condições de amplificação no termociclador foram: um ciclo de incubação inicial a 95°C por cinco minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 55°C por 45 segundos (anelamento) e 72°C por 60 segundos (extensão) e uma extensão final de 72°C por cinco minutos.

Para pesquisa de *Giardia* spp. fragmentos do gene 16SSU rRNA foram amplificados por reação de *nested* PCR. Na primeira e segunda reações foram utilizados *primers* descritos por Appelbee et al. (2003) e Hopkins et al. (1997) respectivamente. Todas as amostras foram processadas em triplicata. Nas duas reações de PCR foram utilizados 16,75µL de água ultrapura autoclavada, 2,5µL de solução tampão 10X concentrado, 0,5µL de dNTP (10mM), 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1,25µL de DMSO (dimetil sulfóxido) 5%, 0,25 µL de Taq Polimerase (5U/µL) e 2,0 µL do DNA extraído de cada amostra teste, compondo um volume final de 25µL. As condições de amplificação no termociclador, tanto para a primeira quanto para a segunda reação, foram: um ciclo de incubação inicial a 95°C por cinco minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 58°C por 45 segundos (anelamento) e 72°C por 60 segundos (extensão) e uma extensão final de 72°C por cinco minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Ultrapure™ Agarose; Invitrogen) 1,5% corado com SYBR® Safe (DNA Gel Stain; Invitrogen, Brasil) e visualização com luz ultravioleta.

### *Sequenciamento de DNA*

O sequenciamento de DNA foi realizado em todas as amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* spp na PCR e em todas as amostras de água positivas para *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp na PCR.

Para o sequenciamento de DNA foram realizadas a extração e a purificação das amostras positivas por meio do *kit* comercial (*QIAquick Gel Extraction/* Qiagen). O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e com *Kit* comercial (*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit/*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cada amostra foi sequenciada em ambas as direções com *primers forward e reverse* da segunda reação.

As sequências de nucleotídeos foram comparadas às sequências padrão de *Cryptosporidium* e *Giardia* depositadas no *GenBank*, pelo sistema *Basic Local Alignment and Search Tool* (BLAST) e por alinhamento manual através do programa *Biological Sequence Alignment Editor* (BioEdit 7.2.5.0).

#### *PCR-RFLP – Cryptosporidium*

As amostras de fezes que apresentaram resultado positivo para *Cryptosporidium* na *nested-PCR*, cuja análise de sequenciamento não foi possível devido a sobreposição de fragmentos genéticos no esferograma, foram submetidas à caracterização genética por análise do Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP). Para identificação das espécies de *Cryptosporidium* presentes na amostra, os produtos obtidos na segunda reação da *nested-PCR* foram clivados com as enzimas de restrição *SspI*, *AseI*, *MboII* e *DdeI* (XIAO et al., 2001; FENG et al., 2007). A reação foi realizada com 5µL de DNA; 2µL de tampão de restrição, 3UI de enzima (New England Biolabs) e água ultrapura, de acordo com instruções do fabricante. A digestão foi realizada à 37°C por uma hora e os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com SYBR® Safe.

#### **Precipitação Pluviométrica**

Para comparar os resultados das amostras às variáveis de sazonalidade, os dados de precipitação hídrica 24 e 48 horas antes da coleta foram obtidos do Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR).

## **Investigação Epidemiológica**

Os proprietários ou responsáveis pela propriedade foram entrevistados por meio de questionário epidemiológico contendo variáveis referentes ao tipo de produção, condições ambientais de saneamento da propriedade, sanidade dos animais e dos humanos e características individuais de animais e humanos, as quais foram analisadas quanto à associação com a presença/ausência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em fezes e água.

### **Análise Estatística**

A comparação das frequências dos resultados obtidos nas análises de fezes e água e das variáveis do questionário epidemiológico foi realizada por meio do teste estatístico de qui quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher. A magnitude das associações foi determinada pelo cálculo do *Odds Ratio* (OR). As análises foram realizadas no programa EpiInfo™ 3.5.2 e adotou-se nível de significância de 5%.

## **Resultados**

### **Amostras de Fezes**

#### *Bovinos*

Foram coletadas 937 amostras de fezes de bovinos, sendo 558 animais de propriedades de Campo Mourão e 379 de Araruna.

Na microscopia óptica, 71 (7,6%) amostras de fezes foram positivas para cistos de *Giardia* spp. em 27 (49,1%) propriedades e 48 amostras foram positivas na PCR. Já oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram identificados em 96 (10,2%) amostras de 37 (67,3%) propriedades, quando analisadas pela microscopia óptica, e 64 amostras também foram positivas na PCR. Considerando as diferentes faixas etárias, a prevalência foi maior entre bezerros de com até seis meses de idade e entre estes foi maior na faixa etária até dois meses, tanto para *Giardia* spp. quanto para *Cryptosporidium* spp. (Tabela 1).

Tabela 1. Prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em fezes de bovinos, de 55 propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014.

	Faixa Etária (meses)	N °de Amostras	Positivos MO (%)		Positivos PCR (%)*	
			<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.
0 a 6 meses	0 - 2	146	25 (17,1)	37 (25,3)	15 (60)	34 (91,9)
	2 - 4	133	15 (11,3)	9 (6,8)	13 (86,7)	7 (77,8)
	4 - 6	99	6 (6,1)	8 (8,1)	5 (83,3)	6 (75)
	Total (0 a 6)	378	46 (12,2)	54 (14,3)	33 (71,7)	47 (87)
> 6 meses	6 - 12	81	6 (7,4)	5 (6,2)	6 (100)	3 (60)
	12 - 24	54	0	6 (11,1)	0	1 (16,7)
	> 24	424	19 (4,5)	30 (7,1)	9 (47,4)	13 (43,3)
	Total (Todos)	937	71 (7,6)	96 (10,2)	48 (67,6)	64 (66,7)

MO: Microscopia óptica; PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase; \* Porcentagem calculada sobre o número de positivos na microscopia óptica.

Os resultados da associação estatística entre variáveis de exposição e presença dos protozoários nas fezes dos bovinos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis com associação estatística significativa com a presença de cistos de *Giardia* spp./oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de 937 bovinos leiteiros de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014.

Variáveis de Exposição	Cistos de <i>Giardia</i> spp	OR (IC95%)	p
	Amostras Positivas/Total (%)		
<b>Sistema de Produção</b>			
Empresarial	10/63 (15,9)	2,51* (1,08 - 5,31)	0,0318
Familiar	61/874 (7,0)		
<b>Vacas em Lactação</b>			
1 a 40	53/801 (6,6)	0,46 (0,26-0,82)	0,0117
> 40	18/136 (13,2)		
<b>Alimentação das Vacas</b>			
Apenas Cocho	10/44 (22,7)	4,02* (1,68 - 8,78)	0,002
Cocho e Pasto	61/893 (6,8)		
<b>Frequência de Diarreia</b>			
Frequentemente	41/346 (11,8)	2,51 (1,54 - 4,11)	0,0003
Raramente	30/591 (5,1)		
<b>Características das Fezes (bezerros até 2 meses)</b>			
Líquidas/Pastosas	11/35 (31,4)	3,18 (1,28 - 7,87)	0,0203
Firmes	14/111 (12,6)		
<b>Faixa Etária (Todos)</b>			
0 - 6 meses	46/377 (12,2)	2,97 (1,79 - 4,93)	0,0001
> 6 meses	25/560 (4,5)		
<b>Faixa Etária (até 6 meses)</b>			
0 - 2 meses	25/146 (17,1)	2,08 (1,12 - 3,87)	0,0296
2 - 6 meses	21/232 (9,1)		
<b>Variáveis de Exposição</b>	<b>Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>

	Amostras Positivas/Total (%)	(IC95%)	
<b>Raça</b>			
Europeu	78/646 (12,1)	2,21	0,005
Mestiço Zebu/Zebu	17/291 (5,8)	(1,29 - 3,81)	
<b>Características das fezes</b>			
Líquidas/Pastosas	23/98 (23,5)	3,31	0,0001
Firmes	72/839 (8,6)	(1,96 - 5,61)	
<b>Faixa Etária (Todos)</b>			
0 - 6 meses	54/95 (56,8)	2,12	0,0007
>6 meses	41/559 (7,3)	(1,38 - 3,25)	
<b>Faixa Etária (até 6 meses)</b>			
0 - 2 meses	37/146 (25,3)	4,29	0,0001
2 - 6 meses	17/232 (7,3)	(2,31 - 7,97)	

\*Teste Exato de Fisher; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança; p: probabilidade.

A análise da sequência do fragmento amplificado do gene 18SSU rRNA foi bem sucedida em 34 das 64 amostras positivas para *Cryptosporidium* spp na PCR. Dentre elas, 27 (42,2%) apresentaram 100% de identidade com *C. parvum* (acesso KM215743.1). Cinco (7,7%) amostras foram identificadas como *C. ryanae*, entre as quais duas apresentaram 100% de identidade com sequências homólogas do *GenBank* (acesso KJ020908.1) e três apresentaram 99% de identidade (acesso KJ020910.1). Duas (3,1%) amostras foram identificadas como *C. bovis*, entre as quais uma apresentou identidade de 100% e a outra de 99% (acesso KJ020905.1). Em 20 (31,3%) amostras o sequenciamento demonstrou sobreposição de dois diferentes fragmentos genéticos (picos duplos) no esferograma, indicando provável infecção mista. As espécies identificadas no sequenciamento genético em diferentes faixas etárias dos bovinos estão descritas na Tabela 3.

A análise da PCR-RFLP das 20 amostras de fezes com sobreposição de fragmentos no esferograma, permitiu identificar uma amostra positiva para *C. parvum* e *C. bovis*, três para *C. parvum* e *C. ryanae*, cinco para *C. parvum* e *C. andersoni*, cinco apenas para *C. parvum* e uma apenas *C. bovis*. Em cinco amostras de bovinos não foi possível realizar a análise, devido à ausência de DNA (Tabela 3). As amostras de bovinos com provável infecção mista pertenciam a 16 propriedades, das quais 15 mantinham animais de diferentes faixas etárias no mesmo ambiente.

Tabela 3. Distribuição das espécies de *Cryptosporidium* de acordo com a faixa etária, identificadas por sequenciamento genético em fezes de 64 bovinos e PCR-RFLP em fezes de 15 bovinos de 28 propriedades leiteiras de Araruna e Campo Mourão, PR, 2012 a 2014.

Faixa Etária (meses)	Sequenciamento de DNA (%)						PCR-RFLP (%)					
	Nº de Amostras Positivas (PCR)	<i>C. parvum</i>	<i>C. bovis</i>	<i>C. ryanae</i>	Sobreposição de Fragmentos	ND	Nº de Amostras (Fragmento Duplo)	<i>C. parvum/ C. bovis</i>	<i>C. parvum/ C. ryanae</i>	<i>C. parvum/ C. andersoni</i>	Espécie Única	ND
0 - 2	33	16	0	0	13	4	7	1	0	0	5*	1
2 - 4	8	4	0	1	2	1	4	0	2	1	0	1
4 - 6	8	4	1	1	0	2	3	0	1	0	0	2
6 - 12	3	1	0	0	2	0	2	0	0	1	1**	0
12 - 24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
> 24	12	2	1	3	3	3	4	0	0	3	0	1
Total	64	27 (42,2)	2 (3,1)	5 (7,7)	20 (31,3)	10 (15,6)	20	1 (1,6)	3 (4,7)	5 (7,8)	6 (9,4)	5 (7,8)

ND: Espécie não determinada devido à sequência ilegível (sequenciamento) ou por ausência de DNA (PCR\_RFLP); \* *C. parvum*; \*\**C. bovis*.

### *Suínos*

Entre as 55 propriedades deste estudo, 20 também criavam suínos, nestas, foram coletados 61 *pools* de fezes. Todas as criações eram mantidas apenas para subsistência, com variação de um a sete animais.

Entre os 61 *pools* de fezes de suínos, em apenas um foram identificados cistos de *Giardia*, pertencente a uma baia de animais lactentes, o qual foi negativo na PCR. Oocistos de *Cryptosporidium* foram identificados em cinco *pools*, pertencentes a baias de animais desmamados e, destes, apenas um foi positivo na PCR.

A análise estatística não demonstrou associação significativa entre a presença destes parasitos nas fezes dos suínos e variáveis de exposição estudadas. No entanto, 13 (65%) das propriedades estudadas retiram fezes das baias apenas quando estas se acumulam em grande quantidade e 19 (95%) descartam as fezes diretamente na lavoura, sem tratamento prévio.

