



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA SILVA DE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium parvum* EM BEZERROS
LEITEIROS DE ESTADOS BRASILEIROS**

Londrina
2020

JULIANA SILVA DE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium parvum* EM BEZERROS
LEITEIROS DE ESTADOS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Roberta Lemos Freire

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

048 Oliveira, Juliana Silva.
Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* em bezerros leiteiros de estados brasileiros / Juliana Silva Oliveira. - Londrina, 2020.
70 f. : il.

Orientador: Roberta Lemos Freire.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Criptosporidiose - Tese. 2. Ziehl-neelsen - Tese. 3. nested-PCR - Tese. 4. RFLP - Tese. I. Lemos Freire, Roberta. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

JULIANA SILVA DE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium parvum* EM BEZERROS
LEITEIROS DE ESTADOS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sílvia Cristina Osaki
Universidade Federal do Paraná - Palotina

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2020.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia Animal e no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire.

A bolsa de estudos para o desenvolvimento deste projeto foi concedida pela **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos Deuses, que me deram forças para trilhar este caminho e seguir firme apesar dos “tombos”.

À minha Orientadora, Professora Dra. Roberta Lemos Freire, que me guiou nesta etapa e meu deu a chance de estar aqui e provar o meu valor. Obrigada pela compreensão, pela paciência e pelos ensinamentos.

Agradeço aos meus Pais, Janete e José, que fizeram sacrifícios, cada qual ao seu modo, para me proporcionar a oportunidade de estudar, cursar uma faculdade e ter uma profissão. Reconheço cada gota de suor e cada lágrima derramada e sou eternamente grata a vocês dois por tudo que me deram.

Agradeço ao meu irmão, Eduardo, pelas partidas de vídeo game e pelas risadas, este “soldado caído” nunca desistiu.

Ao meu namorado, Fábio, que do seu jeito mostrou que estava sempre ao meu lado, me fez rir, me deu comida, chocolates e “o melhor lugarzinho do mundo”.

Aos meus amigos e amigas, pessoas especiais que a Deusa colocou em meu caminho, obrigada por aguentar meus dramas, meus dias de rabugenta, por cuidar de mim quando eu precisei, por “mestrarem” ótimas mesas de RPG, por me tirarem de casa quando eu só queria me esconder do mundo. Vou levar vocês no meu coração para sempre.

À equipe dos Laboratórios de Zoonoses e Protozoologia; estagiários e pós-graduandos, que foram essenciais para o andamento deste trabalho.

À CAPES, que permitiu que este trabalho se concretizasse.

“Porque metade da vida de um ser humano envolve sobreviver ao mundo. A outra metade envolve descobrir um significado para sua existência. Para o primeiro, existe o trabalho, o instinto e a evolução natural. Para o segundo, existe o amor, a fé. E o sonho.”

Raphael Draccon

OLIVEIRA, Juliana Silva. **Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* em bezerros leiteiros de estados brasileiros**. 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A criptosporidiose, uma importante zoonose amplamente distribuída no mundo, é causada pelo *Cryptosporidium* spp. Até o presente momento, são conhecidas 38 espécies de *Cryptosporidium*, sendo duas delas com maior potencial zoonótico: *C. parvum* e *C. meleagridis*. Bovinos podem ser infectados por quatro espécies: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*, e são importantes fontes de infecção para os seres humanos. O objetivo deste estudo foi verificar a presença, caracterizar as espécies e determinar os fatores associados ao *Cryptosporidium* spp. em bezerros de propriedades leiteiras em rebanhos de oito estados brasileiros. 408 amostras de fezes de animais entre um e 60 dias de idade, provenientes de 39 propriedades localizadas em 33 cidades de oito estados do Brasil, foram analisadas. Foi aplicado questionário epidemiológico ao responsável pelo rebanho, contendo questões referentes ao ambiente, saneamento, manejo sanitário e reprodutivo, características dos animais (idade e sexo) e das amostras enviadas (características das fezes). A triagem das amostras foi realizada pela técnica de Ziehl-Neelsen modificado. As amostras positivas foram submetidas à *nested* PCR e a identificação das espécies foi realizada pela técnica polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) em amostras com maior carga parasitária (escore três e quatro cruces). Como resultado, 89,7% das propriedades (35/39) e 52,9% (216/408) das amostras analisadas foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pela técnica de Ziehl-Neelsen. Na *nested* PCR observou-se uma frequência de 54,6% (118/216) e em todas as 56 amostras submetidas à RFLP detectou-se a espécie *C. parvum*. À análise das associações, a presença de diarreia ($p \leq 0,001$), a faixa etária entre sete e 28 dias ($p \leq 0,001$) e a água proveniente de mina ($p = 0,001$) foram fatores associados ao risco de criptosporidiose nos animais. Em contrapartida, o sistema de manejo para bezerros tipo “casinha” ($p = 0,024$) foi associado à proteção contra a infecção. Estes achados indicam a circulação do parasita no rebanho bovino de estados brasileiros, com ênfase à espécie zoonótica *C. parvum*, e apontam para os cuidados quanto à fonte de água dos animais, local de permanência dos bezerros na propriedade e idade inferior a quatro semanas.

Palavras-chave: *nested* PCR. RFLP. Criptosporidiose. Bovinocultura leiteira.

OLIVEIRA, Juliana Silva. **Occurrence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves from Brazilian states**. 2020. 70 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis, an important zoonosis widely distributed worldwide, is caused by *Cryptosporidium* spp. Until the present moment, are known 38 species of *Cryptosporidium*, two of them with greater zoonotic potential: *C. parvum* and *C. meleagridis*. Cattle can be infected by four species: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. ryanae* and are important sources of infection to humans. The aim of this study was to verify the presence, characterize the species and determine the factors associated with *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in herds on eight Brazilian states. 408 samples of animal feces between one and 60 days old, from 39 properties located in 33 cities of eight states on Brazil, was analyzed. An epidemiological questionnaire was applied to the responsible for the herd, containing questions related to the environment, sanitation, sanitary and reproductive management, animal characteristics (age and sex) and of the samples sent (characteristics of the feces). Sample screening was performed using the modified Ziehl-Neelsen technique. Positive samples were submitted to *nested* PCR and species identification was performed using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique in samples with a higher parasitic load (score three and four crosses). As a result, 89.7% of the properties (35/39) and 52.9% (216/408) of the analyzed samples were positive for *Cryptosporidium* spp. by the Ziehl-Neelsen technique. In the *nested* PCR, a frequency of 54.6% (118/216) was observed and in all 56 samples submitted to RFLP, the specie *C. parvum* was detected. There was a higher prevalence of the parasite in animals aged 7 to 28 days (62.6%). When analyzing associations, the presence of diarrhea ($p \leq 0.001$), the age range between seven and 28 days ($p \leq 0.001$) and water from mine ($p = 0.001$) were factors associated with the risk of cryptosporidiosis in animals. In contrast, the management system for “house” calves ($p = 0.024$) was associated with protection against infection. These findings indicate the circulation of the parasite in bovine herd in Brazilian states, with emphasis in the zoonotic specie *C. parvum*, and point for care regarding the animals' water source, where the calves stay on the property and age less than four weeks.

Key-words: *nested* PCR. RFLP. Cryptosporidiosis. Dairy cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp	19
---	----

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Tabela 1** – Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos no mundo.....21
- Tabela 2** – Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos no Brasil.....22

ARTIGO

- Tabela 1** – Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em 408 amostras de bezerros de propriedades leiteiras com histórico de diarreia de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 201748
- Tabela 2** – Comparação do resultado de escore pela técnica de coloração Ziehl-Neelsen modificado e *nested PCR* (nPCR) em 408 amostras fecais de bezerros de propriedades leiteiras de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 201748
- Tabela 3** – Análise da associação de variáveis de exposição com a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. avaliadas pela técnica de Ziehl-Neelsen, em 408 amostras fecais de bezerros de propriedades leiteiras de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 2017.....49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	HISTÓRICO	16
2.2	TAXONOMIA E MORFOLOGIA	17
2.3	CICLO DE VIDA	18
2.4	PATOGENIA	19
2.5	EPIDEMIOLOGIA	20
2.6	DIAGNÓSTICO	23
2.6.1	Observação direta, Concentração e Coloração	23
2.6.2	Métodos Imunológicos	25
2.6.3	Métodos Moleculares	25
2.7	TRATAMENTO	27
2.8	PREVENÇÃO	27
3	REFERÊNCIAS	29
4	HIPÓTESE	41
5	OBJETIVOS	42
5.1	OBJETIVO GERAL	42
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
6	ARTIGO – IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE Cryptosporidium spp. EM BEZERROS DE PROPRIEDADES LEITEIRAS NO BRASIL	43
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO	60
	ANEXO	61

ANEXO 1 – Escore para classificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	62
APÊNDICE	63
APÊNDICE 1 – Questionário Epidemiológico aplicado nas propriedades de bovinocultura leiteira.....	64
APÊNDICE 2 – Tabela. Frequência das variáveis de exposição analisadas em 39 propriedades leiteiras de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 2017.	69

1 INTRODUÇÃO

Uma variedade de enfermidades pode ser transmitida entre bovinos e humanos, entre elas a criptosporidiose, que tem se destacado como uma importante zoonose acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos, idosos e crianças (MEIRELES, 2010).

Nos rebanhos, a criptosporidiose é responsável por perdas econômicas significativas tanto em países desenvolvidos quanto aqueles em desenvolvimento (XIAO *et al.*, 2004; REBOREDO-FERNANDEZ *et al.*, 2015). Estas perdas estão associadas ao óbito dos animais jovens, retardo no crescimento, gastos com tratamento e quedas na produção quando animais adultos são acometidos (VARGAS *et al.*, 2014). Acomete bovinos entre uma a três semanas de idade, podendo afetar também animais com mais de um mês de idade e adultos (QUÍLEZ *et al.*, 1996). A prevalência em bovinos de leite é maior, quando comparada a bovinos de corte, devido ao fato do contato entre os animais ser maior na bovinocultura leiteira (KVAC; KOUBA; VÍTOVEC, 2006).

O agente causador, *Cryptosporidium* spp. é classificado como um protozoário do filo Apicomplexa, família Cryptosporidiidae, gênero *Cryptosporidium* (FAYER *et al.*, 2008), entretanto, novas evidências sugerem que o gênero *Cryptosporidium* está mais próximo da subclasse Gregarina (CLODE; KOH; THOMPSON, 2015) pela semelhança no desenvolvimento e metabolismo. Humanos podem ser acometidos por oito espécies (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* e *C. andersoni*) (XIAO *et al.*, 2004; CACCIÒ *et al.*, 2005), no entanto *C. hominis* e *C. parvum* são mais frequentemente detectados (CACCIÒ *et al.*, 2005). Já bovinos podem ser infectados por quatro espécies de *Cryptosporidium*, sendo elas: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* (XIAO, 2010).

A forma infectante, o oocisto, é pequeno e esférico (4-8µm) contendo em seu interior quatro esporozoítos, e é eliminado esporulado no ambiente, sendo capaz de infectar novos indivíduos (XIAO; FAYER, 2008). O parasita é altamente resistente, permanecendo por longos períodos no ambiente e na água (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008), sendo resistente ao cloro e à grande parte dos tratamentos hídricos mais utilizados (DUHAIN; MINNAAR; BUYS, 2012).

A infecção pode ocorrer de forma direta ou indireta, sendo a via fecal-oral considerada a mais importante (RYAN; FAYER; XIAO, 2014). Humanos e animais adquirem a doença por meio do contato direto com pessoas e animais infectados (XIAO,

2010), esterco, água e/ou alimentos contaminados ou manipulados de forma incorreta (MAWLY *et al.*, 2015).

Em humanos, a doença pode ocasionar deficiência nutricional e atraso no crescimento (XIAO *et al.*, 2004), além de enterite grave e desidratação, que em casos mais severos podem levar à morte (ROSSIT *et al.*, 2007). Animais acometidos por criptosporidiose desenvolvem diarreia, desidratação e retardo no crescimento podendo evoluir para um quadro grave de enterite e conseqüentemente óbito (FAYER *et al.*, 1990).

No Brasil, estudos realizados em rebanhos de bovinos leiteiros relataram a presença destes parasitas nas fezes dos animais. No estado de São Paulo as prevalências variaram de 3% a 57% (FEITOSA *et al.*, 2008; SEVÁ *et al.*, 2010). Em Minas Gerais, esta variação foi de 5,33% a 40% (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2013). No Paraná as prevalências observadas foram de 10,2% e 15,3% (TOLEDO *et al.*, 2017; HOLSBACK *et al.*, 2018). Em estudos realizados abrangendo os estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e Ceará as prevalências variaram de 6,5% a 50,4% (COELHO *et al.*, 2016; CRUVINEL *et al.*, 2019). Estes estudos demonstram a presença de *Cryptosporidium* spp. no Brasil e a necessidade de avaliar quais fatores estão associados com a ocorrência do parasita no rebanho brasileiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

Em 1907, Ernest Edward Tyzzer fez a primeira descrição do gênero *Cryptosporidium* spp. ao encontrar o parasito em glândulas gástricas de camundongos de laboratório e deu a nova espécie o nome de *C. muris* (TYZZER, 1910). Posteriormente, em 1912, o autor descreveu uma nova espécie, o *C. parvum*, também observada em camundongos, porém apresentando um tamanho menor e infectando o intestino delgado (TYZZER, 1912). Mais tarde, em 1955, Slavin encontrou, no íleo de perus jovens com diarreia, um coccídeo com ciclo e características semelhantes ao descrito por Tyzzer e o nomeou *C. meleagridis* (SLAVIN, 1955).

Em meados de 1970, casos esporádicos de surtos de diarreia em animais de criação passaram a ser relatados e em 1971 foi encontrado o parasito pela primeira vez em bezerros com diarreia (PANCIERA; THOMASSEN; GARNER, 1971).

Os primeiros relatos em humanos aconteceram em 1976, nos Estados Unidos da América, sendo o primeiro uma criança imunocompetente de três anos de idade moradora de área rural e o segundo um paciente de 30 anos imunossuprimido devido ao tratamento com corticosteroides. Ambos foram diagnosticados por meio de biópsia da mucosa intestinal e tiveram cura espontânea (MEISEL, 1976; NIME, 1976). Casos esporádicos em crianças e adultos imunocompetentes e imunodeficientes foram surgindo até 1981, quando a partir de então o crescimento no número de casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) fez com que aumentassem significativamente, configurando uma possível relação da criptosporidiose com imunodeficientes (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; HUBER *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008).

A partir de 1986 estudos epidemiológicos descreveram a criptosporidiose como causa de diarreia em pacientes imunodeprimidos e em crianças, e demonstraram sua distribuição em várias regiões. Começaram então os esforços para a compreensão dos modos de transmissão e seu caráter zoonótico, tendo poucos avanços nos métodos de profilaxia e tratamento até o final da década.

No Brasil, na cidade de Botucatu, Modolo *et al.* em 1988, foram os primeiros a relatar a criptosporidiose em bovinos de leite em propriedades com surto de diarreia. Um total de 23 bezerros foram avaliados, e destes, apresentaram resultado positivo 26% dos animais menores de 30 dias de idade e 23% dos animais com mais de 30 dias.

2.2 Taxonomia e Morfologia

Cryptosporidium spp. é um protozoário do filo Apicomplexa, subclasse Cryptogregarina, ordem Cryptogregarida. O filo Apicomplexa caracteriza parasitas eucariotos que possuem o complexo apical em algum estágio de seu ciclo, sendo este complexo responsável pela invasão celular do parasita (RYAN; FAYER; XIAO, 2014; THOMPSON; KOH; CLODE, 2016). Embora classificado por muito tempo como pertencente à subclasse Coccidia devido à semelhança no ciclo biológico e morfologia (LEVINE, 1988) estudos recentes apontam que este protozoário esteja mais próximo da subclasse Gregarina, devido a fatores como: resistência a anticoccídios; variedades morfológicas dependentes da disposição nutricional do meio; diferentes tamanhos em estágios distintos de desenvolvimento; ocorrência de oocistos de parede fina e parede grossa; forma de ligação do parasita à célula do hospedeiro (organela alimentar na base do vacúolo parasitóforo); desenvolvimento no hospedeiro intracelular porém extracitoplasmático; oocistos pequenos e ausência de estruturas como esporocisto, micrópila e grânulos polares; reação cruzada de anticorpos monoclonais para *Cryptosporidium* spp. com Gregarinas e evidências de estágios extracelulares semelhantes aos gamontes (encontrados nos ciclos de vida das Gregarinas) (CLODE; KOH; THOMPSON, 2015; RYAN; HIJJAWI, 2015).

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são pequenos, de formato esférico ou ovoide, medem de 4-8 μm , não sendo possível identificá-los quanto à sua espécie por meio de microscopia óptica (XIAO; FAYER, 2008). Quando esporulados, os oocistos apresentam em seu interior quatro esporozoítos, que caracterizam a forma infectante do parasita (XIAO *et al.*, 1999). Quando realizadas técnicas de visualização microscópica por coloração, exemplo Ziehl-Neelsen modificado ou Azul de Metileno, existe a possibilidade de ocorrerem falsos resultados positivos, pois em amostras fecais estes oocistos podem ser facilmente confundidos com algas ambientais, esporos, leveduras e outros achados (MEIRELES, 2010).

A morfologia das espécies de *Cryptosporidium* spp. é bastante semelhante, e a taxonomia das espécies do gênero vem sendo realizada com o uso de métodos moleculares aliados a estudos morfológicos, biológicos ou de especificidade por hospedeiros (XIAO; CAMA, 2006).

Já foram descritas 38 espécies de *Cryptosporidium* spp. e mais de 60 genótipos diferentes, agrupados de acordo com a classe de hospedeiros, infectando desde

mamíferos até aves, peixes, répteis e anfíbios. Em humanos, 17 espécies e três genótipos foram relatadas: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei*, *C. xiaoi* e genótipos *Cryptosporidium* horse, skunk e chipmunk (RYAN; FAYER; XIAO, 2014; ZAHEDI *et al.*, 2016; KHAN; SHAIK; GRIGG, 2018; RYAN; HIJJAWI; XIAO, 2018). Dentre as espécies citadas, as mais encontradas são: *C. hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis*, sendo as duas últimas zoonóticas e destacando-se *C. parvum* como a mais frequente e com maior potencial zoonótico (RYAN; FAYER; XIAO, 2014). Em bovinos foram descritas quatro espécies, sendo elas: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae*, predominando a ocorrência de *C. parvum* em gado leiteiro e de corte (FAYER *et al.*, 2006; FAYER; SANTÍN; TROUT, 2007; GEURDEN *et al.*, 2007; SZONYI *et al.*, 2008; XIAO, 2010).

2.3 Ciclo de Vida

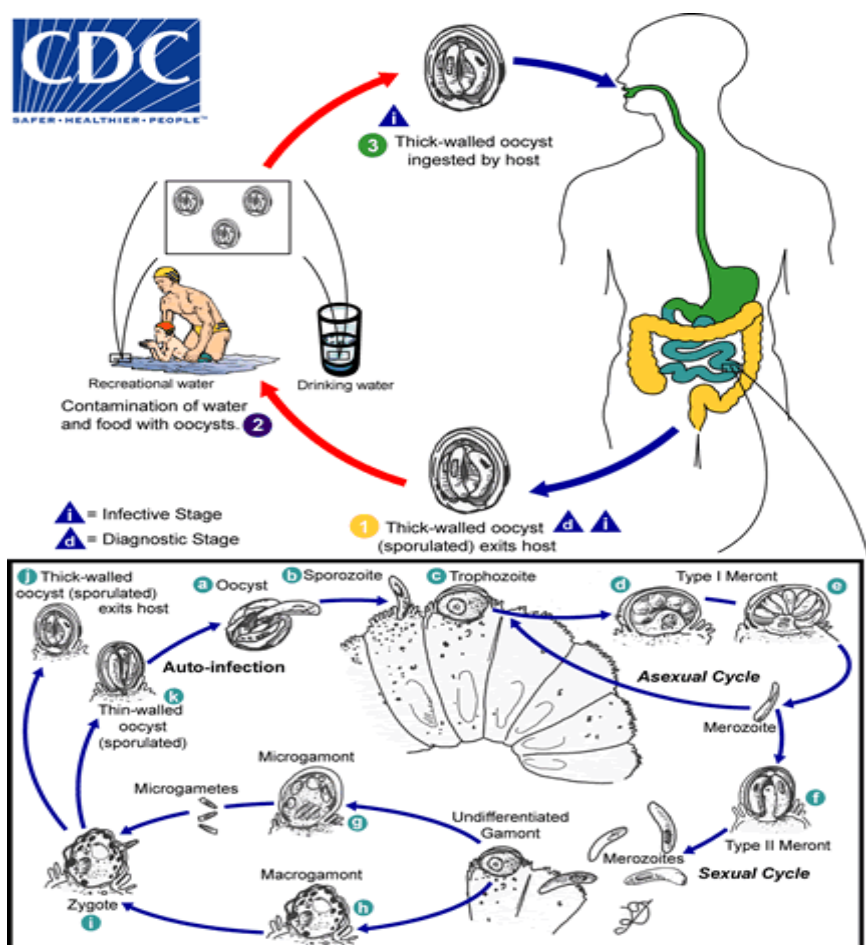
O ciclo de vida é monoxeno (um único hospedeiro), com dois ciclos, sendo um intracelular e extracitoplasmático e outro extracelular (KOH *et al.*, 2013).