### *Humanos*

Foram coletadas amostras de fezes de 57 humanos em 20 propriedades de Campo Mourão e 26 em nove propriedades de Araruna, totalizando 83 amostras, entre as quais 15 (18,3%) foram positivas para pelo menos uma parasito. *Endolimax nana* foi identificada em seis (40%) amostras, *Entamoeba coli* em quatro (26,7%), *Iodamoeba bütschlii* em três (20%) e *Entamoeba histolytica* em duas (13,3%). A faixa etária com maior ocorrência de parasitismo foi a de zero a 12 anos de idade, com seis amostras positivas (35,3%). Nenhuma amostras foi positiva para *Cryptosporidium* spp. ou *Giardia* spp.

### **Amostras de Água**

Entre as 55 propriedades visitadas em 48 (87,3%) as fontes de água de consumo humano e animal eram as mesmas e, dentre elas, 27 (49,1%) correspondiam a nascentes.

Na primeira visita às propriedades foram coletadas duas amostras de água para cada fonte da propriedade, sendo uma na origem da fonte e outra em torneira, totalizando 62 fontes e 124 amostras analisadas. Destas, 27 fontes (40,3%) e 50 amostras (40,3%) foram positivas para coliformes termotolerantes em 25 (45,5%) propriedades. Na segunda visita, foi coletada uma amostra de água na fonte, totalizando 31 amostras, nas quais coliformes termotolerantes foram identificados em 15 amostras (48,4%) (Tabela 4).

Tabela 4. Prevalência de coliformes termotolerantes em 155 amostras de água obtidas na primeira e segunda visitas às propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014.

Fonte de Água	Primeira Visita			Segunda Visita		
	Nº de Fontes	Nº de Amostras	Amostras positivas – CTT* (%)	Nº de Fontes	Nº de Amostras	Amostras positivas – CTT** (%)
Nascente	31	62	35 (56,5)	24	24	12 (50)
Poço Artesiano	20	40	3 (7,5)	2	2	0
Poço Freático	8	16	6 (37,5)	2	2	0
Rio	3	6	6 (100)	3	3	3 (100)
Total	62	124	50 (40,3)	31	31	15 (48,4)

Coliformes Termotolerantes por meio da Técnica de Tubos Múltiplos; \*\* Coliformes Termotolerantes por meio da Técnica de Substrato Cromogênico.

Os resultados da associação entre variáveis de exposição e presença de coliformes termotolerantes nas amostras de água obtidas na primeira coleta estão demonstrados na Tabela 5.

Entre as amostras de água obtidas na segunda visita, foi possível detectar pelo menos um dos protozoários em quatro de 31 analisadas. Apenas uma amostra foi positiva para os dois protozoários na RID. A fonte de água, turbidez e parâmetros bacteriológicos das amostras positivas na RID e precipitação hídrica 24 e 48 horas antes da coleta estão demonstrados na Tabela 6, bem como o número de (oo)cistos identificados por litro de água. Todas as amostras positivas na RID para *Cryptosporidium* spp. e/ou *Giardia* spp. também foram positivas na PCR. Dentre as amostras negativas na RID, apenas a propriedade número 27 amplificou DNA de *Cryptosporidium* na PCR.

A análise do sequenciamento das três amostras de água positivas para *Cryptosporidium* spp. na PCR, foi bem sucedida em uma amostra, a qual apresentou 100% de identidade com *C. parvum* (acesso KM215743.1). Esta amostra pertencia à propriedade 26, na qual foi identificada a mesma espécie de *Cryptosporidium* em três bezerros menores de dois meses. Em duas amostras o sequenciamento demonstrou sobreposição fragmentos genéticos no esferograma. A análise do sequenciamento das três amostras positivas para *Giardia* foi

bem sucedida em duas, as quais apresentaram 100% de identidade com *Giardia duodenalis* (acesso KJ867494.1). As amostras de água positivas e as espécies identificadas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 5. Variáveis com associação estatística significativa com a presença de coliformes termotolerantes em 124 amostras de água de 55 propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014.

Variáveis	Coliformes Termotolerantes		OR (IC95%)	p
	Amostras Positivas/Total (%)			
<b>Dessedentação</b>				
Humana	2/14 (14,3)		1	
Humana e Animal	40/96 (41,7)		4,29 (0,91 – 20,21)	0,09384
Animal	8/14 (57,14)		8 (1,28 – 50,03)	0,04861
<b>Fonte da Água</b>				
Rio	6/6 (100)		-	0,0001
Nascente	35/62 (56,45)		15,99 (4,45 - 57,45)	0,0001
Poço Freático	9/60 (15)		7,4 (1,57 - 34,93)	0,01294
Poço Artesiano	3/40 (7,5)		1	
<b>Local de Coleta</b>				
Fonte	22/37 (59,46)			
Caixa d'água/Torneira	28/87 (32,2)		3,09 (1,4 - 6,85)	0,0084
<b>Tampa na fonte</b>				
Sim	36/103 (34,95)			
Não	14/21 (66,7)		0,27 (0,08 - 0,8)	0,0074
<b>Chuva anterior à coleta (até 48 horas)</b>				
Sim	25/46 (54,3)			
Não	25/78 (32,1)		2,52 (1,2 - 5,34)	0,0241
<b>Nascente com bordas elevadas</b>				
Sim	18/40 (45)			
Não	17/22 (77,3)		0,24 (0,074 - 0,78)	0,02892
<b>Nascente com mata ciliar</b>				
Sim	19/42 (45,2)			
Não	16/20 (80)		0,21 (0,06 - 0,72)	0,02107

Entre as amostras de água obtidas na segunda visita à propriedade, foi identificada associação estatística entre a turbidez acima de 5uT e a presença de coliformes termotolerantes ( $p = 0,049$ ;  $OR = 0,17$ ;  $IC95\% = 0,035-0,79$ ). A associação entre amostras positivas para *Giardia* spp. e/ou *Cryptosporidium* spp. e variáveis de exposição estudadas neste trabalho não foram estatisticamente significativas, no entanto a presença destes parasitos foi mais frequente em amostras de água com coliformes termotolerantes acima de 1000NMP/100mL; com turbidez > de 5UT e com precipitação hídrica acima de 43mm 24 horas antes da coleta.

Tabela 6. Fonte de origem, turbidez, parâmetros bacteriológicos de amostras de água positivas para *Cryptosporidium* spp. ou *Giardia* spp., espécies identificadas por sequenciamento genético e dados de precipitação hídrica 24 e 48 horas antes da coleta em quatro propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2014.

Propriedade	Fonte de Água	<i>Cryptosporidium</i> spp.				<i>Giardia</i> spp.				Turbidez (UT)	CTT (NMP/100mL)	Precipitação anterior à coleta (mm)	
		RID (Oocistos/L)	PCR	Sequenciamento	Bovinos Positivos	RID (Cistos /L)	PCR	Sequenciamento	Bovinos Positivos			24h	48h
26	Nascente	1,3	(+)	<i>C. parvum</i>	Sim	0	(-)		Sim	36,4	1046	83	76
27*	Rio	0	(+)	Fragmento Duplo	Não	12	(+)	ND	Não	98,5	2419,5	44	0
34	Nascente	0,34	(+)	Fragmento Duplo	Sim	0,34	(+)	<i>G. duodenalis</i>	Sim	25,6	24,5	43	0
44	Nascente	0	(-)		Sim	2,1	(+)	<i>G. duodenalis</i>	Sim	64,47	2419,6	182,4	0

\*Amostra concentrada pela técnica de floculação por carbonato de cálcio (VESEY et al., 1993); RID: Reação de Imunofluorescência Direta; Oo/L: oocistos/litro de água; c/L: cistos/litro de água; PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase. CTT: Coliformes Termotolerantes. ND: não determinada devido à sequência ilegível

## Discussão

*Cryptosporidium* spp. é um importante enteropatógeno que causa diarreia em bezerros, podendo comprometer o desenvolvimento do animal ou levá-lo a óbito sendo, portanto, uma doença de impacto econômico (MARTINS-VIEIRA; BRITO; HELLER, 2009). A prevalência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bovinos possui grande variação, a qual está relacionada, entre outros fatores, às diferenças nas idades dos animais. No presente estudo, a prevalência da infecção por este protozoário (10,2%) encontra-se no intervalo de 0,6 a 72,13% descrito na literatura (MEIRELES, 2010). Em estudos que relataram prevalência alta, a maioria dos animais da amostra possuíam menos de seis meses de idade, já prevalências mais baixas são relatadas em estudos com mais de 50% da amostra composta por animais com idade maior que seis meses, como é o caso do nosso estudo (SOUZA e LOPES, 1995; FEITOSA et al., 2004; LANGONI et al., 2004; OLIVEIRA FILHO et al., 2007; CARDOSO et al., 2008; BUDU-AMOAKO et al., 2012). Quando analisada separadamente, a prevalência de *Cryptosporidium* spp. foi significativamente superior em bezerros com até dois meses de idade (25,3%;  $p = 0,0001$ ) e até seis meses (14,3%;  $p = 0,0007$ ) quando comparados com bezerros maiores que dois meses e maiores que seis meses de idade, respectivamente. Em um estudo longitudinal realizado por Santín, Trout e Fayer (2008) nos EUA, a prevalência da criptosporidiose em 30 bovinos, desde o nascimento até dois anos de idade, foi inversamente proporcional à faixa etária dos animais, sendo 96,7% em animais com até duas semanas de idade; 48,5% entre uma a oito semanas; 18,5% entre três a 12 meses e 2,2% entre 12 a 24 meses, estando de acordo com os resultados de nosso estudo.

Considerando o resultado do sequenciamento e da PCR-RFLP, *C. parvum* foi a espécie mais frequente em nosso estudo (64%), com maior destaque para bezerros até seis meses de idade. Em diversos estudos realizados no mundo, *C. parvum* tem sido identificado com maior prevalência em bezerros com até dois meses e considerável diminuição da frequência acima desta idade (GEURDEN et al., 2007; PLUTZER e KARANIS, 2007; THOMPSON et al., 2007; SANTÍN; TROUT; FAYER, 2008; FOLLET et al., 2011; MEIRELES et al., 2011). A alta frequência desta espécie em bezerros com mais de dois meses pode ser consequência do manejo destes animais nas propriedades, uma vez que grande número de produtores deste estudo não separava bezerros de diferentes faixas etárias em ambientes diferentes. Poucas amostras foram

identificadas com *C. ryanae* e *C. bovis*, assim como diversos relatos na literatura (PAZ E SILVA; LOPES; ARAÚJO JÚNIOR, 2013; FAYER; SANTÍN; XIAO, 2005; SANTÍN et al., 2004; FENG et al., 2007; THOMPSON et al., 2007), porém muitos relatos demonstraram maior frequência destas espécies que *C. parvum* em bovinos com mais de dois meses (GEURDEN et al., 2007; SANTÍN; TROUT; FAYER, 2008; LIMA et al., 2013, PAZ E SILVA; LOPES; ARAÚJO JÚNIOR, 2013). Feng et al. (2007), sugeriram que a infecção por *C. bovis* e *C. ryanae* em animais parasitados com maior intensidade por *C. parvum* pode ser ocultada, já que a PCR de fragmentos do gene 18SSU rRNA amplifica a espécie mais predominante (CAMA et al., 2006). *C. andersoni* também foi identificada em poucas amostras, sendo a maioria em animais com mais de 24 meses. Esta espécie é principalmente identificada em novilhos e adultos (FAYER; SANTÍN; TROUT, 2007, SANTÍN; TROUT; FAYER, 2008; MEIRELES et al., 2011), porém alguns relatos brasileiros identificaram *C. andersoni* em alta frequência também em bezerros jovens (SEVÁ et al., 2010; PAZ E SILVA; LOPES; ARAÚJO JÚNIOR, 2013). Em nosso estudo, a frequência de *C. parvum* em bovinos adultos também foi mais alta que as outras espécies, o que é pouco descrito na literatura (SMITH et al., 2014; WELLS et al., 2015). A alta prevalência desta espécie em animais adultos pode colaborar para a infecção de bezerros neonatos e, conseqüentemente, aumentar a contaminação ambiental (MARTINS-VIEIRA; BRITO; HELLER, 2009).