O ciclo se inicia (Figura 1) quando um hospedeiro susceptível ingere oocistos viáveis presentes no ambiente, na água, em alimentos contaminados e/ou nas fezes de animais e pessoas infectadas. No interior do trato gastrointestinal, a parede dos oocistos se rompe liberando quatro esporozoítos infectantes que, de forma ativa, procuram as células epiteliais na superfície luminal e são englobados pelas microvilosidades, induzindo a formação do vacúolo parasitóforo e formando no ponto de fixação uma organela de nutrição (CHALMERS; DAVIES, 2010). O esporozoíto se diferencia em trofozoíto, que por meio de reprodução assexuada gera merontes do tipo I com vários merozoítos. Estes merozoítos do tipo I rompem o enterócito e são liberados, infectando novas células do epitélio e geram novos merozoítos do tipo I, ou originam merontes do tipo II, que sofrem transformação e formam micro ou macrogamontes que dão origem a micro ou macrogametócitos respectivamente, caracterizando a fase sexuada do ciclo (SMITH *et al.*, 2007).

O macrogametócito é fecundado pelo microgametócito e forma o zigoto, que sofre meiose gerando quatro esporozoítos, ou seja, o processo de esporulação ocorre no trato gastrointestinal do hospedeiro e os oocistos são eliminados já em sua forma infectante (CLODE; KOH; THOMPSON, 2015). Nesta etapa dois tipos de oocistos são gerados: de

parede fina, aproximadamente 20%, que rompem na luz do trato gastrointestinal do hospedeiro gerando uma autoinfecção; e oocistos de parede grossa, que são mais resistentes e eliminados juntos com as fezes (XIAO *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2007; DEL COCO; CÓRDOBA; BASUALDO, 2009). Um animal infectado pode eliminar aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ oocistos por infecção (ATWILL *et al.*, 1998).

Figura 1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.



Fonte: http://www.cdc.gov/parasites/images/crypto/cryptosporidium_lifecycle.gif

2.4 Patogenia em bovinos

A infecção por *Cryptosporidium* spp. apresenta caráter autolimitante e causa quadros de diarreia intensa em animais jovens, raramente sendo observada em bovinos adultos. A causa desta resistência em animais mais velhos está relacionada às alterações na flora e maturação do epitélio intestinal, associadas a uma resistência ao parasita resultante de uma resposta imune pela exposição ao parasita (HARP, 2003).

As taxas de mortalidade são variáveis, sendo raramente observadas em rebanhos endêmicos, contudo, as taxas de morbidade podem chegar a 100% (THOMPSON *et al.*, 2008; SANTÍN; TROUT; FAYER, 2008).

A infecção localiza-se, principalmente, na porção distal do intestino delgado, porém as lesões podem se estender pelo ceco, cólon, duodeno e até abomaso (GRAAF *et al.*, 1999). No abomaso, o parasito causa dilatação das glândulas peptídicas e pilóricas, hipertrofia da mucosa gástrica e aumento da espessura do epitélio (O'HANDLEY; OLSON, 2006); estas alterações aumentam o pH gástrico, diminuem a digestão de proteínas e inibem a função proteolítica (ANDERSON, 1987). No intestino, a invasão celular pelo *Cryptosporidium* spp. causa atrofia das vilosidades intestinais, hiperplasia das criptas, perda de células epiteliais e da borda em escova das microvilosidades, resultando em diarreia por má absorção (O'HANDLEY; OLSON, 2006).

Os sinais clínicos se manifestam três a cinco dias após a infecção e podem durar entre oito e 18 dias, se caracterizam por diarreia secretória e de má absorção, de coloração amarelada pálida, podendo ser aquosa ou mucoide; depressão; anorexia; letargia e dor abdominal (O'HANDLEY; OLSON, 2006). A gravidade e a duração variam de acordo com a espécie de *Cryptosporidium* spp. e de infecções concomitantes por bactérias, vírus e outros parasitas. Em casos severos, os bezerros podem vir a óbito por desidratação, acidose metabólica e colapso cardiovascular (O'HANDLEY; OLSON, 2006).

Os animais que sobrevivem podem levar de quatro a seis semanas para total recuperação e apresentam perda no ganho de peso; queda na eficiência alimentar e, no caso de adultos infectados cronicamente, queda na produção leiteira (OLSON *et al.*, 2004; O'HANDLEY; OLSON, 2006).

2.5 Epidemiologia

A criptosporidiose apresenta distribuição mundial e tem grande prevalência em países menos desenvolvidos. Já foi relatada em mais de 106 países, exceto a região da Antártica (RYAN; FAYER; XIAO, 2014; XIAO; FAYER, 2008). A criptosporidiose é uma zoonose, porém não há a obrigatoriedade de notificação de casos humanos ou em animais. Dessa forma, não existem dados concretos sobre a real incidência global e sua prevalência pode variar devido a diferentes formas de diagnosticar, à falta de acesso a serviços de saúde e à ausência de diagnóstico em pacientes com sintomas gastrointestinais (XIAO; FAYER, 2008; WIDERSTRÖM *et al.*, 2014). Em bovinos, estudos

de prevalência conduzidos no mundo (Tabela 1) demonstram variações de 2,55% a 78%, predominando as prevalências mais elevadas em animais jovens com até duas semanas de idade (SANTIN; TROUT; FAYER, 2008).

Tabela 1 – Prevalência/ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos no mundo, no período de 2000 a 2018.

Autor	Ano	Local	Nº de amostras	Prevalência/ Ocorrência % (n)	Método	Idade dos animais(dias)
Lefay <i>et al.</i>	2000	França	1628	17,9 (292)	ELISA	4 - 12
Uga <i>et al.</i>	2000	Japão	480	23,0 (116)	Sheater	≤ 30
Castro-Hermida <i>et al.</i>	2002	Espanha	844	47,9 (404)	Heine	< 21
Santín <i>et al.</i>	2004	EUA	971	35,5 (345)	Microscopia	5 dias – 11m
Trotz-Williams	2005	Canadá	500	40,6 (203)	Sheater	7 - 21
Fayer <i>et al.</i>	2006	EUA	571	11,9 (68)	Sheater	12 - 24
Mendonça <i>et al.</i>	2007	Portugal	291	25,4 (74)	Kinyoun	-
Trotz-Williams	2007	Canadá	919	78,0 (721)	PCR	< 30
Brook <i>et al.</i>	2008	Inglaterra	215	28,0 (60)	Ziehl-Neelsen ^m	média 26
Del Cocco <i>et al.</i>	2008	Argentina	280	17,0 (48)	Ziehl-Neelsen ^m	≤ 30
Santín <i>et al.</i>	2008	EUA	990	19,2 (190)	PCR	1 - 24 m
Ayinmode; Fagbemi	2010	Nigéria	406	23,4 (95)	Kinyoun ^m	≤ 12 m
Karanis <i>et al.</i>	2010	Japão	80	75,0 (60)	PCR	3 - 45
Cano-Romero <i>et al.</i>	2011	México	272	35,7 (97)	Kinyoun ^m	1 – 156
Días-Lee <i>et al.</i>	2011	Chile	205	56,1 (115)	Auramina	4 – 28
Ouchene <i>et al.</i>	2014	Algéria	360	26,1 (94)	Ziehl-Neelsen ^m	1 – 365
Delafosse <i>et al.</i>	2015	França	968	41,5 (402)	Heine	7 - 21
Mawly <i>et al.</i>	2015	Nova Zelândia fazendas	97	65,0 (63)	IFA*	1 - 21
Garro <i>et al.</i>	2016	Argentina	552	16,3 (90)	Kinyoun	≥ 20
Li <i>et al.</i>	2016	China	822	2,55 (21)	Sheater	-
Fan <i>et al.</i>	2017	China	339	15,5 (53)	PCR	1 - 84
Hingole <i>et al.</i>	2017	India	145	34,4 (50)	Ziehl-Neelsen ^m ; Sheater; PCR	1 - 90

Continua

Tabela 1 – Prevalência/ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos no mundo, no período de 2000 a 2018.

Autor	Ano	Local	Nº de amostras	Prevalência/ Ocorrência % (n)	Método	Idade dos animais(dias)
Inpankaew <i>et al.</i>	2017	Tailândia	500	7,8 (39)	PCR	-
Laatamna <i>et al.</i>	2018	Algéria	289	36,7 (106)	Ziehl-Neelsen ^m	1 - ≥ 6m
Liang <i>et al.</i>	2018	China	1440	4,38 (63)	PCR	-
Manyazewal <i>et al.</i>	2018	Ethiopia	392	18,6 (73)	Ziehl-Neelsen ^m ;	-

Fonte: o próprio autor

^m Método modificado

M - Meses

No Brasil, as prevalências em bovinos leiteiros (Tabela 2) variam de 3% a 57%, com maior ocorrência em animais até dois meses de idade (FEITOSA *et al.*, 2004).

Tabela 2 – Prevalência/ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos no Brasil, no período de 2004 a 2019.

Autor	Ano	Local	Nº de Amostras	Prevalência ocorrência % (n)	Método	Idade dos animais(dias)
Feitosa <i>et al.</i>	2004	SP	459	12,4 (57)	Sheater	≥ 30
Oliveira Filho <i>et al.</i>	2007	MG	130	40,0 (30)	Ziehl-Neelsen ^m	≤ 63
Feitosa <i>et al.</i>	2008	SP	459	12,4 (57)	Sheater	≤ 30
Sevá <i>et al.</i>	2010	SP	197	3,0 (6)	Sheater	≤ 90
Meireles <i>et al.</i>	2011	SP	196	10,7 (21)	PCR	≤ 30
Silva Júnior <i>et al.</i>	2011	MG	356	21,6 (-)	Ziehl-Neelsen ^m	< 12m*
Lima <i>et al.</i>	2013	MG	300	5,3 (16)	Verde malaquita	15 - 365
Paz e Silva; Lopes; Araújo Júnior	2013	SP	200	14,0 (28)	PCR	-
Coelho <i>et al.</i>	2016	GO; MG; MS; SP	184	6,5 (12)	PCR	< 365

Continua

Tabela 2 – Prevalência/ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos no Brasil, no período de 2004 a 2019.

Autor	Ano	Local	Nº de Amostras	Prevalência ocorrência % (n)	Método	Idade dos animais(dias)
Toledo <i>et al.</i>	2017	PR	937	10,2 (96)	Ziehl-Neelsen ^m	≤ 24 m
Holsback <i>et al.</i>	2018	PR	216	15,3 (33)	PCR	-
Cruvinel <i>et al.</i>	2019	CE; ES; MG; PR; RJ; SC; SP; RS;	361	50,4 (182)	Ziehl-Neelsen ^m	1 - 135

Fonte: o próprio autor.
m - meses

2.6 Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico para detecção de *Cryptosporidium* spp. incluem: observação direta e concentração aliadas a técnicas de coloração; métodos moleculares e técnicas imunológicas.

O diagnóstico de criptosporidiose demanda o uso de técnicas variadas para detecção e identificação da espécie do parasito, e quando empregada microscopia óptica, profissionais bem treinados com vasta experiência, pois os oocistos e outros estágios evolutivos do parasito são menores que de outros coccídios e muito semelhantes as leveduras, o que pode resultar em resultados falsos positivos (FAYER; MORGAN; UPTON 2000; XIAO *et al.*, 2004). Quando utilizados testes imunológicos, não é possível realizar a diferenciação entre espécies, pois os antígenos na parede dos oocistos são conservados para todo o gênero (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000). Para a detecção de anticorpos, técnicas sorológicas indicam se houve apenas exposições anteriores ao parasita (SANTIN; TROUT, 2008).

2.6.1 Observação direta, concentração e coloração

O método de observação direta é realizado pela visualização dos oocistos a fresco, onde, as fezes diarreicas ou diluídas em solução salina a 0,85% são colocadas em lâmina, cobertas com lamínula e observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (DECARLI, 2001). Com o intuito de diminuir os artefatos fecais e aumentar a

sensibilidade pode-se fazer uso de técnicas como a de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (Técnica de Sheather). Esta técnica apresenta baixo custo, os oocistos são visualizados como estruturas brilhantes contendo grânulos negros em seu interior quando visualizados em microscopia de contraste de fase, ou como estruturas translúcidas levemente róseas com grânulos em seu interior quando visualizadas em microscopia óptica de campo claro. Outra metodologia é a de centrífugo-sedimentação pelo formaldeído-éter, conhecida como Técnica de Richie Modificada (SRÉTER; VARGA, 2000; DECARLI, 2001).

Técnicas de coloração incluem Ziehl-Neelsen modificada, na qual os esfregaços de fezes (frescas ou preservadas) são fixados com álcool metílico e posteriormente corados com fucsina e verde malaquita, a leitura das lâminas é feita em microscópio óptico e os oocistos aparecem na cor rosa em fundo azul ou verde (HENRIKSEN, 1981). As lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen podem ser armazenadas por longos períodos sem que se altere a morfologia dos oocistos (BROOK *et al.*, 2008).

Outra técnica de coloração utilizada, conhecida como Safranina modificada, apresenta um bom contraste, e os oocistos podem ser observados como pontos vermelho-alaranjados em fundo verde. Esta técnica é mais simples e mais rápida que a técnica de Ziehl-Neelsen, entretanto, a técnica de Ziehl-Neelsen permite melhor visualização quando há pequenas quantidades de oocistos nas fezes (RIGO *et al.*, 2002; BAXBY; BLUNDELL; HART, 1984).

No método de Kinyoun modificado, as amostras são fixadas com Metanol e coradas com Fucsina carbólica e Azul de Metileno 1%. Os oocistos são vistos esféricos, de cor vermelha em fundo verde com intensidade variável. Esta coloração possibilita diferenciar os oocistos das leveduras presentes nas fezes, entretanto, restos fecais podem gerar dúvidas em avaliadores com pouca experiência (NETO *et al.*, 1996).

A técnica de Heine utiliza Fucsina Carbólica, que é adicionada ao esfregaço e após secagem, óleo de imersão e lamínula para leitura. Os oocistos podem ser observados acromáticos e com brilho (NETO *et al.*, 1996). O resultado da coloração é visto aproximadamente sete minutos após o início da técnica, e após 30 minutos a morfologia do parasita se altera, prejudicando a leitura (NETO *et al.*, 1996).

A coloração de Giemsa é utilizada em esfregaços de fezes misturados à solução salina e, para cortes histológicos, colorações a base de prata (DECARLI, 2001).

Estas técnicas são comumente utilizadas por serem de baixo custo, entretanto, requerem trabalho intensivo, mão de obra especializada e quantidade considerável de

oocistos na lâmina para que não sejam emitidos resultados falsos positivos (RAMIREZ; SREEVATSAN, 2006).

2.6.2 Métodos Imunológicos

Métodos imunológicos são mais sensíveis e específicos que a microscopia de luz (JEX *et al.*, 2008), entretanto, possuem a desvantagem de necessitar de equipamentos adequados e uma equipe especializada para a realização destes exames. Para detecção de *Cryptosporidium*, as técnicas mais utilizadas são a Imunofluorescência (IF) e o ELISA, que detectam anticorpos ou antígenos presentes nas amostras, porém são técnicas que não permitem determinar a espécie ou genótipo do parasita (SMITH, 2008).

A técnica de imunofluorescência direta detecta antígenos de parede celular em oocistos de *Cryptosporidium*, possibilitando a visualização do parasita em amostras fecais por meio de anticorpos marcados com fluoresceína e visualizado em microscópio de epifluorescência (JOHNSTON *et al.*, 2003).

O ensaio imunoenzimático (ELISA), utiliza anticorpos para detectar, de forma qualitativa, antígenos em amostras de fezes, por meio do uso de substrato cromogênico. Indicado para uso em grandes quantidades de amostras (JEX *et al.*, 2008; VOHRA; SHARMA; CHAUDHARY, 2012).

2.6.3 Métodos Moleculares

Baseados na detecção do material genético do parasito por meio de técnicas de amplificação de DNA, como PCR (Polymerase Chain Reaction) e suas variantes, se caracterizam por serem mais sensíveis e específicas que outras técnicas (ZHU *et al.*, 1998; JEX *et al.*, 2008). Entretanto, esta sensibilidade pode ser afetada pela presença de inibidores variados nas fezes, pela perda de parasitos durante a extração e purificação das amostras e até mesmo pelo protocolo utilizado (BROOK *et al.* 2008).

Dentre as variações da PCR, a *nested* PCR destaca-se como a mais utilizada na detecção de *Cryptosporidium* spp. por ser uma dupla PCR, o que torna o método mais sensível, mesmo em amostras com pequena quantidade de DNA (COUPE *et al.*, 2005). O *locus* utilizado é o gene da subunidade 18S do RNA ribossômico (SSU rRNA), pelo fato de apresentar cinco cópias por genoma, evolução mais lenta e menor polimorfismo, sendo

também o *locus* de escolha para amostras possivelmente infectadas por espécies ou genótipos ainda não classificados (MORGAN *et al.*, 2000; XIAO *et al.*, 2004).

Para identificação das espécies de *Cryptosporidium* spp. presentes nas amostras, é realizada a *nested* PCR para amplificação do DNA, seguida de análise por polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP). A técnica de RFLP utiliza enzimas específicas para clivagem em sítios específicos do DNA. O produto da PCR é digerido e dá origem a fragmentos com diferentes tamanhos de pares de base, o que caracteriza cada espécie de acordo com o número de fragmentos formados (XIAO *et al.*, 1999).

Para estudos da transmissão de *C.parvum* em bovinos e humanos e *C. hominis* em humanos, a subtipagem baseada no gene da glicoproteína 60 kDa (GP-60) é utilizada. Este gene caracteriza-se por ser semelhante a uma sequência de microssatélites de repetições do trinucleotídeo codificador de serina na extremidade 5' do gene, estas repetições variam em número de trinucleotídeos e em extensas sequências que não se repetem, o que possibilita diferenciar *C.parvum* e *C.hominis* em famílias e subtipos (XIAO, 2010). Esta técnica é amplamente utilizada em estudos da transmissibilidade de *C. parvum* entre humanos e ruminantes, pois algumas famílias de *C.parvum*, como a Ila e IId, são encontradas em humanos e ruminantes (XIAO; RYAN, 2008; XIAO, 2010).

Outra técnica empregada é a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), apresenta alta sensibilidade que permite o diagnóstico de criptosporidiose clínica e a detecção de indivíduos portadores, sendo uma valiosa ferramenta para estudos epidemiológicos (HADFIELD *et al.* 2011; DE WAELE *et al.*, 2011). A qPCR age por meio de amplificação e detecção simultânea dos fragmentos de DNA, com redução do tempo de análise e dos riscos de contaminação, pois não requer a visualização dos produtos de PCR por meio de eletroforese, que é necessária em outras variantes da PCR. A qPCR também oferece a vantagem de alta especificidade quando se utiliza uma sonda fluorescente, que se liga de forma específica à sequência alvo, junto com oligonucleotídeos iniciadores (DE WAELE *et al.*, 2011; JOTHIKUMAR *et al.*, 2008). Comparada com a PCR convencional, a qPCR apresenta vantagens como: diagnóstico mais rápido, diminuição de contaminantes laboratoriais (amplicons) e não requer outros procedimentos após o término da PCR (JOTHIKUMAR *et al.*, 2008).

Em contrapartida, são técnicas de custo elevado se comparadas ao custo de outros métodos em amostras fecais, o que dificulta o uso rotineiro para diagnósticos clínicos (BROOK *et al.*, 2008).