Maior prevalência de *Giardia duodenalis* é comumente identificada em bezerros mais velhos, após o desmame, quando comparada com animais lactentes ou maiores que 12 meses (TROUT et al., 2004; 2005; 2006; TROUT, SANTÍN; FAYER, 2007; PAZ E SILVA; LOPES; ARAÚJO JÚNIOR, 2012; OUCHENE et al., 2014). No presente estudo, a prevalência foi inversamente proporcional à idade (0 a 2 meses: 17,1%; 2 a 6 meses: 9,1%; 6 a 12 meses: 7,3% e acima de 12 meses: 4%) estando de acordo com estudo realizado por Santín et al. (2009) que encontraram prevalência de 60,8% em bezerros lactentes, 32,1% em bezerros pós desmamados e 11,4% em novilhas, mostrando declínio da prevalência com o aumento da idade.

A variação na prevalência de criptosporidiose e giardiose bovinas encontradas por diferentes estudos em uma mesma faixa etária também pode ocorrer devido a fatores relacionados ao manejo e características dos animais. Em nosso estudo, foi demonstrada associação significativa entre criação de vacas exclusivamente no cocho e número de animais em lactação acima de 40 com a presença de cistos de *Giardia* spp. nas fezes. Vários estudos demonstraram maiores prevalências em propriedades com

criação de vacas e bezerros em ambiente coletivo fechado e com maior número de animais (MOHAMMED et al., 1999, SISCHO et al., 2000, ORTOLANI E SOARES, 2003; BUDU-AMOAKO et al., 2012). Criadouros coletivos fechados possuem ambiente favorável à manutenção do parasito devido ao sombreamento e umidade, mantendo-o infectante por mais tempo; além disso, quanto maior a densidade animal em um ambiente, maior a contaminação do ambiente e, conseqüentemente, maior a ingestão de (oo)cistos (VARGAS JÚNIOR et al., 2014). Em nosso estudo, também foi observada maior prevalência de criptosporidiose em animais de raça europeia quando comparada à de animais zebuínos ou mestiços com raças zebuínas. Outros estudos descreveram prevalência de criptosporidiose semelhantes em animais de raças zebuínas e europeias demonstrando que provavelmente as práticas de manejo adotadas na criação dos animais influenciam no parasitismo mais do que a diferença de raças (OLIVEIRA-FILHO et al., 2007; LIMA et al., 2013). Em nosso estudo, apesar de a maioria das propriedades constituir-se em produção familiar, as que possuem melhores níveis de tecnificação, com maior densidade animal, utilizam animais da raça holandesa, enquanto as propriedades com menor densidade animal tendem a utilizar animais mestiços com raça zebuína. Estas características podem ter influenciado na associação entre criptosporidiose e raça europeia, como demonstrado por Feitosa et al. (2004) e Almeida, Oliveira e Teixeira (2008).

Entre os animais que apresentaram diarreia, 23,5% também eliminavam oocistos de *Cryptosporidium* spp, tendo associação significativa, porém esta frequência aumentou ao considerarmos apenas a população de bezerros de 0 a 2 meses de idade (71,4%). Outros estudos têm demonstrado a alta prevalência deste parasito em fezes de bezerros com diarreia (QUILEZ et al., 1996; HUETINK et al., 2001; OUCHENE et al., 2014). O sistema imune de bezerros neonatos é imaturo, portanto as alterações na mucosa intestinal são mais pronunciadas que em bezerros mais velhos, o que aumenta a morbidade da criptosporidiose (OUCHENE et al., 2014). Além disso, fatores de risco relacionados ao ambiente de permanência de neonatos favorecem o maior contato com fezes e, conseqüentemente, maior ingestão de oocistos, uma vez que vacas são portadoras assintomáticas do parasito e eliminam maior quantidade de oocistos nas fezes no período de parição, aumentando a contaminação ambiental e o risco de infecção dos neonatos (MUNIS NETA et al., 2010; VARGAS JÚNIOR et al., 2014. Em sistemas de criação extensiva, conforme a idade aumenta os bezerros são transferidos para o pasto, diminuindo este contato (MOHAMMED et al., 1999; MARTINS VIEIRA; BRITO;

HELLER, 2009). Quando analisada a associação entre diarreia e a eliminação de cistos de *Giardia* spp. em todos os animais não houve associação estatística, já que apenas 11 (12,6%) de 97 animais com diarreia também eliminavam cistos. No entanto, esta frequência aumentou para 31,4% ao considerarmos apenas a população de bezerros de 0 a 2 meses de idade, possuindo associação significativa. Apesar da incerteza do papel da *Giardia* como patógeno primário na diarreia de bovinos, alguns estudos têm demonstrado esta possibilidade. McAllister et al. (2005) e Ouchene et al. (2014) identificaram cistos de *Giardia* spp em 36% de 669 amostras de fezes de bovinos e 36,7% de 690 amostras, respectivamente, e associação significativa entre a presença do parasito e diarreia, estando de acordo com os achados de nosso estudo. Assim como por outros parasitos, como *Cryptosporidium* spp. a diarreia por *Giardia* é determinada por diversos fatores, como virulência do parasito, resposta imune do hospedeiro e dose infectante, sendo esta última muito dependente do sistema de manejo, com maior impacto em sistemas de criação intensiva (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010).

Bezerros infectados por *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp podem eliminar cerca de  $10^6$  a  $10^7$  (oo)cistos/g de fezes, com maiores picos de eliminação em animais jovens, tornando-se intermitente com o desenvolvimento de imunidade adaptativa (MARTINS VIEIRA; BRITO; HELLER, 2009; O'HANDLEY et al., 2003). Desta forma, bezerros até dois meses de idade são as mais importantes fontes de infecção e responsáveis por considerável contaminação ambiental (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010; OUCHENE et al., 2014). Além da prevalência destas protozooses ser maior em bezerros lactentes e do fato deles eliminarem maior quantidade de (oo)cistos, também são considerados os principais reservatórios de *C. parvum*, espécie com alto potencial zoonótico (XIAO, 2010), identificada com alta frequência em nosso estudo, e a infecção por assembleias zoonóticas de *G. duodenalis* já foi descrita nesta categoria de bovinos (O'HANDLEY et al., 2000). Portanto, a excreção de (oo)cistos no ambiente por bezerros infectados pode contaminar a água e aumentar o risco de criptosporidiose e giardiose humana (MARTINS-VIEIRA; BRITO; HELLER, 2009).

Nas propriedades rurais visitadas, as principais fontes de água de consumo humano eram de origem subterrânea, nas quais a presença de coliformes termotolerantes foi bastante relevante, principalmente em nascentes e poços freáticos. No Brasil, cerca de 70% dos municípios rurais utilizam estas fontes alternativas de

abastecimento de água, sem tratamento e monitoramento da potabilidade (BRASIL, 2012). Poços antigos e/ou inadequadamente vedados, nascentes desprotegidas, destruição de mata ciliar e manejo inadequado de solo facilitam a contaminação das águas subterrâneas por meio de escoamento de água superficial sobre o solo contaminado por esgoto humano ou fezes de animais (AMARAL et al., 2003, TAYLOR, 2004). A ausência de mata ciliar e de estrutura de proteção de nascentes, como bordas elevadas e tampa, teve associação significativa com a presença de coliformes termotolerantes na água. Estudo realizado por Vaz e Orlando (2012) demonstrou baixa qualidade da água devido a elevada degradação ambiental de nascentes causada pela escassez de cobertura vegetal, pisoteio animal e proximidade com áreas de pastagem e lavouras. A vegetação no entorno de nascentes exerce papel de barreira física entre o ambiente terrestre e o aquático, diminuindo o escoamento superficial e erosões e, conseqüentemente, a contaminação da água (ANDRADE; SANQUETTA; UGAYA, 2005). Diante disto, não é surpresa que maior turbidez ( $p = 0,0490$ ) e precipitação anterior à coleta das amostras de água ( $p = 0,0366$ ) tenham apresentado associação significativa com a presença de coliformes termotolerantes identificada neste estudo. A presença de bactérias de origem fecal em seis das 16 amostras coletadas em poços freáticos não demonstrou associação com o tipo de estrutura do poço, uma vez que todos possuíam tampas de proteção adequadas, parede externa acima do solo, revestimento interno e calçamento ao redor do poço. Estas características foram identificadas como fatores de proteção para a contaminação de poços freáticos por coliformes termotolerantes em estudo realizado no Mato Grosso do Sul (CAPP et al., 2012). O risco de contaminação de águas subterrâneas pela passagem de micro-organismos através do solo é possível, pois apesar de camadas de solo e rocha diminuírem este risco, elas não são capazes de impedir a contaminação, principalmente em áreas agrícolas de grande degradação do solo e despejo de fezes de animais (TAYLOR et al., 2004).

A presença de coliformes termotolerantes na água representa um risco para a saúde da população que consome esta água. No mundo, aproximadamente 88% dos casos de diarreia são atribuídos ao abastecimento de água, esgotamento sanitário e higiene inadequados (PRUSS et al., 2002). A maior concentração dos casos ocorre em crianças, especialmente até um ano de idade, por serem mais suscetíveis a diversas doenças, inclusive as que são favorecidas por degradação ambiental (COSTA et al., 2005). Outros estudos demonstraram a maior frequência de diarreia infantil relacionada ao consumo de água de má qualidade (FEWTRELL et al., 2005; CLASEN et al., 2007;

SILVA; HELLER; CARNEIRO, 2012) e contaminada por bactérias de origem fecal (PINFOLD, 1990; JACKSON et al., 1998; JOVENTINO et al., 2010).

A presença de *Cryptosporidium* spp. e/ou *Giardia* spp. foi demonstrada em quatro de 31 amostras de água analisadas, das quais três eram de nascentes e uma de rio. A presença destes protozoários em nascentes reforça a importância de proteção a estas fontes de água, uma vez que as três não possuíam mata ciliar e estrutura de proteção adequada, ficavam na parte baixa do terreno e muito próximas às áreas de pastagem. A contaminação de nascentes por estes protozoários e sua relação com estrutura e ambiente da fonte de água já foi demonstrada em outros estudos. Branco, Leal e Franco (2011), relataram a presença de pelo menos um destes protozoários em duas nascentes de área urbana e uma de área rural e relacionou-a com canalizações precárias, reservatórios inadequados, porosidade do solo, presença de esgoto, localização em partes baixas do terreno e proximidade de pastos. Nishi et al. (2009), relataram a presença destes protozoários em 42,8%, 14,3% e 14,3% de amostras de água coletadas de rio, nascentes e poço artesiano, respectivamente, em terras indígenas e atribuíram a presença dos mesmos à contaminação por fezes humanas e animais.

O número de cistos (0,34 – 12/L) e oocistos (0,34 – 1,3/L) identificada nas amostras de água demonstra grande relevância em saúde pública, já que uma pequena dose de (oo)cistos é suficiente para causar infecção (FRANCO et al., 2007), além disso, as três nascentes contaminadas identificadas neste estudo são utilizadas para dessedentação humana. As amostras de água positivas para estes protozoários foram coletadas após elevada precipitação e a densidade de (oo)cistos nas amostras foi maior naquelas com maior turbidez. Embora não tenha ocorrido associação significativa entre estes parâmetros e a presença dos protozoários, alguns estudos estabeleceram correlação positiva entre os mesmos. Swaffer et al. (2014) obtiveram correlação positiva e significativa tanto para turbidez quanto para vazão das águas em amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. coletadas em um rio de múltiplo uso na Austrália. Em Viçosa, MG, Heller et al. (2004) identificaram altas concentração de (oo)cistos em mananciais de abastecimento, caracterizados por bacias desprotegidas, com intensa ocupação humana e atividade agropecuária e inferiram a influência das chuvas na presença destes protozoários, apesar de não demonstrarem estatisticamente.

Os coliformes termotolerantes são importantes indicadores de contaminação fecal na água, e sua presença permite a suposição da existência de outros micro-organismos de origem fecal. No presente estudo, as fontes de água positivas para

*Cryptosporidium* spp e/ou *Giardia* spp também possuíam alta contagem bacteriana, sendo três acima de 1000NMP/100ml. A portaria 2914/11 (BRASIL, 2011) estabelece a necessidade de monitoramento destes protozoários nos pontos de captação da água quando a média geométrica anual de *Escherichia coli* identificada na água bruta superficial for maior ou igual a 1000 *E. coli* /100 ml. Apesar da alta contagem bacteriana identificada nas amostras deste estudo representarem um resultado pontual, é importante reconhecer que a intensa contaminação fecal destas fontes sugere risco para a saúde humana e animal destas propriedades.