2.7 Tratamento

Não há um tratamento específico para a criptosporidiose. O tratamento realizado é de suporte, com fluidoterapia, visto que não existem medicações específicas para o parasita. Em indivíduos sadios a infecção é autolimitante (SILVERLAS *et al.*, 2009).

Entre os agentes indicados, a halofuginona, uma quinazolina licenciada na Europa mostrou-se eficiente na prevenção e tratamento da criptosporidiose em bezerros, melhorando o estado clínico e diminuindo a excreção de oocistos pelas fezes e a mortalidade no rebanho (MEGANCK *et al.*, 2015). A azitromicina, amplamente utilizada na medicina humana, também é eficaz no tratamento da criptosporidiose bovina, porém, o alto custo restringe seu uso àqueles casos de diarreia confirmada por *C. parvum* não responsiva ao tratamento com halofuginona oral (CONSTABLE, 2009; MEGANCK *et al.*, 2015). O uso de nitazoxanida, um medicamento de uso humano para tratamento da criptosporidiose, reduz o tempo de excreção de oocistos e a gravidade da diarreia em bovinos, entretanto, não altera carga de oocistos excretados e nem há melhora no quadro clínico. A nitazoxanida, apesar de seus benefícios, não é indicada para tratamento ou como medida profilática contra a criptosporidiose em animais (OLLIVETT *et al.*, 2009; SHAHIDUZZAMAN; DAUGSCHIES, 2012).

Em bezerros com indicativo de doença sistêmica, a administração de antibióticos de espectro gram-negativo é indicada pois estes animais podem vir a sofrer septicemia por *E. coli* (MEGANCK; HOFLACK; OPSOMER, 2014).

2.8 Prevenção

Nos rebanhos, medidas adequadas de prevenção da criptosporidiose incluem, além do isolamento e tratamento dos animais acometidos, boas práticas de manejo e medidas de higiene, tanto do rebanho quanto dos indivíduos que entram em contato com os animais. Estas medidas de higiene reduzem a contaminação ambiental e previnem que animais susceptíveis possam ser afetados (SHAHIDUZZAMAN; DAUGSCHIES, 2012; MEGANCK; HOFLACK; OPSOMER, 2014). Evitar grandes densidades de animais; manter animais de diferentes categorias separados; realizar a lavagem e desinfecção diária de baldes, tetinas, vestuário, comedouros e bebedouros; trocar as camas regularmente e adotar medidas que diminuam a umidade nas instalações são medidas

que diminuam a ocorrência da doença nas propriedades (CONSEDEY; FIUZA; OLIVEIRA, 2008).

A oferta de colostro de qualidade aos neonatos, além da transferência de imunidade passiva, estimula o desenvolvimento das vilosidades intestinais. Por isso é essencial fornecer ao neonato colostro em quantidade adequada e de boa qualidade (CHASE *et al.*, 2008). Arsenopoulos *et al.* (2017) determinaram o efeito do colostro na ocorrência de diarreia por *Cryptosporidium* spp. e relacionou falhas na colostragem, como qualidade e quantidade, ao aumento de criptosporidiose nos rebanhos.

Os oocistos de *Cryptosporidium* são altamente resistentes no ambiente, podendo sobreviver em determinadas condições de temperatura e salinidade. Em condições ideais de temperatura e umidade podem permanecer por semanas ou meses em ambientes terrestres e/ou aquáticos, se dispersando facilmente devido a sua capacidade de flutuar (FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004; FAYER, 2008). Desinfetantes comerciais comumente utilizados nas concentrações indicadas não são eficazes para sua inativação (FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004). De nove diferentes desinfetantes testados por Campbell *et al.*, (1982), apenas o formaldeído a 10% e a amônia a 5% e a 10% foram capazes de eliminar o oocisto.

Em ambientes contaminados, como uma forma de prevenir infecções zoonóticas, é importante a remoção das fezes e o destino adequado para reduzir a carga de oocistos no ambiente e o risco de contaminação das águas de superfície (FAYER; SANTÍN; XIAO, 2005). A limpeza de superfícies contaminadas, remoção da cama e rigorosa higienização auxiliam na diminuição do número de oocistos no ambiente, principalmente quando novos animais serão introduzidos no local (SHAHIDUZZAMAN; DAUGSCHIES, 2012).

Uma área de quarentena deve ser disponibilizada na propriedade para acomodar os animais doentes e estes devem ser tratados por último, deixando utensílios, botas e vestuário para uso exclusivo nos locais de permanência destes animais (SHAHIDUZZAMAN; DAUGSCHIES, 2012)

3 REFERÊNCIAS

- ANDERSON, B. C. Abomasal Cryptosporidiosis in Cattle. **Veterinary Pathology**, v.24, n.3, p.235-238, 1987.
- ARAÚJO, A. J. U. S.; KANAMURA, H. Y.; ALMEIDA, M. E.; GOMES, A. H. S.; PINTO, T. H. L.; SILVA, A. J. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n.3, 2008.
- ARSENOPOULOS, K.; THEODORIDIS, A.; PAPADOPOULOS, E. Effect of colostrum quantity and quality on neonatal calf diarrhea due to *Cryptosporidium* spp. infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.53, p. 50-55, 2017.
- ATWILL, E.R.; HARP, J.A.; JONES, T.; JARDON, P.W.; CHECEL, S.; ZYLSTRA, M. Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* for calfhood infection. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.1116–1121, 1998.
- AYINMODE, A. B.; FAGBEMI, B. O. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cattle from South Western Nigeria. **Veterinarski Arhiv**, v.80, n.6, p.723-731, 2010.
- BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C. A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **Journal of Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 317-323, 1984.
- BROOK, E.; HART, C. A.; FRENCH, N.; CHRISTLEY, R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.46-52, mar. 2008.
- CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; McLAUHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v.21, n.9, p.430-437, 2005.
- CAMPBELL, I.; TZIPORI, A.S.; HUTCHISON, G.; ANGUS, K.W. Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. **The Veterinary Record**, v.111, n. 18, p. 414-415, 1982.
- CANO-ROMERO, P.; ALONSO-DÍAZ, M. A.; FIGUEROA-CASTILLO, J. A.; TRIGO-TAVERA, F. J. T. Prevalence and incidence of *Cryptosporidium* spp. in calves from the central region of Veracruz, Mexico. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.13, p.567-571, 2011.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; GONZÁLEZ-LOSADA, Y. A.; ARES-MAZÁS, E. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). **Veterinary Parasitology**, v.106, p.1-10, may 2002.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 138-146, 2010.

CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.24, n.1, p.87-104, 2008.

CLODE, P. L.; KOH, W. H.; THOMPSON, A. R. C. Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 12, p. 614-624, 2015.

COELHO, W. M. D.; WIDMER, G.; OLIVEIRA, F. P.; AMARANTE, A. F. T.; BRESCIANI, K. D. S. Natural infection by *Cryptosporidium* spp. In production animals: first description of subtype IIaA15G2R1 in goat kids and piglets in Brazil. **Journal of Tropical Pathology**, v.45, n.4, p.361-368, 2016.

CONSTABLE, P. D. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.25, n.1, p.101-120, 2009

COSENDEY, R. I. J.; FIUZA, V. R. S.; OLIVEIRA, F.C.R. 2008. Importância do manejo na criptosporidiose em criações de ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p.209-214, 2008.

COUPE, S.; SARFATI, C.; HAMANE, S.; DEROUIN, F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1017-1023, 2005.

CRUVINEL, L. B.; AYRES, H.; ZAPA, D. M. B.; NICARETTA, J. E.; COUTO, L. F. M.; HELLER, L. M.; BASTOS, T. S. A.; CRUZ, B. C.; SOARES, V. E.; TEIXEIRA, W. F.; OLIVEIRA, J. S.; FRITZENS, J. T.; ALFIERI, A. A.; FREIRE, R. L.; LOPES, W. D. Z. Prevalence and risk factors for agents causing diarrhea (Coronavirus, Rotavirus, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., and nematodes helminthes) according to age in dairy calves from Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 2019.

DECARLI, G. A. **Parasitologia clínica**. São Paulo: Atheneu, 2001. 810p.

DELAFOSSÉ, A.; CHARTIER, C.; DUPUY, M.C.; DUMOULIN, M.; PORS, I.; PARAUD, C. *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. **Preventive Veterinary Medicine**, v.118, p.406-412, 2015.

DEL COCO, V. F.; CÓRDOBA, M. A.; BASUALDO, J. A. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 31-35, nov. 2008.

DEL COCO, V.F.; CÓRDOBA, M.A.; BASUALDO, J.A. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. **Revista Argentina de Microbiología**, v.41, n.3, p.185-196, 2009.

DE WAELE, V.; BERZANO, M.; BERKVEN, D.; SPEYBROECK, N.; LOWERY, C.; MULCAHY, G. M.; MURPHY, T. M. Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.76-89, 2011.

DÍAZ-LEE, A.; MERCADO, R.; ONUOHA, E. O.; OZAKI, L. S. MUÑOZ, V.; MARTÍNEZ, F. J.; FREDES, F. *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. **Veterinary Parasitology**, v.176, n.2-3, p.139-144, 2011.

DUHAIN, G. L. M.; MINNAAR, A.; BUYS, E. M. Effect of chlorine, blanching, freezing, and microwave heating on *Cryptosporidium parvum* viability inoculated on green peppers. **Journal of Food Protection**, v. 75, n.5, p.936-941, 2012.

FAN, Y.; WANG, T.; KOEHLER, A.V.; HU, M.; GASSER, R.B. Molecular investigation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre- and post-weaned calves in Hubei Province, China. **Parasites & Vectors**, v.10, n.1, 2017.

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. General biology of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Ed.) **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRS Press, 1990. p.1-29.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.1305-1322, nov. 2000.

FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v.20, n.11, p.531-536, 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.; GREINER, E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.105-112, 2006.

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.

FAYER, R. General Biology. In R. Fayer & L. Xiao. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. 2 ed. CRC Press, 2008. p.1-42.

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

FEITOSA, F. L. F.; SHIMAMURA, G. M.; ROBERTO, T.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; FÉRES, F. C.; BOVINO, F.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarréia em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.10, p.452-456, 2008.

GARRO, C.J.; MORICI, G.E.; UTGÉS, M.E.; TOMAZIC, M.L.; SCHNITTGER, L. Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. **Parasite Epidemiology and Control**, v.1, n.2, p.36-41, 2016.

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, p.1981–1987, 2007.

GRAAF, D. C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L. M.; ABBASSI, H.; PEETERS, J. E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.8, p.1269-1287, 1999.

HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples using realtime PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n.3, p. 918-924, mar. 2011.

HARP, J. A. *Cryptosporidium* and host resistance: historical perspective and some novel approaches. **Animal Health Research Reviews**, v.4, n.1, p.53-62, 2003.

HENRIKSEN, S. A; POHLENZ, J. F. L. Staining of Cryptosporidia by a Modified Ziehl-Neelsen Technique. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v.22, p.594-596,1981.

HINGOLE, A.C.; GUDEWAR, J.G.; PEDNEKAR, R.P.; GATNE, M.L. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* species in cattle and buffalo calves in Mumbai region of India. **Journal of Parasitology Diseases**, v.41, p.131-136, 2017.

HOLSBACK, L.; LIMA, H. E.; VIDOTTO, O.; SILVA, M. A.; PATELLI, T. H. C.; MARTINS, F. D. C.; SEIXAS, M. *Cryptosporidium* occurrence in ruminants from the North Pioneer mesoregion of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 27, n.2, p.248-253, abr.-jun.2018.

HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T. C. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; BELLO, A. R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n 1-2, p. 65-74, 2007.

INPANKAEW, T.; JIYIPONG, T.; SUNANTA, C.; KENGRADOMKIJ, C.; PINYOPANUWAT, N.; JITTAPALAPONG, S. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* from dairy cows in Northern Thailand. **Acta Parasitologica**, v.62, p.772-774, 2017.

JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium*: biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**. v. 26, n.4, p. 304-317, 2008.

JOHNSTON, S. P.; BALLARD, M. M.; BEACH, M. J.; CAUSER, L.; WILKINS, P. P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. V.41, p. 623–626, 2003.

JOTHIKUMAR, N.; DA SILVA, A.J.; MOURA, I.; QVARNSTROM, Y.; HILL, V. R. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.1099-1105, 2008.

KARANIS, P.; EIJI, T.; PALOMINO, L.; BOONROD, K.; PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; IGARASHI, I. First description of *Cryptosporidium bovis* in Japan and diagnosis and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pre-weaned calves in Hokkaido. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.3-4, p.387-390, 2010.

KHAN, A; SHAIK, J. S; GRIGG, M. E. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. **Acta Tropica**, v.184, p. 1-14, 2018.

KOH, W.; CLODE, P. L.; MONIS, P.; THOMPSON, R. C. A. Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, n. 1, p. 270, 2013.

KVÁC, M.; KOUBA, M.; VÍTOVEC, J. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.202-209, 2006.

LAATAMNA, A.K.; BELKESSA, S.; KHALIL, A.; AFIDI, A.; BENMAHDJOUBA, K.; BELALMI, R.; BENKROUR, M.; GHAZEL, Z.; HAKEM, A.; AISSI, M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in farmed animals from steppe and high plateau regions in Algeria. **Tropical Biomedicine**, v.35, n.3, p.724-735, 2018.

LEFAY, D.; NACIRI, M.; POIRIER, P.; CHERMETTE, R. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. **Veterinary Parasitology**, v.89, n.1-2, p.1-9, 2000.

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

LI, F.; WANG, H.; ZHANG, Z.; LI, J.; WANG, C.; ZHAO, J.; HU, S.; WANG, R.; ZHANG, L.; WANG, M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Beijing, China. **Veterinary Parasitology**, v.219, p.61-65, 2016.

LIANG, N.; WU, Y.; SUN, M.; CHANG, Y.; LIN, X.; YU, L.; HU, S.; ZHANG, X.; ZHENG, S.; CUI, Z.; ZHANG, L. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Guangdong Province, South China. **Parasitology**, v. p.1-5, 2018.

LIMA, R. C. A.; AQUINO, M. C. C.; INÁCIO, S. V.; 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**, Londrina, v.34, n.6, p.3747-3754, 2013.

MANYAZEWA, A.; FRANCESCA, S.; PAL, M.; GEZAHEGN, M.; TESFAYE, M.; LUCY, M.; TEKLU, W.; GETACHEW, T. Prevalence, risk factors and molecular characterization of *Cryptosporidium* infection in cattle in Addis Ababa and its environs, Ethiopia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.13, p.79-84, 2018.

MAWLY, J. A.; GRINBERG, A.; VELATHANTHIRI, N.; FRENCH, N. Cross sectional study of prevalence, genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* cycling in New Zealand dairy farms. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2015.

MEGANCK, V.; HOFACK, G.; OPSOMER, G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.56, p.1-8, 2014.

MEGANCK, V.; HOFACK, G.; PIEPERS, S.; OPSOMER, G. Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhea on dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.118, n.1, p.64-70, 2015.

MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 4, p. 197-204, Oct-Dec. 2010.

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

MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v.70, n.6, p.1156-1160, 1976.

MENDONÇA, C.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DELGADO, M. L.; SOARES, S.; COSTA, J. M.; CANADA, N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.1-2, p.47-50, 2007.

MODOLO, J. R.; GONÇALVES, R. C.; KUCHEMUCK, M. R. G. Ocorrência de criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 1, p. 9-10, 1988.

MORGAN, U. M.; WEBER, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; THOMPSON, R. C. A; NDIRITU, W.; LAL, A.; MOORE, A.; DEPLAZES, P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1180-1183, 2000.

NETO, V.A.; BRAZ, L.M.A.; DI PIETRO, A.O.; MODOLO, J.R. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. Em fezes: comparação entre os métodos de Kinyoun modificado e de Heine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, n.6, p.575-578, 1996.

NIME, F. A.; BUREK, J. D.; PAGE, D. L.; HOLSCHER, M.A.; YARDLEY, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, p. 592-598, 1976.

O'HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.22, n.3, p.623-643, 2006.

OLIVEIRA FILHO, J.P.; SILVA, D.P.G.; PACHECO, M.D.; MASCARINI, M.L.; 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.

- OLLIVETT, T.L.; NYDAM, D.V.; BOWMAN, D.D.; ZAMBRISKI, J.A.; BELLOSA, M.L.; LINDEN, T.C.; DIVERS, T.J. Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1643-1648, 2009.
- OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; McALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v.20, n.4, p.185-191, apr. 2004.
- 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, apr. 2014.
- PANCIERA, R. J.; THOMASSEN, R. W.; GARNER, F. M. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v.8, p.479-484, 1971.
- PAZ E SILVA, F. M.; LOPES, R. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. P. Identificação de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em bovinos leiteiros no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.22-28, jan.-mar. 2013.
- QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E.; CLAVEL, A.; CAUSAPÉ, A. C. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**, v.66, p. 139-146, 1996.
- RAMIREZ, N. E.; SREEVATSAN, S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. **Veterinary Parasitology**, vol. 136, p. 201-213, mar. 2006.
- REBOREDO-FERNANDEZ, A.; ARES-MAZAS, E.; CACCIO, S. M.; GOMEZCOUSO, H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). **Parasitology**, v. 142, n. 7, p. 917-925, Jun. 2015.
- RIGO, C. R.; FRANCO, R. M. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e Acid-Fast-Trichrome para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.3, p.209-214, 2002.
- 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.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 367–373, may 2015.

RYAN, U.; HIJJAWI, N.; XIAO, L. Foodborne cryptosporidiosis. **International Journal of Parasitology**, v. 48, p. 1 -12, 2018.

ROSSIT, A. R. B.; ALMEIDA, M. T.; NOGUEIRA, C. A.; OLIVEIRA, J. G. C.; BARBOSA, D. M.; MOSCARDINI, A. C.; MASCARENHAS, J. D.; GABBAY, Y. B.; MARQUES, F. R.; CARDOSO, L. V.; CAVASINI, C. E.; MACHADO, R. L. Bacterial yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State. Southeastern Brasil, **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 57, n. 1, p. 59-66, 2007.

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, n. 1, p. 15- 23, 2008.

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**, Jaboticabal, v.19, n.4, p. 249-253, out-dez. 2010.

SHAHIDUZZAMAN, M.; DAUGSCHIES, A. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. **Veterinary Parasitology**, n.3-4, v.188, p.203-214, 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 na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.31, n.8, p. 690-696, ago. 2011.

SILVERLAS, C.; BJÖRKMAN, C.; EGENVALL, A. Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.91, p.73-84, 2009.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology**, v. 65, n.3, p. 262–266, jul. 1955.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 1-2, p. 29–40, oct. 2007.

SMITH, H. Diagnostics. In R. Fayer & L. Xiao. ***Cryptosporidium* and Criptosporidiosis**. 2 ed. CRC Press, 2008. p. 173-207.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n.4, p. 261-279, 2000.

SZONYI, B.; KANG'ETHE, E.K.; MBAE, C.K.; KAKUNDI, E.M.; KAMWATI, S.K.; MOHAMME, H.O. First report of *Cryptosporidium* deer-like genotype in Kenyan cattle. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.172–175, 2008.

THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v.177, n.1, p.18–25, 2008.

THOMPSON, R. C. A.; KOH, W.H.; CLODE, P.L. Cryptosporidium-What is it? **Food and Waterborne Parasitology**, v.4, p.54-61, 2016.

TOLEDO, R. S.; MARTINS, F. D. C.; FERREIRA, F. P.; ALMEIDA, J. C.; OGAWA, L.; SANTOS, H. L. E. P. L.; SANTOS, M. M.; PINHEIRO, F. A.; NAVARRO, I. T.; GARCIA, J. L.; FREIRE, R. L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. **PLOS ONE**, v.12, n.4, 2017.

TROTZ-WILLIAMS, L. A.; JARVIE, B. D.; MARTIN, S. W.; LESLIE, K. E.; PEREGRINE, A. S. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, n.4, p. 349-351, 2005.

TROTZ-WILLIAMS, L. A.; MARTIN, S. W.; LESLIE, K. E.; DUFFIELD, T.; NYDAM, D. V.; PEREGRINE, A. S. Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v.82, p.12-28, 2007.

TYZZER, E. E. An extracelular coccidium (gen. & sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v. XXXIII, p. 487– 509, sept. 1910.

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

UGA, S.; MATSUO, J.; KONO, E.; KIMURA, K.; INOUE, M.; RAI, S. K.; ONO, K. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.94, n.1, p.27-32, 2000.

VARGAS J., S. F.; 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.