A relação entre as amostras positivas para *Giardia* spp. e a presença deste protozoários em fezes de animais da propriedade não foi possível, uma vez que não foi realizado sequenciamento de DNA a partir de fezes bovinas, devido à baixa sensibilidade em identificar assembleias pelo fragmento do gene 16SSU, utilizado neste estudo (RYAN CACCIÒ, 2013). *G. duodenalis* foi identificada em amostra de água, porém não foram utilizados marcadores para identificação de agrupamentos, não sendo possível estabelecer a origem da contaminação (CACCIÒ; RYAN, 2008; CACCIÒ; SPRONG, 2010). Todas as amostras de água que apresentaram cistos de *Giardia* spp eram proveniente de propriedades com animais parasitados por este protozoário. Apesar da assembleia E, não zoonótica, ser a mais comumente identificada em bovinos, alguns estudos demonstraram a prevalência de infecção por assembleias zoonóticas em 3 a 43% dos animais, em diferentes categorias (TROUT et al., 2004; 2005; 2006; 2007; SANTÍN; TROUT; FAYER, 2009; GEURDEN et al., 2012).

A análise do sequenciamento genético de *Cryptosporidium* spp, identificado em uma das amostras de água, demonstrou ser a espécie *C. parvum*. As espécies mais comumente associadas à doença em humanos são *C. hominis*, exclusivamente antroponótica e *C. parvum*, espécie zoonótica mais frequentemente encontrada em áreas rurais (ZINTL et al., 2009; CHALMERS et al., 2011; RYAN; FAYER; XIAO, 2014). Outros estudos têm associado a alta frequência de infecção por *C. parvum* em humanos com a presença de bovinos parasitados próximos à áreas de captação de água (WILKES et al., 2013; WELLS et al., 2015). *C. parvum* está associado a diferentes hospedeiros, portanto sua presença na água poderia ser resultado de contaminação por fezes de animais domésticos, selvagens ou esgoto humano (XIAO et al., 2004; BUDU-AMOAKO et al., 2012). No entanto, a identificação desta espécie em bezerros da mesma propriedade somada à identificação de diversos fatores que colaboram para a contaminação da nascente por fezes de bovinos, há uma grande

possibilidade de que estes animais sejam as principais fontes de contaminação. Há necessidade de realizar a subtipagem, pela análise do gene da glicoproteína de 60KDa (Gp60), destas amostras para confirmar a origem zoonótica, uma vez que esta espécie de *Cryptosporidium* possui subtipos antroponóticos e zoonóticos (XIAO, 2010),

Em conclusão, bovinos de propriedades leiteiras da região estudada são parasitados por *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp, com maior prevalência em bezerros neonatos a dois meses de idade. A presença de *Giardia* spp. em amostras de água não pode ser relacionada com a eliminação de cistos em bovinos, devido a não identificação de assembleias, porém *C. parvum* foi identificado em amostra de água e de fezes de animais de uma mesma propriedade e com maior frequência que outras espécies. A contaminação fecal foi encontrada em grande parte das fontes de água utilizadas para consumo humano e animal nestas propriedades, havendo a necessidade de assistência à população rural quanto às medidas de manejo para reduzir a infecção nos animais e para preservação de nascentes e tratamento da água antes do consumo. As evidências encontradas são suficientes para demonstrar a carência existente no sistema de abastecimento de água de populações rurais e o iminente risco de saúde pública e animal.

## Referências

- ALMEIDA, A.J.; OLIVEIRA, F.C.R.; TEIXEIRA, C.S. Risco relativo da infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* em bezerros bovinos no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n.1, p. 243-248, 2008.
- AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública**, v.37(4), p.510-514, 2003.
- ANDRADE, J.; SANQUETTA, C. R.; UGAYA, C. Identificação de áreas prioritárias para recuperação da mata ciliar na UHE Salto Caxias. **Espaço Energia**, v. 3, p. 6-13, 2005.
- APHA - American Public Health Association. **Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater**. 21 ed. Washington: APHA, 2005.
- APPELBEE, A. J.; FREDERICK, L. M.; HEITMAN, T. L.; OLSON ME. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beefcalves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 11, p. 289–294, 2003.

- BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - An update 2004 e 2010. **Water Research**, v. 45, p. 6603-6614, 2011.
- BRANCO, N.; LEAL, D. A. G.; FRANCO, R. M. B. A Parasitological Survey of Natural Water Springs and Inhabitants of a Tourist City in Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.5, p.410-417, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 2011. n. 239, Seção 1, página 39.
- BRASIL, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Pesquisa nacional por amostras de domicílio – PNAD**, 2012. Rio de Janeiro: Diretoria de Pesquisa e Coordenação de Trabalho e Rendimento, 2012. 132p.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. **Manual prático de análise de água**. Ed.4. Brasília: FUNASA, 150p, 2013.
- BUDU-AMOAKO, E.; GREENWOOD, S. J.; DIXON, B. R.; BARKEMA, H.W.; MCCLURE, J. T. Giardia and Cryptosporidium on dairy farms and the role these farms may play in contaminating water sources in Prince Edward Island, Canada. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p. 668–673, 2012.
- CACCIÒ, S.M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 160, p. 75–80, 2008.
- CACCIÒ, S. M.; SPRONG, H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 107-112, 2010.
- CAMA, V.; GILMAN, R.H.; VIVAR, A.; TICONA, E.; ORTEGA, Y.; BERN, C.; XIAO, L. Mixed Cryptosporidium infections and HIV. *Emerging Infectious Disease*, v. 12, p. 1025–1028, 2006.
- CANTUSIO-NETO R.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água em Campinas, São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 18, p. 52–59, 2004.
- CAPP, N.; AYACH, L. R.; SANTOS, T. M. B.; GUIMARÃES, S. T. L. Qualidade da água e fatores de contaminação de poços rasos na área urbana de Anastácio (MS). **Geografia Ensino e Pesquisa**, v. 16, n. 3, p. 77-91, 2012.
- CARDOSO, J. M. S.; SILVEIRA, F. L.; ARAÚJO, A. J. U. S.; DE CARVALHO, J. C.C.; KANAMURA, H. Y. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 239-242, 2008.

CHALMERS, R. M.; SMITH, R.; ELWIN, K.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; GILES, M. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004–2006. **Epidemiology and Infection**, v. 139, p. 700–712, 2011.

CLASEN, T.; SCHMIDT, W.P.; RABIE, T.; ROBERTS, I.; CAIRNCROSS, S. Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 337, p. 334-782, 2007.

COKLIN, T.; FARBER, J.; PARRINGTON, L.; DIXON, B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 297–305, 2007.

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

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p: 624-629, 2005.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 260–266, 2007.

FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, M.; ZHANG, X.; FAYER, R.; GATEI, W.; CAMA, V. L. X.; Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 1–9, 2007.

FEITOSA, F. L. F.; SHIMAMURA, G. M.; ROBERTO, T.; MEIRELE, M. V.; NUNES, C. M.; CIARLINI, P. C.; BORGES, A. S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 189-193, 2004.

FEWTRELL, L.; KAUFMANN, R.B.; KAY, D.; ENANORIA, W.; HALLER, L.; COLFORD, J.M. Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhea in less developed countries: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Disease**, v. 5, n. 1, p. 42-52, 2005.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 9, n. 4, p. 36-43, 2007.

FOLLET, J.; GUYOT, K.; LERUSTE, H.; FOLLET-DUMOULIN, A.; HAMMOUMAGHELBOUN, O.; CERTAD, G.; DEI-CAS, E.; HALAMA, P. *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. **Veterinary Research**, v. 42, n. 116, p. 1-8, 2011.

GEURDEN, T.; BERKVEN, D.; MARTENS, C.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. **Parasitology**, v. 134, n. 14, p. 1981-1987, 2007.

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 98-106, 2010.

GEURDEN, T.; VANDERSTICHEL, R.; POHLE, H.; EHSAN, A.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; MORGAN, E.R.; CAMUSET, P.; CAPELLI, G.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E.; A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. **Veterinary Parasitology**, v.190, p. 383–390, 2012.

HELLER, L.; BASTOS, R. K. X.; VIEIRA, M. B. C. M.; BEVILACQUA, P. D.; DE BRITO, L. L. A.; MOTA, S. M. M.; OLIVEIRA, A. A.; MACHADO, P. M.; SALVADRO, D. P.; CARDOSO, A. B.. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia & Serviços de Saúde**, v. 13, p. 79-92, 2004.

HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, n. 3-4, p. 594-596, 1981.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L.; The sedimentation-concentration method in shistosomiasis mansoni. Puerto Rico. **Journal of Public Health**, v. 9, p.281-298, 1934.

HOPKINS, R. M.; MELONI, B. P.; GROTH, D. M.; WETHERALL, J. D. et al. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 44–45, 1997.

HUETINK, R. E. C.; VANDER GIESSEN, J. W. B.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 53-67, 2001.

JACKSON, S. G.; GOODBRAND, R. B.; JOHNSON, R. P.; ODORICO, V. G.; ALVES, D.; RAHN, K.; WILSON, J. B.; WELCH, M. K.; KHAKIRIA, R. Escherichia coli 0157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. **Epidemiology and Infectious**, v. 120, p.17-20, 1998.

JOVENTINO, E. S.; SILVA, S. F.; ROGERIO, R. F.; FREITAS, G. L.; XIMENES, L. B.; MOURA, E. R. F. Comportamento da diarreia infantil antes e após consume de água pluvial em município do semiárido brasileiro. **Texto e Contexto – Enfermagem**, v. 19, n. 4, p. 691-699, 2010.

KARANIS, P.; KOURENT, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, n.1, p. 1-38, 2007.

KATO, K.; MIURA, M. Comparative examinations. **Japanese Journal of Parasitology**, v.3, p. 35, 1954.

KATZ, N.; COELHO, P. M. Z.; PELLEGRINO, J. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Shistosoma mansoni* eggs added to human feces. **Journal of Parasitology**, v.56, p.1032-1033, 1970.

LANGONI, H.; LINHARES, A. C.; DE ÁVILA, F. A.; SILVA, A. V.; ELIAS, A. O. Contribuição ao estudo da etiologia das diarréias em bezerros de aptidão leiteira no Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 313-319, 2004.

LIMA, R. C. A.; AQUINO, M. C. C.; INÁCIO, S. V. I.; VIOL, M. A.; ZUCATTO, A. S.; NETO, L. S.; OLIVEIRA, B. C. M.; VASCONCELOS, E. N.; BRESCIANI, K. D. S.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em bezerros (*Bos taurus* e *Bos indicus*) no município de Formiga, Minas Gerais – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3747-3754, 2013.

LUTZ, A. O *Shistosomum mansoni* e a shistosomose, segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p.121-155, 1919.

MARTINS-VIEIRA, M. B. C.; BRITO, L. A. L.; HELLER, L. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerro infectado experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1454-1458, 2009.

MCALLISTER, T. A.; OLSON, M. E.; FLETCH, A.; WETZSTEIN, M.; ENTZ, T. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p. 47-55, 2005.

MEIRELES, M. V. Cryptosporidium infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p.197–204, 2010.

MEIRELES, M. V.; DE OLIVEIRA, F. P.; TEIXEIRA, W. F.; COELHO, W. M.; MENDES, L. C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 949-951, 2011.

MOHAMMED, H. O.; WADE, S. E.; SCHAAF, S. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 1-13, 1999.

MUNIZ NETA, E. S.; SAMPAIO, D. C.; GALVÃO, G. S.; MUNHOZ, A. D. Comparação das técnicas de Ziehl-Neelsen modificada e contraste de fase na detecção de oocistos do gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em bovinos assintomáticos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, n. 4, p. 201-204, 2010.

NISHI, L.; BERGAMASCO, R.; TOLEDO, M. J. O.; FALAVIGNA, D. L. M.; GOME, M. L.; MOTA, L. T.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in the Ivaí Indigenous Land, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.9, n. 5, p. 543-547, 2009.

O'HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R. C. Prevalence and genotypic characterization of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 193–200, 2000.

O'HANDLEY, R. M.; CERI, H.; ANETTE, C.; OLSON, M.E. Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 89–98, 2003.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P. G.; PACHECO, M. D.; MASCARINI, L. M.; RIBEIRO, M. G.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D. T.; BARROS, B. J. P.; BORGES, A. S. Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 419-424, 2007.

ORTOLANI, E. L.; SOARES, P. C. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis em becerros de rebaños lecheros. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 58, p. 122-127, 2003.

OUCHENE, N.; OUCHENE-KHELIFI, N. A.; ZEROUAL, F. BENAKHLA, A.; ADJOU, K. Study of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp. infetions in dairy cattle in Algeria. **Journal of Parasitology and Vector Biology**, v. 6, n. 4, p. 61-65, 2014.

PAZ E SILVA, F. M.; LOPES, R. S.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Genetic characterization of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 59, n. 1, p. 15-20, 2012.