VOHRA, P.; SHARMA, M.; CHAUDHARY, U. A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of *Cryptosporidium parvum* in stool samples. **IOSR Journal of Pharmacy**, v.2, p.15–26, 2012

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J.; FAYER, R.; LAL, A.A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1578-1583, 1999.

XIAO, L.; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.17, p.483–490, 2004.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 72-97, jan. 2004.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In: ORTEGA, Y. R. Foodborne Parasites. New York: Springer verlag, 2006.

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

XIAO, L., RYAN, U. Molecular epidemiology. In: ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. Boca raton: CRC Press and IWA Publishing, 2008, p 119–171.

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

ZAHEDI, A; PAPANINI, A; JIAN, F; ROBERTSON, I; RYAN, U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights. **International Journal of Parasitology: parasites and wildlife**, v. 5, p. 88-109, 2016.

ZHU, G.; MARCHEWKA, M. J.; ENVIS, J. G.; KEITHLY, J. S. Direct isolation of DNA from patient stools for polymerase chain reaction detection of *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.177, p. 1443–1446, may 1998.

WIDERSTRÖM, M.; SCHÖNNING, C.; LILJA, M.; LEBBAD, M.; LJUNG, T.; ALLESTAM, G.; FERM, M.; BJÖRKHOLM, B.; HANSEN, A.; HILTULA, J.; LANGMARK, J.; LOFDAHL, M.; OMBERG, M.; REUTERWALL, C.; SAMUELSSON, E.; WIDGREN, K.; WALLENSTEN, A.; LINDH, J. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply. **Emerging infectious diseases**, Sweden, v. 20, n. 4, p. 581-589, apr. 2014.

4 HIPÓTESE

Bezerros de rebanhos de bovinocultura leiteira no Brasil estão infectados por espécies zoonóticas de *Cryptosporidium*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de *Cryptosporidium* em bezerros de propriedades leiteiras em rebanhos de estados brasileiros.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a presença de *Cryptosporidium*.
- Caracterizar molecularmente as espécies de *Cryptosporidium*.
- Determinar os fatores associados à presença de *Cryptosporidium*.

6 ARTIGO¹ – IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS DE PROPRIEDADES LEITEIRAS NO BRASIL

RESUMO

A criptosporidiose, uma importante zoonose amplamente distribuída no mundo, é causada pelo *Cryptosporidium* spp. De 38 espécies de *Cryptosporidium* conhecidas, bovinos podem ser infectados por quatro espécies: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*, e são importantes fontes de infecção de *C. parvum* para os seres humanos. O objetivo deste estudo foi verificar a presença, caracterizar as espécies e determinar os fatores associados à presença de *Cryptosporidium* spp. em bezerros de propriedades leiteiras em rebanhos de oito estados brasileiros. 408 amostras de fezes de animais entre um e 60 dias de idade, provenientes de 39 propriedades localizadas em 33 cidades de oito estados do Brasil foram analisadas. Foi aplicado questionário epidemiológico ao responsável pelo rebanho, contendo questões referentes ao ambiente, saneamento, manejo sanitário e reprodutivo, características dos animais (idade e sexo) e das amostras enviadas (características das fezes). A triagem das amostras foi realizada pela técnica de Ziehl-Neelsen modificado. As amostras positivas foram submetidas à *nested* PCR e a identificação das espécies foi realizada pela técnica polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) em amostras com maior carga parasitária (escore três e quatro cruces). Como resultado, 89,7% das propriedades (35/39) e 52,9% (216/408) das amostras analisadas foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pela técnica de Ziehl-Neelsen. Na *nested* PCR observou-se uma frequência de 54,6% (118/216) e em todas as 56 amostras submetidas à RFLP detectou-se a espécie *C. parvum*. Prevalência maior do parasita ocorreu em animais na faixa etária de sete a 28 dias (62,6%). À análise das associações, a presença de diarreia ($p \leq 0,001$), a faixa etária entre sete e 28 dias ($p \leq 0,001$) e a água proveniente de mina ($p = 0,001$) foram fatores associados ao risco de criptosporidiose nos animais. Em contrapartida, o sistema de manejo para bezerros tipo “casinha” foi associado à proteção contra a infecção. Estes achados indicam a circulação do parasita no rebanho bovino de estados brasileiros, com ênfase à espécie zoonótica *C. parvum*, e apontam para os cuidados quanto a fonte de água dos animais, local de permanência dos bezerros na propriedade e idade inferior a quatro semanas.

Palavras-chave: *nested* PCR. RFLP. *Cryptosporidium parvum*. Bovinocultura leiteira.

1 Artigo redigido sob as normas da revista Semina: Ciências Agrárias.
<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/about/submissions>

IDENTIFICATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND FACTORS ASSOCIATED WITH THE OCCURRENCE OF *Cryptosporidium* spp. IN CALVES FROM DAIRY FARMS IN BRAZIL

ABSTRACT

Cryptosporidiosis, an important zoonosis widely distributed in the world, is caused by *Cryptosporidium* spp. Of 38 known *Cryptosporidium* species, cattle can be infected by four species: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. ryanae*, and are important sources of infection of *C. parvum* for humans. The aim of this study was to verify the presence, characterize the species and determine the factors associated with the presence of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves of herds on eight Brazilian states. 408 feces samples from animals between one and 60 days old, from 39 properties located in 33 cities in eight states in Brazil were analyzed. An epidemiological questionnaire was applied to the person responsible for the herd, containing questions related to the environment, sanitation, sanitary and reproductive management, characteristics of the animals (age and sex) and of the samples sent (characteristics of the feces). Sample screening was performed using the modified Ziehl-Neelsen technique. Positive samples were submitted to *nested* PCR and species identification was performed using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique in samples with a higher parasitic load (score three and four crosses). As a result, 89.7% of the properties (35/39) and 52.9% (216/408) of the analyzed samples were positive for *Cryptosporidium* spp. by the Ziehl-Neelsen technique. In the *nested* PCR, a frequency of 54.6% (118/216) was observed and in all 56 samples submitted to RFLP, the specie *C. parvum* was detected. There was a higher prevalence of the parasite in animals aged 7 to 28 days (62.6%). When analyzing associations, the presence of diarrhea ($p \leq 0.001$), the age range between seven and 28 days ($p \leq 0.001$) and water from mine ($p = 0.001$) were factors associated with the risk of cryptosporidiosis in animals. In contrast, the management system for “house” calves was associated with protection against infection. These findings indicate the circulation of the parasite in bovine herd in Brazilian states, with emphasis in the zoonotic specie *C. parvum*, and point for care regarding the animals' water source, where the calves stay on the property and age less than four weeks.

Key-words: *nested* PCR. RFLP. *Cryptosporidium parvum*. Dairy cattle.

1. INTRODUÇÃO

Cryptosporidium spp., um protozoário do filo Apicomplexa, família Criptosporidae, gênero *Cryptosporidium* (FAYER *et al.*, 1990) é o agente causador da criptosporidiose, importante zoonose que acomete homens e animais e está amplamente distribuída no mundo (CHALMERS, 2010). São conhecidas 38 espécies de *Cryptosporidium*, e destas, 20 foram relatadas em humanos, sendo *C. hominis* e *C. parvum* responsáveis pela maioria das infecções (RYAN; FAYER; XIAO, 2014; KHAN; SHAIK; GRIGG, 2018; RYAN; HIJJAWI; XIAO, 2018). Bovinos podem ser infectados por quatro espécies de *Cryptosporidium*, sendo: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* e são importantes reservatórios para as espécies zoonóticas (XIAO, 2010). O oocisto é altamente resistente, permanece longos períodos no ambiente e na água (THOMPSON *et al.*, 2008), é resistente ao cloro e à maioria dos compostos utilizados para o tratamento da água (DUHAIN *et al.*, 2012).

Este parasita acomete principalmente bovinos entre uma a três semanas de idade (LANGONI *et al.*, 2004; CRUVINEL *et al.*, 2019), podendo afetar também animais com mais de um mês e adultos (QUÍLEZ *et al.*, 1996; MEIRELES *et al.*, 2010; TOLEDO *et al.*, 2017). A infecção ocorre via fecal-oral, de forma direta ou indireta (RYAN *et al.*, 2014). Humanos e animais se infectam por meio do contato direto com pessoas e animais infectados (XIAO, 2010), esterco, água e alimentos contaminados (MAWLY *et al.*, 2015). Animais acometidos por criptosporidiose desenvolvem diarreia, desidratação, retardo no crescimento podendo evoluir para um quadro grave de enterite e consequente óbito (FAYER *et al.*, 1990).

No Brasil, Modolo *et al.* (1988) em Botucatu, relataram pela primeira vez a criptosporidiose em bovinos leiteiros ao avaliarem um lote de 23 bezerros, onde foram encontrados resultados positivos em 26% dos animais com menos de 30 dias e 23% de animais com mais de 30 dias. A ocorrência de criptosporidiose costuma ser maior em bovinos leiteiros, devido ao sistema de criação intensivo, que favorece o contato entre os animais e a transmissão do parasita, do que em bezerros criados extensivamente. (MARTINS-VIEIRA; BRITO; HELLER, 2009). As regiões mais estudadas são onde se localizam os estados da bacia leiteira, que compreendem Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Goiás (IBGE, 2017).

As prevalências da criptosporidiose nestes locais variaram de 3% a 64%. Nos estados de Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul um estudo com 361 bezerros leiteiros obteve ocorrência de 50,4% (CRUVINEL *et al.*, 2019). Em Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo a análise de 184 amostras bovinas demonstrou a prevalência de 6,5% (COELHO *et al.*, 2016). Em Minas Gerais, estudos realizados em vários locais com: 130 (OLIVEIRA FILHO *et al.* 2007), 300 (LIMA *et al.*, 2013) e 356 (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2011) amostras obtiveram prevalências de 40%, 5,3% e 21,6% respectivamente. Em São Paulo, estudos foram realizados em diferentes localidades: nas cidades de Pardinho, Botucatu e Itatinga 200 amostras provenientes de vacas e bezerros ocorrência em 14,0% das amostras (PAZ E SILVA; LOPES; ARAÚJO JÚNIOR, 2013); em Teodoro Sampaio, 197 amostras de bovinos foram coletas, obtendo ocorrência de 3,0% (SEVÁ *et al.*, 2010); em Araçatuba, 459 amostras de fezes de bezerros foram coletadas e analisadas, obtendo prevalência de 12,4%

(FEITOSA *et al*, 2004); em fazendas na região noroeste, 196 amostras de bezerros analisadas revelaram uma ocorrência de 10,7% (MEIRELES *et al*, 2011). No Paraná, estudos realizados em diferentes locais com 937 (TOLEDO *et al*, 2017) e 216 (HOLSBACK *et al*, 2018) amostras obtiveram, respectivamente, prevalências de 10,2% e 15,3%.