PAZ E SILVA, F. M.; LOPES, R. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. P. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 22-28, 2013.

PINFOLD, J. V. Faecal contamination of water and fingertip-rinses as a method for evaluating the effect of low-cost water supply and sanitation activities on faeco-oral disease transmission. II A Hygiene intervention study in rural northeast Thailand. **Epidemiology and Infection**, v. 105, n. 2, p. 377-389, 1990.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. GENOTYPE AND SUBTYPE ANALYSES OF *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. **Veterinary Parasitology**, V. 146, N.3-4, P. 357-362, 2007.

PRÜSS, A.; KAY, D. FEWTRELL, L.; BARTRAM, J. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. **Environmental Health Perspectives**, v.110, n.5, p.537-542, 2002.

QUILEZ, J.; SANCHEZ-ACEDO, C.; CACHO, E-DEL.; CLAVEL, A.; CAUSAPE, A. C.; DEL-CACHO, E. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (Northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 66, p. 139–146, 1996.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M.; Zoonotic Potential of *Giardia*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 943-956, 2013.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, 2014.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 103-117, 2004.

- SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.15–23, 2008.
- SANTÍN, M.; TROUT, J. M., FAYER, R. A longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 40-45, 2009.
- SEVÁ, A. P.; FUNADA, M.R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 249-253, 2010.
- SILVA, C. V.; HELLER, L.; CARNEIRO, M. Cisternas para armazenamento de água de chuva e efeito na diarreia infantil: um estudo na área rural do semiárido de Minas Gerais. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 17, n. 4, p. 293-400, 2012.
- SISCHO, W. M.; ATWILL, E. R.; LANYON, L. E.; GEORGE, J. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States, **Preventive Veterinary Medicine**, v. 43, p. 253-267, 2000.
- SMITH, R. P.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; CHENEY, T.; GILES, M. Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3–4, p.111–119, 2014.
- SOUZA, J. C. P.; LOPES, C. W. G. Criptosporidiose em bezerros de rebanhos da bacia leiteira Sul-Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 33-36, 1995.
- SWAFFER, B. A.; VIAL, H. M.; KING, B. J.; DALY, R.; FRIZENSCHAF, J.; MONIS, P. T. Investigating sourcewater *Cryptosporidium* concentration, species and infectivity rates during rainfall-runoff in a multi-use catchment. **Water Research**, v. 67, p. 30-320, 2014.
- TAYLOR, R.; CRONIN, A.; PEDLEY, S.; BARKER, J.; ATKINSON, T.; The implications of groundwater velocity variations on microbial transport and wellhead protection – review of field evidence. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 17-27, 2004.
- THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis, **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 15-35, 2004.
- THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v.58, p.69-137, 2004.
- THOMPSON, H. P.; DOOLEY, J. S.; KENNY, J.; MCCOY, M.; LOWERY, C. J.; MOORE, J. E.; XIAO, L. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. **Parasitology Research**, v. 100, n. 3, p. 619-624, 2007.
- TROUT, J. M.; SANTÍN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.179–186, 2004.

TROUT, J. M.; SANTÍN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.177–183, 2005.

TROUT, J.M., SANTÍN, M., GREINER, E., FAYER, R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in 1–2 year old dairy cattle. **Veterinary Parasitology** v.140, p.217–222, 2006.

TROUT, J.M., SANTÍN, M., FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.205–209, 2007.

VARGAS JÚNIOR, F. S.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ADRIEN, M. L.; FISS, L.; MOLARINHO, K. R.; SOARES, M. P.; SCHILD, A. L.; SALLIS, E. S.V. Surto de criptosporidiose em bezerros no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 749-752, 2014.

VAZ, L.; ORLANDO, P. H. K. Importância das matas ciliares para manutenção da qualidade das águas de nascentes: diagnóstico do ribeirão Vai-Vem de Ipameri – GO. In: **XXI Encontro Nacional de Geografia Agrária, 21., 2012**, Uberlândia. **Anais...Uberlândia: UFU, 2012.** p. 1-20.

VESEY, G.; SLADE, J. S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; DENNIS, P. J. L.; FRICKER, C. R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 82-86, 1993.

WELLS, B.; SHAW, H.; HOTCHKISS, E.; GILRAY, J.; AYTON, R.; GREEN, J.; KATZER, K.; WELLS, A.; INNES, E. Prevalence, species identification and genotyping *Cryptosporidium* from livestock and deer in a catchment in the Cairngorms with a history of a contaminated public water supply. **Parasites and Vectors**, v. 8, p.1-13, 2015.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Diarrhea: Why children are still dying and what can be done.* Geneva: WHO. 2009. 58p.

WILKES, G.; RUECKER, N. J.; NEUMANN, N. F.; GANNON, V. P.; JOKINEN, C.; SUNOHARA, M.; TOPP, E.; PINTAR, K. D.M.; EDGE, T. A.; LAPEN, D. R. Spatio temporal analysis of *Cryptosporidium* species/genotypes and relationships with other zoonotic pathogens in surface water from mixed-use watersheds. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 434–448, 2013.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, v. 124, 80–89, 2010.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied Environment Microbiology**, v. 65, p.3386–3391, 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. 72–79. 2004.

ZINTL, A.; PROCTOR, A. F.; READ, C.; DEWAAL, T.; SHANAGHY, N.; FANNING, S.; MULCAHY, G. The prevalence of Cryptosporidium species and subtypes in human faecal samples in Ireland. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p. 270–277, 2009.

#### 4 ARTIGO B: NOTA CIENTÍFICA

### ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS EM ÁGUA E LEITE DE PROPRIEDADES DE BOVINOCULTURA LEITEIRA INSERIDAS EM REGIÃO DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA.

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a presença de organofosforados e carbamatos em amostras de água e leite de propriedades de bovinocultura leiteira inseridas em uma região agrícola e investigar possíveis fatores associados. Amostras de leite do tanque de resfriamento e de água foram coletadas em 55 propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR. A pesquisa de organofosforados e carbamatos foi realizada pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada. Fatores relacionados a produção, lavoura e uso de praguicidas, ectoparasiticidas e estrutura de proteção de fontes foram investigados por questionário epidemiológico e a análise estatística foi realizada pelo teste de qui quadrado e exato de Fisher. Organofosforado foi identificado em 51% das amostras de leite e 31% de água, carbamato foi identificado em 23,6% das amostras de leite e 9,1% de água. A cultura de milho foi a mais cultivada nas propriedades seguida pela cultura de soja. Organofosforados se destacaram entre os mais utilizados como praguicidas nas lavouras e ectoparasiticidas nos animais. A análise estatística demonstrou associação entre organofosforado no leite e seu uso na lavoura e com sua presença na água; também demonstrou associação entre organofosforado na água e seu uso na lavoura e com chuva antes da coleta. Conclui-se a alta frequência de resíduos em água e leite, principalmente de organofosforados, havendo necessidade e monitoramento de resíduos no leite, controle destes compostos na agropecuária, conscientização de produtores rurais e preservação de fontes naturais de água.

**Palavras-chave:** milho, soja, ectoparasiticidas, mata ciliar, nascentes, poço freático.

## **PESTICIDES ORGANOPHOSPHORUS AND CARBAMATES IN WATER AND MILK OF INSERTED DAIRY FARMS IN GREAT REGION AGRICULTURAL POTENTIAL.**

This study aimed to verify the presence of organophosphorus and carbamates in water samples and milk of inserted dairy farms in an agricultural region and to investigate factors associated. Amostras de leite e água foram coletadas em 55 propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, Brazil. The presence of organophosphorus and carbamates was established by thin layer chromatography. Factors related to production, type of crop, use of pesticides and ectoparasiticides and structure of water sources were investigated by epidemiological questionnaire. Statistical analysis was performed using chi-square test and Fisher's exact test. Organophosphorus and carbamate were identified in 51% and 23.6% of milk samples and in 31% and 9.1% of water samples respectively. The corn crop was the most cultivated in farms followed by soybeans. Organophosphorus stood out among the most used as pesticides in crops and animals ectoparasiticides. Statistical analysis showed association between organophosphorus in milk and its use in crop and their presence in water; also showed association between organophosphorus in the water and its use in crop and rain before collection. In conclusion, pesticide residues are present in water and milk, especially organophosphorus. There is need for residues monitoring in milk, control of these compounds in agriculture, awareness of farmers to use pesticides and preservation of natural water sources

**Palavras-chave:** corn, soybean, ectoparasiticides, riparian forest, springs, groundwater

### **Introdução**

A chamada “Revolução Verde”, que ocorreu entre os anos 1940 e 1970, teve como objetivo aumentar a produção de alimentos por meio da tecnificação da produção rural, colaborando para o aumento progressivo do uso de produtos químicos no setor agropecuário (DELGADO et al., 2001; MOLENTO, 2009). Em 2008 o Brasil utilizou mais de 700.000 toneladas de agrotóxicos e tornou-se o maior consumidor mundial (PEDLOWSKI, 2012). Entre 2001 e 2011, no Brasil, foram registrados 62.056 casos de intoxicação por agrotóxicos de uso na agricultura e 1.908 óbitos, dos quais 16.408 casos e 405 óbitos ocorreram na região Sul do país (FIOCRUZ, 2014).

A geração de despejos domésticos ou industriais e a aplicação de agrotóxicos nos cultivos contribui para a contaminação das águas, o que afeta sua qualidade, sendo este um dos problemas ambientais mais graves atualmente (LOSI-GUEMBAROVSKI et al., 2004; MARQUES; COTRIM; PIRES, 2007). Além da contaminação no meio ambiente, os resíduos de agrotóxicos podem chegar aos humanos por meio da cadeia alimentar, uma vez que pastagem, rações, cereais e o próprio meio ambiente, além do uso de produtos

veterinários no gado, são importantes fontes de contaminação do leite (FONTENELE et al., 2010). Entre os diferentes defensivos agrícolas, a venda de inseticidas no Brasil tem aumentado nos últimos anos, atingindo 40% em 2013 (SINDIVEG, 2013). Organofosforados e carbamatos são inseticidas amplamente utilizados na agropecuária e responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural (NERO et al., 2007). Os efeitos agudos da intoxicação por estes compostos, relacionados à inibição da acetilcolinesterase, são os mais frequentes e estão bem estabelecidos (COLOSIO et al., 2009). Porém alguns estudos evidenciam déficits neurológicos e neurocomportamentais em decorrência da exposição crônica a organofosforados (ROSS et al., 2013; HERNANDEZ et al., 2015).

Considerando que organofosforados e carbamatos são intensamente utilizados para controle de pragas em plantações e de parasitas nos animais e, conhecendo os efeitos negativos destes praguicidas à saúde da população, este estudo teve o objetivo de avaliar a presença de organofosforados e carbamatos em amostras de água e leite de propriedades leiteiras inseridas em uma região de grande potencial agrícola, além de investigar possíveis fatores de associados.

## **Material e Métodos**

Este estudo foi realizado em 55 pequenas propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, região de grande produção agrícola, principalmente de milho e soja (PARANÁ, 2015). Como critério de inclusão, admitiu-se pequenas propriedades leiteiras de produção familiar assistidas pelo Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER). Desta forma, amostras de leite e água foram coletadas de todas as propriedades assistidas pela EMATER de Campo Mourão.

Em cada propriedade foram coletadas uma amostra de leite (50mL) do tanque de resfriamento, após homogeneização, e uma de água (50mL) diretamente na fonte ou, na impossibilidade desta, na torneira da sala de ordenha. Todas as amostras foram acondicionadas em frascos estéreis e transportadas em refrigeração.

A pesquisa de organofosforados (OF) e carbamatos (CB) nas amostras de água e leite foi realizada pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (AOAC, 2003). Para a extração foram utilizados sulfato de sódio 30%, ácido fórmico 85% e acetona P.A e, para a limpeza, éter de petróleo e sulfato de sódio anidro. A fase móvel utilizada foi uma solução de clorofórmio e acetona (7:3). A leitura foi feita em placas de vidro preparadas com sílica gel 60G (Merck®) 0,25mm de espessura. A coloração das placas foi realizada com

rodamina, para leitura de OF, nitroanilina e hidróxido de sódio 40%, para leitura de CB. Como padrões de leitura foram utilizados Dimetoato e Aldicarb.

Os proprietários ou responsáveis pela propriedade foram entrevistados por meio de questionário epidemiológico contendo variáveis de exposição, as quais foram analisadas quanto à associação com a presença de OF e CB em amostras de água e leite da propriedade. As variáveis investigadas tinham relação com o tipo de lavoura da propriedade, tipo de lavoura na propriedade vizinha, inseticidas e endectocidas utilizados na lavoura e nos animais respectivamente, a origem da água de consumo humano e animal, estrutura de proteção de fontes de água e presença de mata ciliar. A comparação das frequências dos resultados obtidos nas análises de leite e água e das variáveis do questionário epidemiológico foi realizada por meio do teste estatístico de qui quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher no programa EpiInfo<sup>TM</sup> 3.5.2 e adotou-se nível de significância de 5%.

## **Resultados**

As propriedades possuíam, em média, 23,2 vacas em lactação e produziam diariamente aproximadamente 230,7 litros de leite. O leite era fornecido para indústrias da microrregião de Campo Mourão e da região norte do Paraná e também era utilizado para consumo próprio e para produção e comercialização de queijos. Resíduos de OF e CB foram identificados em 41 (74,5%) amostras de leite analisadas, sendo 28 (51%) positivas para OF e 13 (23,6%) para CB. Dentre estas, 10 (18,2%) amostras de leite foram positivas para os dois grupos químicos.

Entre as amostras de água analisadas, 17 (31%) apresentaram resultado positivo para OF e cinco (9,1%) para CB (Tabela 1). Apenas uma (1,82%) propriedade apresentou amostra de água positiva para os dois resíduos.

A cultura de milho foi a mais frequente nas propriedades estudadas (85,5%), seguida pela cultura de soja (18,2%). (Tabela 2). Entre os produtores que cultivavam milho, 16 (34%) utilizavam OF e 8 (17%) CB. Entre os produtores que cultivavam soja, 7 (70%) utilizavam OF e nenhum CB (Tabela 2). Entre os OF, o clorpirifós foi o único princípio ativo utilizado e entre os CB, tiodicarbe e metomil.

Tabela 1. Prevalência de resíduos de organofosforados e carbamatos em amostras de água de 55 propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014.

Origem da Água	Total de Amostras (%)	Amostras Positivas (%)	
		Organofosforados	Carbamatos
Nascente	31	9	2
Poço Artesiano	15	4	1
Poço Freático	7	4	2
Rio	2	0	0
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>17 (31%)</b>	<b>5 (9,1)</b>

Tabela 2. Principais tipos de culturas agrícolas e número de propriedades que utilizam organofosforados e carbamatos nestas culturas em 55 propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012 a 2014.

Cultura	Nº de Propriedades (%)	Inseticidas (Grupos Químicos)		
		Organofosforado (%)	Carbamato (%)	Outros (%)
Milho	47 (85,5)	16 (34)	8 (17)	22 (46,8)
Soja	10 (18,2)	7 (70)	0	3 (30)
Café	7 (12,7)	0	0	7
Mandioca	6 (11)	0	0	6
Frutas	3 (5,5)	0	0	2
<b>Total</b>	<b>55*</b>	<b>23</b>	<b>8</b>	<b>40</b>

\* Este total não corresponde à soma das propriedades porque algumas produziam mais de um tipo de cultura.

Neste estudo, de 32 produtores que relataram utilizar ectoparasiticidas nas vacas em lactação, oito (25%) utilizavam compostos classificados no grupo dos OF, os quais representaram o segundo grupo mais utilizada ficando atrás apenas dos piretróides. Nenhum produtor utilizava ectoparasiticidas do grupo dos carbamatos.

A análise estatística da associação entre variáveis de exposição e presença de OF no leite e na água está exposta na Tabela 3. A presença de OF no leite não teve associação estatística com o uso deste composto como ectoparasiticidas nos animais, porém em propriedades que utilizam estes compostos foi encontrada maior frequência no leite (50%) que em propriedades que não utilizam (33%). Apesar de não haver associação com outras variáveis estudadas observou-se maior frequência de OF na água de propriedades cuja nascente não possuíam mata ciliar (40%) com relação às nascentes que possuíam (23,8%). A presença de CB no leite e na água não teve associação significativa com as variáveis pesquisadas.

Tabela 3. Variáveis com associação estatística significativa com a presença de organofosforados em 55 amostras de leite e água de propriedades leiteiras de Campo Mourão e Araruna, PR, 2012-2014.

Variáveis	Organofosforado no Leite		p
	Amostras Positivas/Total (%)		
<b>Lavoura da Propriedade</b>			
Misto**	9/10 (90)	0,0231*	
Milho	16/37 (43,2)		
<b>Tipo de Lavoura na Propriedade Vizinha</b>			
Milho	6/22 (27,3)	0,0066	
Soja	7/8 (87,5)		
Misto**	15/25 (60)		
<b>Uso de Organofosforado na Lavoura da Propriedade</b>			
Sim	12/16 (75)	0,0464	
Não	16/39 (41)		
<b>Presença de Organofosforado na Água</b>			
Sim	16/17 (94,1)	0,0001	
Não	12/38 (31,6)		
Variáveis	Organofosforado na Água		p
	Amostras Positivas/Total (%)		
<b>Uso de Organofosforado no Milho</b>			
Sim	10/16 (62,5)	0,0019*	
Não	4/29 (13,8)		
<b>Uso de Organofosforado na Lavoura da Propriedade</b>			
Sim	10/16 (62,5)	0,0041*	
Não	7/39 (17,9)		
<b>Chuva antes da coleta (até 48 horas)</b>			
Sim	11/21 (52,4)	0,0161	
Não	6/34 (17,6)		

p: probabilidade; \* Teste Exato de Fisher. \*\* Misto = Milho e Soja.

## Discussão

A frequência de OF (51%) em amostras de leite de nosso estudo foi semelhante a encontrada em diferentes regiões e a de CB (23,6%) foi inferior. Nero et al. (2007) identificaram uma variação de 42,9 a 95,9% de amostras positivas para OF e 55,1% a 85,1% para CB em 209 amostras de leite obtidas em Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR e Botucatu, SP. Porém, estudos realizados em Pernambuco, na região de Londrina, PR e em Presidente Prudente, SP identificaram prevalência inferior à

encontrada em nosso estudo (FAGNANI et al., 2011; SILVA et al., 2014). Apesar da técnica de CCD ser qualitativa, é importante destacar que, mesmo em baixas concentrações, a presença destes resíduos no leite representa riscos à saúde pública, uma vez que outros alimentos que compõem o cardápio humano, como frutas e legumes, são passíveis de contaminação (BRASIL, 2013). A somatória da quantidade de resíduos em diferentes alimentos ingeridos em um dia pode ultrapassar o limite considerado seguro (FAGNANI et al., 2011). Além disso, estudos têm demonstrado associação entre exposições crônicas a baixas doses de compostos a base de OF e sintomas neuropsíquicos e à doenças degenerativas do sistema nervoso central (GENIUS, 2008; COLOSIO et al., 2009; ROSS et al., 2013)

O cultivo de milho e soja foram os mais frequentes na região estudada, onde também foi observado o uso de OF e CB nas lavouras. O Paraná é o segundo maior produtor brasileiro de grãos (BRASIL, 2014). Municípios da microrregião de Campo Mourão fazem parte do grupo de municípios paranaenses com maior produção de milho e soja (PARANÁ, 2014). Estudo realizado na região de Cascavel, oeste do Paraná, as culturas para as quais mais se comercializavam agrotóxicos eram soja e milho, de forma que OF e CB estavam entre os inseticidas mais comercializados para estes cultivos (COSMANN; DRUNKLER, 2012). Em nosso estudo a presença de OF nas amostras de leite foi associada a lavouras mistas de milho e soja na propriedade estudada e ao uso de OF nestes cultivos. Em propriedades leiteiras, o milho é cultivado principalmente para produção de silagem e ração para complementação da alimentação animal; apesar de diferentes estudos experimentais não conseguirem demonstrar a passagem do praguicida da alimentação animal para o leite, sugerem que o cultivo tratado com praguicidas pode ser fonte de contaminação para os animais e, conseqüentemente, para o leite (GONZÁLES-RODRIGUES, 2005; BASTOS et al., 2011).

A associação com o uso de OF nos animais não foi significativa, porém houve maior frequência de amostras positivas para este inseticida em propriedades que os utilizam como ectoparasiticidas em vacas em lactação (50%) com relação às que não utilizavam (33%). Netto et al. (2005) realizaram levantamento de fármacos utilizados em rebanhos leiteiros no Paraná e demonstraram que os OF se destacam no grupo dos antiparasitários mais utilizados, da mesma forma que em nosso estudo. Estes compostos, juntamente com os piretróides, são bastante indicados no

controle de ectoparasitas em bovinos leiteiros devido ao menor período residual, comparado aos outros produtos (PRATA; FURLONG, 2009).

A presença de OF e CB nas amostras de água (31% e 9,1%) foi inferior à identificada no leite (51% e 23%), estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura uma vez que a concentração de praguicidas na água é mais baixa, devido aos efeitos de diluição e à alta lipossolubilidade e rápida hidrólise dos OF no ambiente (XAVIER; SPINOSA, 2008). Porém a concentração destes compostos na água pode aumentar nos períodos de chuva, principalmente após a aplicação dos produtos nas lavouras (DORES et al., 2001). Em nosso estudo foi identificada associação significativa entre a presença de OF na água e chuva nas últimas 48 horas. As chuvas são importantes vias de contaminação ambiental por agrotóxicos, pois ela facilita o escoamento superficial destes resíduos. Além disso, estes produtos são voláteis e podem se acumular em nuvens e precipitar (GRIZA; ORTIZ; GEREMIAS, 2008). Estudo realizado no Mato Grosso demonstrou a presença de agrotóxicos em mais da metade das amostras de chuva coletadas e, em aproximadamente 20% das amostras, foi identificado clorpirifós (MOREIRA et al., 2012). Este é o ingrediente ativo, classificado como OF, utilizado pelos produtores rurais de nosso estudo. Hernandez et al. (2015) demonstrou que exposições repetidas a clorpirifós resultou em alterações persistentes no transporte axonal em cérebro de ratos, o que pode prejudicar a função neuronal, levando a déficits neurológicos a longo prazo.

A presença de OF nas amostras de água foi associada ao uso deste produto nas lavouras. Quando aplicados de forma inadequada, essas substâncias podem contaminar cursos de água superficiais por meio do escoamento superficial ou chuvas e também podem contaminar poços subterrâneos devido à capacidade de lixiviação, dependendo do tipo de solo, relevo e vegetação (FLORES et al., 2004; VEIGA et al., 2006). Em nosso estudo, houve maior frequência de OF e CB nas amostras de poços freáticos (57,1%). Como toda a região é produtora de milho e soja, é difícil confirmar a origem da contaminação, uma vez que os sistemas hídricos são intercomunicáveis e a presença do agrotóxico em um sistema pode ser resultado da contaminação de um local distante, onde foram originalmente aplicados (GRIZA; ORTIZ; GEREMIAS, 2008).

Quando analisadas separadamente, as nascentes que não são protegidas por mata ciliar apresentaram maior frequência de contaminação (40%) do que as nascentes protegidas (23,8%). A destruição da cobertura vegetal dos solos para plantio, e a não-preservação das matas ciliares e das vegetações protetoras de

nascentes, são responsáveis por grande parte dos problemas com os recursos hídricos (ROSA, 1998). As matas ciliares atuam como filtros e ajudam reter defensivos agrícolas, poluentes e sedimentos que seriam transportados para água, podendo afetar a quantidade e qualidade da água, além da fauna aquática (ANDRADE; SANQUETTA; UGAYA, 2005). Vaz e Orlando (2012) observaram elevados níveis de turbidez e cor e baixíssimo pH em nascentes com cobertura vegetal degradada ou ausente, a maioria muito próxima a áreas de pastagem e culturas anuais.

Em conclusão, pequenas propriedades leiteiras ainda utilizam intensamente compostos do grupo dos organofosforados como praguicidas em lavouras e como ectoparasiticidas em vacas leiteiras. Há presença de resíduos de organofosforados e carbamatos em leite e água de propriedades leiteiras circundadas por propriedades agrícolas e, embora estes resíduos não tenham sido quantificados, a alta frequência identificada, principalmente no leite, alerta para a necessidade de monitoramento constante de resíduos neste alimento, maior controle destas substâncias na agropecuária e conscientização de produtores rurais quanto ao uso destes produtos e quando à recuperação e preservação de nascentes.

## Referências

- ANDRADE, J.; SANQUETTA, C. R.; UGAYA, C. Identificação de áreas prioritárias para recuperação da mata ciliar na UHE Salto Caxias. **Espaço Energia**, v. 3, p. 6-13, 2005.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2003. 141 p.
- BASTOS, L. H. P.; CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A.W.; JACOB, S. C. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite por agrotóxicos e estudo de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 19, n. 1, p. 51-60, 2011.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, 2013. Brasília: Gerência Geral de Toxicologia, 2013. 44p.
- BRASIL, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA, 2014. Rio de Janeiro: Diretoria de Pesquisa e Coordenação de agropecuária, 2014. 87p.
- COLOSIO, C.; TIRMANI, M.; BRAMBILLA, G.; COLOMBI, A.; MORETTO, A. Neurobehavioural effects of pesticides with special focus on organophosphorus

compounds: which is the real size of the problem? **NeuroToxicology**, v. 30, p. 1155-1161, 2009.

COSMANN, N. J.; DRUNKLER, D. A. Agrotóxicos utilizados nas culturas de milho e soja em Cascavel, PR. **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**, v. 2, n. 6, p. 15-32, 2012.

DELGADO, C.; ROSEGRANT, M.; STEINFELD, H.; EHUI, S.; COURBOIS, C. Livestock to 2020: the next food revolution. **Outlook on Agriculture**, v. 30, n. 1, p. 27-29, 2001.

DORES, E. F. G. C.; FREIRE, E. M. L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar **Quim. Nova** 2001, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

FAGNANI, R.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; SEIXAS, F. N.; BELOTI, V. Análise de riscos de praguicidas em leite cru e caracterização do uso em propriedades leiteiras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 383, p. 20-26, 2011.

FIOCRUZ. **Sistema Nacional de Informações Toxicológicas – SINITOX**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>, acesso em 08 jan. 2015.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111-124, 2004.

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO JÚNIOR, R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

GENIUS, J. S. Toxic auses of mental illness are overlooked. **NeuroToxicology**, v. 29, p. 1147-1149, 2008.

GONZÁLEZ-RODRIGUES, F.; LIÉBANAS, A. J. F.; FRENCH, G. A.; LÓPEZ, S. J. F. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 164-172, 2005.

GRIZA, F. T.; ORTIZ, K. S.; GEREMIAS, D. Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais do município de Rondinha – Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.31, n. 7, p. 1631-1635, 2008.

HERNANDEZ, C. M.; BECK, W. D.; NAUGHTON, S. X.; PODDAR, I.; ADAM, B. L.; YANASAK, N.; MIDDLETON, C.; TERRY JUNIOR, A. V. Repeated exposure to chlorpyrifos leads to prolonged impairments of axonal transport in the living rodent brain. **NeuroToxicology**, v. 47, p. 17-26, 2015.

LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; SANTOS, F.V.; DIAS, F.L.; FREDERICO, R. G.; CÓLUD, I. M. S. Assessment of the ability of imazaquin herbicide to induce

chromosomal aberrations in vitro in cultured chinese hamster ovary cells and micronuclei in vivo in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1245–1249, 2004.

MARQUES, M. N.; COTRIM, M. B.; PIRES, M. A. F. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape, São Paulo. **Química Nova**, v.30, n. 5, p. 1171-1178, 2007.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.229-234, 2009.

MOREIRA, J. C.; PERES, F.; SIMÕES, A. C.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. C.; VIEIRA, S. N.; STRUSSMANN, C.; MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região de Mato Grosso. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1557-1568, 2012.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; FRANCO, B. D, G, M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n. 1, p. 201-204, 2007.

NETTO, D. P.; LOPES, M. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JUNIOR, M.; BOSQUIROLI, S. L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A. L.C.; VEDOVELLO FILHO, D.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P.; SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Animal Sciences Maringá**, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

PARANÁ, Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social – IPARDES. **Base de dados do Estado (BDEweb)**. Disponível em: <http://www.ipardes.pr.gov.br/imp/index.php>. Acesso em: 15/12/2014.

PEDLOWSKI, M. A.; CANELA, M. C.; TERRA, M. A. C.; DE FARIA, R. M. R.; Modes of pesticides utilization by brazilian smallholders na their implications for human health and environment. **Crop Protection**, v. 31, p. 113-118, 2012.

PRATA, M.; FURLONG, J. Carrapato e vermes: inimigos do gado e do produtor. **A Lavoura**, v.112, n. 670, p. 14-19, 2009.

ROSA, A.V. **Agricultura e meio ambiente**. São Paulo: Atual, 1998. 95p.

ROSS, S. M.; MCMANUS, I. C.; HARRISON, V.; MASON, O. Neurobehavioral problems following lowlevel exposure to organophosphate pesticides: a systematic and meta-analytic review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 21–44, 2013.

SILVA, L. C. C. BELOTI, V. TAMANINI, R. NETTO, D. P. Milk contamination by organophosphorus and carbamate residues presente in water and animal feedstuff. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 2485-2494, 2014.

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **Resultados do setor 2013**. Disponível em: < <http://www.sindiveg.org.br/imp-releases.php>>, acesso em 08 jan. 2015.

VAZ, L.; ORLANDO, P. H. K. Importância das matas ciliares para manutenção da qualidade das águas de nascentes: diagnóstico do ribeirão Vai-Vem de Ipameri – GO. In: **XXI Encontro Nacional de Geografia Agrária, 21., 2012**, Uberlândia. **Anais...**Uberlândia: UFU, 2012. p. 1-20.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

XAVIER, F. G.; SPINOSA, H. S. Toxicologia dos praguicidas anticolinesterásicos: organofosforados e carbamatos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L., PALERMONETO, J. (Org). **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. p. 291-309.

## 6 CONCLUSÃO

Coliformes totais e termotolerantes foram identificados em grande parte das amostras de água avaliadas e todos os tipos de fontes apresentaram amostras positivas, com maior frequência em nascentes e rios.

A prevalência de *Cryptosporidium* spp. no rebanho leiteiro estudado foi maior que a de *Giardia* spp. e a prevalência dos dois protozoários é maior na população de bezerros até seis meses de idade, sendo esta de risco para o parasitismo. Estes protozoários não foram identificados em fezes de humanos. Cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* spp foram identificados em amostras de água de nascentes e de rio em quantidades suficientes para causar infecção.

Em bovinos *C. parvum* foi identificado com maior frequência em todas as categorias, principalmente em bezerros com até seis meses de idade. *C. ryanae*, *C. bovis* e *C. andersoni* foram identificados com menor frequência, porém em animais com mais de dois meses. *C. parvum* também foi identificada em uma amostra de água, em cuja propriedade esta espécie também foi identificada em bezerros.

A presença de cistos de *Giardia* nas fezes de bovinos foi associada com sistemas que favorecem maior aglomeração animal. A presença de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes de bovinos foi associada com a raça de origem europeia. A presença de (oo)cistos nas fezes dos bovinos foi associada com diarreia.

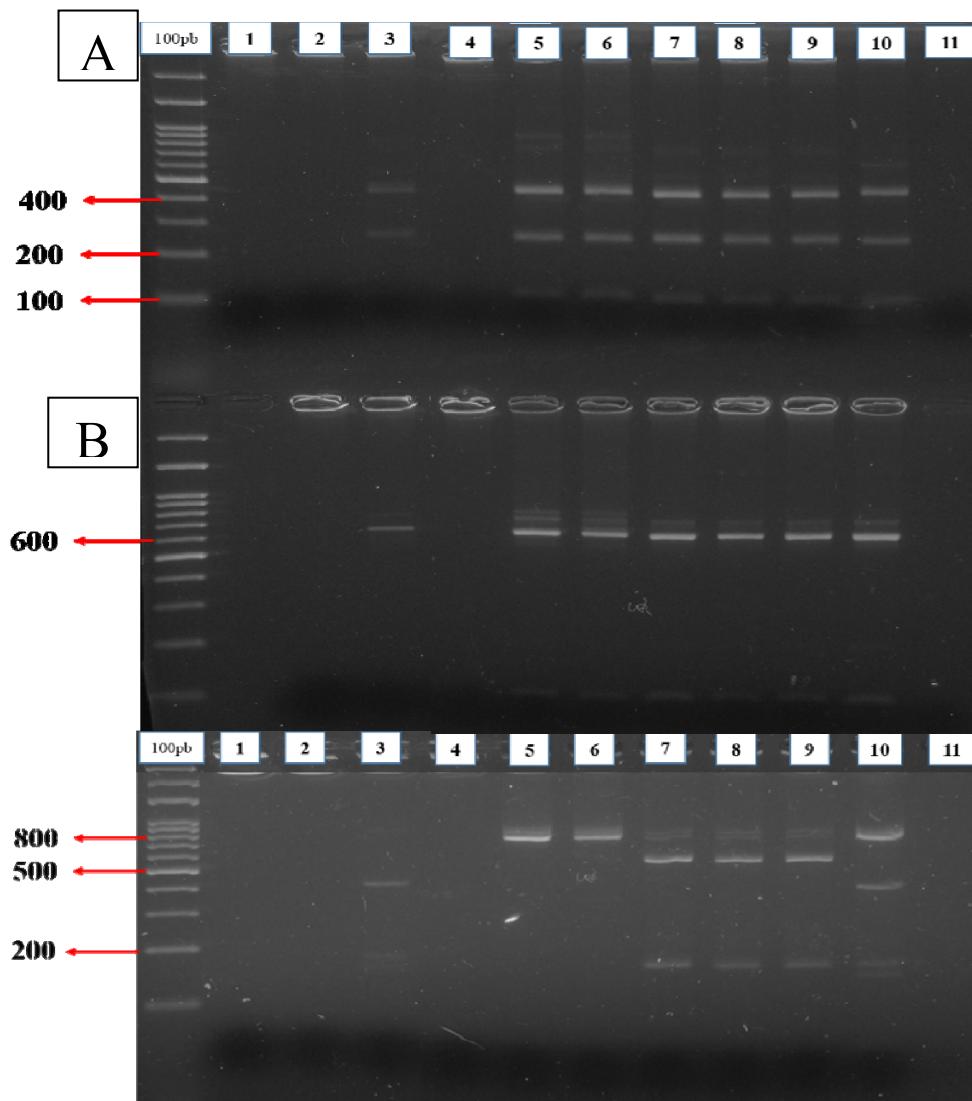
A degradação e desproteção de nascentes, turbidez e chuva foram associados à contaminação da água por coliformes de origem fecal, podendo contribuir para a contaminação por parasitos intestinais.

Há presença de resíduos de organofosforados e carbamatos no leite e na água analisados neste estudo, sendo organofosforado mais frequente. Organofosforados se destacaram como inseticidas e ectoparasiticidas utilizados nas lavouras e animais. Organofosforado no leite e na água foi associado ao seu uso na lavoura e a frequência na água é maior após períodos de chuva.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Figura 1 - Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas *SspI* (A), *AseI* (B), e *MboII* (C) em dez amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* spp. Gel de agarose 2,5% corado com Sybr Safe.



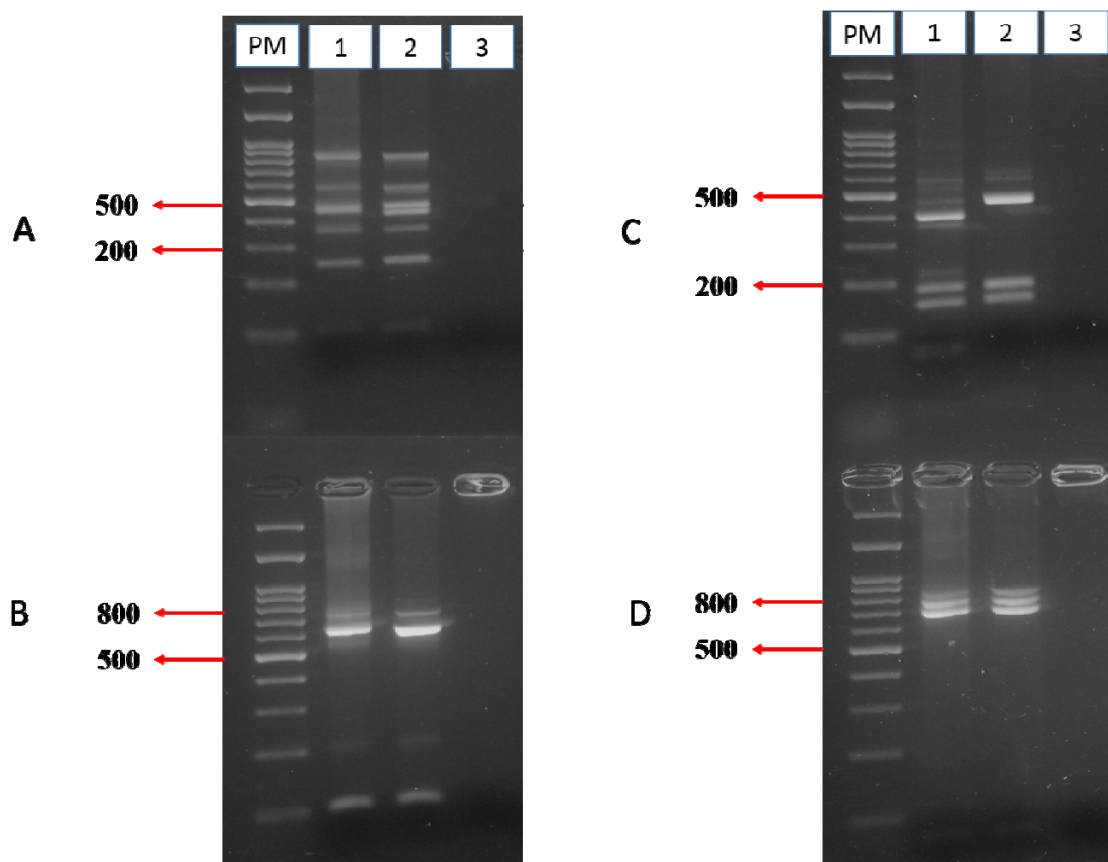
**A – *SspI*** : Coluna 3: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (449, 267, 108\*), Colunas 5 e 6: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (449, 267, 108), Colunas 7, 8 e 9: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (449, 267, 108), Coluna 10: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (449, 267, 108); \* Bandas não visualizadas.

**B – *AseI*** : Coluna 3: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (628, 115\*, 104\*), Colunas 5 e 6: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (628, 115\*, 104\*), Colunas 7, 8 e 9: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (628, 115\*, 104\*), Coluna 10: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (628, 115\*, 104\*); \* Bandas não visualizadas.

**C – *MboII***: Coluna 3: *C. bovis* (412, 185, 162); Colunas 5 e 6: *C. parvum* (770, 76\*), Colunas 7, 8 e 9: *C. parvum* (770, 76\*) e *C. ryanae* (574, 185\*) Coluna 10: *C. parvum* (770, 76\*) e *C. bovis* (412, 185, 16); \* Bandas não visualizadas.

**A, B e C**: Colunas 2, 3 e 4: amostras sem DNA; Coluna 11: controle negativo

Figura 2 - Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas *SspI* (A), *AseI* (B), *DdeI* (C) e *MboII* (D) em duas amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* spp. Gel de agarose 2,5% corado com Sybr Safe.



**A – *SspI***: Colunas 1 e 2: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (449, 267, 108) e *C. andersoni* (448, 397); **B – *AseI***: Colunas 1 e 2: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* (628, 115, 104\*) e *C. andersoni* (770, 115). **C – *DdeI***: Colunas 1 e 2: *C. parvum* (406, 201, 156, 68) e *C. andersoni* (470, 190, 178). **D – *MboII***: *C. parvum* e *C. andersoni* (770, 76); \* Bandas não visualizadas.

**Todas**: Coluna 3: controle negativo

APÊNDICE A  
Questionário Epidemiológico - Humanos

Propriedade: \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: ( )F ( )M

1 – Realiza a ordenha e manejo dos animais: ( ) Sim ( ) Não

2 – Tem contato direto com animais de produção: ( ) Sim ( ) Não

3 – Tem contato direto com outros animais (Cães e gatos): ( ) Sim ( ) Não

4 – Animais dentro de casa ( ) Sim ( ) Não

5 – Frequência de higienização das mãos:

5.1- Após manejo dos animais: ( ) Sempre ( ) Frequentemente ( ) Raramente ( ) Nunca

5.2 – Antes de comer: ( ) Sempre ( ) Frequentemente ( ) Raramente ( ) Nunca

5.3 – Após ir ao banheiro: ( ) Sempre ( ) Frequentemente ( ) Raramente ( ) Nunca

6 – Contato com terra: ( ) Sim ( ) Não

5 – Frequência de consulta ao médico: ( ) Frequentemente ( ) Raramente ( ) Nunca

7 – Frequência de alterações gastrointestinais (vômito/diarreia/cólica):

( ) Frequentemente ( ) Raramente ( ) Nunca

8 – Última vez que realizou exame de fezes:

( ) < 6 meses ( ) 6 meses a 1 ano ( ) > 1 ano ( ) Nunca

8.2 – Resultado do exame de fezes: ( ) Positivo ( ) Negativo

8.3 – Patógeno encontrado: ( ) Protozoários ( ) Helmintos ( ) Bactéria ( ) Vírus

8.4 – Fez tratamento: ( ) Sim ( ) Não

9 – Última vez que ingeriu medicamento anti-parasitário.

( ) < 6 meses ( ) 6 meses a 1 ano ( ) > 1 ano ( ) Nunca

10 – Grau de escolaridade:

( ) Não alfabetizado ( ) Fundamental ( ) Médio ( ) Superior

11 – Crianças: grau de escolaridade da mãe.

( ) Não alfabetizado ( ) Fundamental ( ) Médio ( ) Superior

## APÊNDICE A/B

## Questionário Epidemiológico Propriedade

N. Ficha \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Entrevistado e função: \_\_\_\_\_  
 Proprietário: \_\_\_\_\_  
 Propriedade: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_

## 1 - Constituição da população humana:

<b>Proprietários</b>	12 anos	12 - 20 anos	20 - 40 anos	40 - 60 anos	> 60 anos
Mulheres					
Homens					
<b>Funcionários</b>					
Mulheres					
Homens					

**PRODUÇÃO**

- 2 - Qual o tamanho da propriedade: \_\_\_\_\_  
 3 - Sistema de produção:  
     (1) familiar                      (2) empresarial  
 4 - Número de vacas em lactação: \_\_\_\_\_  
 5 - Produção diária de leite na propriedade: \_\_\_\_\_  
 6 - Número de ordenhas por dia:  
     (1) uma ordenha      (2) duas ordenhas                      (3) três ordenhas  
 7 - Tipo de ordenha:  
     (1) manual                      (2) mecânica com bezerro                      (3) mecânica sem bezerro  
 8 - Alimentação  
     (1) Cocho      (2) Pasto      (3) Cocho e Pasto  
 9 - Criação de bezerros  
     (1) Pasto   (3) Casinhas                      (4) Coletivo interno  
 10 - Há separação de bezerros por faixa etária em ambiente diferente  
     (1) Sim   (2) Não

**AMBIENTE**

- 11 - Tem piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós parto?  
     (1) sim                      (2) não  
 12 - Tem piquete separado para terneiros?  
     (1) sim                      (2) não  
 13 - Os bezerros recebem leite no úbere da vaca?  
     (1) sim                      (2) não  
 14- Até que idade os terneiros recebem leite no úbere da vaca?  
     (1) até 4 meses                      (2) até 6 meses                      (3) > 6meses  
 15 - Há presença de cães na propriedade?  
     (1)sim                      (2) não  
 16- Numero de cães  
     (1) 1 a 2   (2) 3 a 4   (3) acima de 5  
 17 - Há presença de gatos na propriedade?  
     (1)sim                      (2) não

- 18 – Número de gatos  
 (1) 1 a 2 (2) 3 a 4 (3) acima de 5
- 19 – Há presença de suínos na propriedade?  
 (1)sim (2) não
- 20 – Tipo de Criação:  
 (1) Subsistência(2) Comercial
- 21 – Distância das instalações da fonte de água:  
 (1) < 15m (2) > 15m
- 22 – Há presença de aves na propriedade?  
 (1)sim (2) não
- 23 – Tipo de Criação:  
 (1) Subsistência(2) Comercial
- 24 – Local de criação  
 (1) Livres (2) Confinadas

### SANEAMENTO

- 25 - Qual a origem da água de consumo animal e limpeza.  
 (1) poço raso (2) poço semi/artesiano (3) mina (4) rio/riacho (5) açude  
 (6) água Sist. Abast. Publico
- 26 - A fonte de água animal é protegida?  
 (1) Sim (2) Não
- 27 - Qual a origem da água de consumo humano?  
 (1) poço raso (2) poço semi/artesiano (3) mina (4) rio/riacho (5) açude  
 (6) água Sist. Abast. Publico
- 28 - A fonte de água humana é protegida?  
 (1) sim (2) não
- 29 - Qual o material da tampa do poço ou mina?  
 (1) cimento (2) zinco (3) lona (4) madeira (5) Outro
- 30 – Poço Raso – Possui elevação nas bordas.  
 (1) Sim (2) Não
- 31 – Mina – Possui mata ciliar ao redor.  
 (1) Sim (2) Não
- 32 – Mina – Estrutura da mina  
 (1) Caixa polietileno elevada (2) Caixa polietileno não elevada (3) Cimento com elevação  
 (4) Cimento sem elevação (5) Direto no Cano
- 33 - Já realizou limpeza do poço ou mina?  
 (1)sim (2) não
- 34 – Frequência  
 (1) mensal (2) semestral (3) anual (4) quando está sujo
- 35 - Como a água é retirada do poço ou mina?  
 (1) balde(2) bomba
- 36 - Já realizou limpeza da caixa d'água?  
 (1)sim (2) não
- 37 - Qual a frequência?  
 (1) mensal (2) semestral (3) anual (4) quando está sujo
- 38 – Qual a distância entre a fonte de água e o pasto dos animais.  
 (1) <15 m (2) >15m
- 39 - Onde está localizado o pasto em relação à fonte de água.  
 (1) Em plano mais baixo (2) Em plano mais alto (3) Mesmo plano
- 40 - Possui banheiro dentro de casa?  
 (1)sim (2) não
- 41 - Possui fossa na residência?  
 (1)sim (2) não
- 42 – Tipo de fossa  
 (1) Negra (2) Seca (3) Séptica

- 43 - Qual a distância entre a fossa e a fonte de água?  
 (1) < 15m (2) > 15m
- 44 - Onde está localizada a fossa em relação à fonte de água?  
 (1) Em plano mais baixo (2) Em plano mais alto (3) Mesmo plano
- 45 - Realiza algum tipo de tratamento da água antes do consumo:  
 (1) Filtração (2) Cloração (3) Fervura (4) Nenhum
- 46 - Possui horta/lavoura na propriedade?  
 (1) sim (2) não
- 47 - Qual o tipo de lavoura:  
 (1) soja (2) milho (3) Trigo (4) café (5) Outro: \_\_\_\_\_
- 48 - Qual produto químico é utilizado na lavoura: \_\_\_\_\_
- 49 - Tipo de lavoura da propriedade vizinha:  
 (1) soja (2) milho (3) Trigo (4) café (5) Outro: \_\_\_\_\_
- 50 - Qual a distância entre a fossa e a horta/lavoura?  
 (1) <15m (2) > 15m
- 51 - Onde está localizada a fossa em relação à horta?  
 (1) em plano mais baixo (2) em plano mais alto
- 52 - Qual o destino dos dejetos?  
 (1) esterqueira (2) biodigestor (3) direto na lavoura/horta (4)  
 Outro \_\_\_\_\_

### **SANIDADE DE ANIMAIS**

- 56- Qual a frequência de problemas gastrintestinais nos animais?  
 (1) nunca (2) raramente (3) frequentemente
- 57- Idade mais frequente  
 (1) 0 a 6 meses (2) 6 - 12 meses (3) acima de 12 meses
- 58- Realiza controle de carrapatos?  
 (1) sim (2) não
- 59- Qual Carrapaticida é utilizado: bezerros \_\_\_\_\_; vacas \_\_\_\_\_
- 60- Frequência nos bezerros:  
 (1) quinzenal (2) mensal (3) trimestral (4) quando vê o parasita
- 61 - Carrapaticida  
 (1) Banho de imersão (2) injetável (3) pour on
- 62 - Frequência nas vacas em lactação:  
 (1) quinzenal (2) mensal (3) trimestral (4) quando vê o parasita  
 (5) vaca seca
- 63 - Carrapaticida  
 (1) Banho de imersão (2) injetável (3) pour on
- 64 - Realiza controle de helmintos:  
 (1) Sim (2) Não
- 65 - Qual anti-helmíntico utilizado: bezerros \_\_\_\_\_; vacas \_\_\_\_\_
- 66 - Frequência nos bezerros  
 (1) quinzenal (2) mensal (3) trimestral (4) quando há alterações anatômicas
- 67 - Anti-helmíntico  
 (1) Oral (2) Injetável (3) pour on
- 68 - Frequência nas vacas  
 (1) quinzenal (2) mensal (3) trimestral (4) quando há alterações anatômicas (5) vaca seca
- 69 - Anti-helmíntico  
 (1) Oral (2) Injetável (3) pour on