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença, caracterizar as espécies de *Cryptosporidium* em bezerros de propriedades leiteiras em rebanhos de oito estados brasileiros e determinar possíveis fatores associados à infecção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras e Questionário Epidemiológico

No período de julho de 2016 a junho de 2017 foram recebidas 408 amostras de fezes de bezerros com idade entre um e 60 dias, sintomáticos e não sintomáticos quanto à presença de diarreia. As amostras eram provenientes de 39 propriedades de bovinocultura leiteira que apresentavam histórico de diarreia em bezerros jovens. Somadas estas propriedades totalizaram 40.612 animais. As propriedades estavam localizadas em 33 cidades de oito estados das regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-oeste do Brasil, os estados selecionados representam 80% da produção leiteira do País (IBGE, 2017). A coleta foi realizada de forma randômica por médico veterinário e aplicou-se um questionário epidemiológico ao responsável pelo rebanho, contendo questões referentes ao ambiente, saneamento, manejo sanitário e reprodutivo, características dos animais (idade, sexo) e das amostras enviadas (características das fezes).

2.2 Diagnóstico por coloração e armazenamento

A análise e triagem das amostras foi realizada por meio de esfregaço fecal corado pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981) e posterior leitura em microscópio óptico em objetiva de 40x.

As amostras positivas quanto à presença de *Cryptosporidium* spp. foram classificadas de acordo com o escore de número de oocistos observados por campo (ROBERT *et al.*, 1990) (Anexo 1). Posteriormente as amostras positivas foram acondicionadas em microtubos de 2mL e armazenadas a -20°C.

2.3 Análise Molecular

2.3.1 Extração de DNA

As amostras positivas na coloração de Ziehl-Neelsen foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando *kit* comercial (NucleoSpin Tissue Macherey-Nagel®) conforme protocolo do fabricante, adicionando-se, antes da etapa de lise, três ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento (56°C) com o intuito de promover a ruptura dos oocistos (WELLS *et al*, 2015).

2.3.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (*nested PCR*)

Fragmentos do gene 18SSU rRNA contendo de 823 a 840 pares de base foram amplificados por meio de PCR dupla (*nested PCR*). Utilizou-se para a primeira reação: primers: 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' e 5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3'; 1x PCR Buffer Invitrogen®; 200 µM de dNTPs; 2,5 mM de MgCl₂; 400 nM de cada oligonucleotídeo; 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase; 200 nM BSA; 2,0 µL do DNA extraído e água ultrapura para compor o volume final de 25 µL. O produto da primeira reação foi diluído em 50µL de água ultrapura para dar sequência à segunda reação. Na segunda reação os primers utilizados foram: 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' e 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' (XIAO *et al*, 1999). As condições de amplificação para ambas as reações foram: 5 minutos a 95°C; seguidos por 35 ciclos de 45 s a 94°C (desnaturação); 45 s a 55°C (anelamento); 60 s a 72°C (extensão) e 5 minutos a 72°C (extensão final). Utilizou-se como controle negativo água ultrapura e como controle positivo DNA de *C. parvum*. Os produtos da *nested PCR* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Agarose, LGC Biotecnologia) corado com SYbR Safe® (SYBR1 Safe, Invitrogen, Waltham, MA, USA) e a leitura das bandas foi realizada em fotodocumentadora com luz ultravioleta (UV).

2.3.4 PCR-RFLP

As amostras positivas na *nested-PCR* e que apresentaram escore de três e quatro cruzeiras na técnica de Ziehl-Neelsen, foram submetidas à análise por polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) com as enzimas SSPI, ASEI e MBOII (XIAO *et al*, 1999). As reações foram realizadas utilizando-se 5 µL de DNA produto da segunda reação da *nested PCR*; 1X NEB® Buffer; 1 µL das enzimas de restrição SSPI e MBOII e 0,6 µL da enzima ASEI e água ultrapura completando o volume de 20 µL. O tempo das clivagens foi de duas horas a 37° C e 15 minutos a 65° C para inativação das enzimas. Na sequência as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com SYbR Safe® e fotodocumentadas. Posteriormente os padrões de bandas obtidos foram comparados com imagens contidas em banco de dados Cryptodb (<http://www.cryptodb.org>).

2.4 Análise estatística

Para comparação dos dados foi utilizado o pacote estatístico EpiInfo™ (versão 7.2.2.6; CDC - Atlanta). A análise de significância estatística dos resultados foi realizada por meio dos testes de Qui-quadrado corrigido de Yates ou Exato de Fisher e, como medida de associação, realizou-se o cálculo de *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%. Adotou-se o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Pela técnica de Ziehl-Neelsen 52,9% (216/408) das amostras foram positivas. As amostras eram provenientes de 39 propriedades de bovinocultura leiteira sendo que, em 89,7% (35/39), houve a presença de

Cryptosporidium. Na análise molecular pela técnica da *nested PCR* (nPCR) foi observado 54,6% (118/216) de amostras positivas. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros de propriedades leiteiras com histórico de diarreia de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 2017.

Região	Estados	Propriedades Positivas/Total (%)	Ziehl-Neelsen Positivas/ Total (%)	<i>Nested PCR</i> Positivas/Total (%)
Centro-oeste	GO	2/2	14/24 (58,3)	4 /14 (28,5)
Nordeste	CE	2/2	15/35 (42,8)	5/15 (33,3)
Sudeste	MG	18/19	133/235 (56,6)	75/133 (56,4)
	SP	2/2	10/24 (41,7)	6/10 (60)
	RJ	1/1	7/7 (100)	5/7 (71,4)
Sul	RS	4/5	15/37 (40,5)	10/15 (66,7)
	PR	4/6	14/31 (45,2)	7/14 (50)
	SC	2/2	8/15 (53,3)	6/8 (75)
TOTAL	8	35/39 (89,7)	216/408 (52,9)	118/216 (54,6)

Fonte: o próprio autor.

Na técnica de Ziehl-Neelsen, as amostras foram submetidas à classificação em escore de cruzeiros (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação do resultado de escore pela técnica de coloração Ziehl-Neelsen modificado e *nested PCR* (nPCR) em amostras fecais de bezerros de propriedades leiteiras de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 2017.

Escore em Cruzeiros Ziehl-Neelsen	Resultado nPCR Positivo/Total (%)	Valor p
+	15/55 (27,3)	< 0,0001
++	47/83 (56,6)	
+++	20/29 (69)	
++++	36/49 (73,5)	
TOTAL	118/216 (54,6)	

Fonte: o próprio autor.

Nota: Escore de acordo com Robert *et al.*, 1990.

Sobre as propriedades, houve predomínio das regiões sudeste e sul com, respectivamente, 56,4% e 33,3% das propriedades analisadas. A média de tamanho de rebanho foi de 1041 (± 1057 ; amplitude 80-4200); 78,9% das propriedades relataram produção de leite maior que 250 litros/dia e em 82% a idade de desmame era entre 60 e 90 dias. A reposição dos animais era realizada com rebanho próprio em 74,4% das propriedades. Em 74,4% das propriedades, foi relatado o uso poço artesiano como fonte de água para os animais. Quanto aos bezerros, 71,5% dos animais estavam na faixa etária de sete a 28 dias, e 86,1% eram do sexo feminino. A presença de diarreia foi descrita em 53,7% dos animais (Apêndice 2).

Dentre as variáveis analisadas no questionário epidemiológico aplicado (Tabela 3), a faixa de idade entre 7-|28 dias; animais com diarreia e a fonte de água proveniente de mina foram fatores associados à presença de *Cryptosporidium*. O sistema de produção para bezerros foi um fator associado à proteção da infecção.

Tabela 3. Análise da associação de variáveis de exposição com a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. avaliadas pela técnica de Ziehl-Neelsen, em amostras fecais de bezerros de propriedades leiteiras de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 2017.

Variáveis de exposição	Amostras Positivas/Total (%)	OR(IC95%)	Valor de P
Região			
Sudeste	150 / 266 (56,4)	-	0,150
Sul	37 / 83 (44,6)	-	
Nordeste	15 / 35 (42,8)	-	
Centro-oeste	14 / 24 (58,3)	-	
Produção de leite na propriedade			
Até 50 litros/ dia	27 / 56 (48,2)	1,2 (0,7- 2,1)	0,563
>250 litros/ dia	180 / 337 (53,2)		
Idade			
0- 7 dias*	25 / 107 (23,4)	1	
7- 28 dias	174 / 278 (62,6)	5,2 (3,3-9,1)	<0,001
>28 dias	3 / 4 (75,0)	-	-
Sexo			
Feminino	180 / 330 (54,5)	1,3 (0,7-2,4)	0,394
Masculino	25 / 53 (47,2)		

Continua

Conclusão

Tabela 3. Análise da associação variáveis de exposição com a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. avaliadas pela técnica de Ziehl-Neelsen, em 408 amostras fecais de bezerros de propriedades leiteiras de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 2017.

Variáveis de exposição	Amostras Positivas/Total (%)	OR(IC95%)	Valor de P
Animal com diarreia			
Sim	134 / 212 (63,2)	2,5 (1,7-3,8)	<0,001
Não	73 / 183 (39,9)		
Sistema de produção para bezerros			
Casinha *	64 / 144 (44,4)	1	
Coletivo	71 / 121 (58,6)	1,8 (1,1-2,9)	0,028
Corrente	70 / 119 (58,8)	1,8 (1,1-2,9)	0,027
Fonte de Água - Mina			
Sim	94 / 148 (63,5)	1,9 (1,3-2,9)	0,001
Não	122 / 260 (46,9)		
Fonte de Água Córrego/Rio/Açude/ Represa			
Sim	72 / 138 (52,1)	0,9 (0,6-1,4)	0,906
Não	144 / 270 (53,3)		
Fonte de Água - Poço raso			
Sim	4 / 4(100)	-	0,164
Não	212 / 404 (52,5)		
Fonte de Água –Poço artesiano			
Sim	175 / 325 (53,8)	1,1 (0,7-1,9)	0,547
Não	41 / 83 (49,4)		

Fonte: o próprio autor.

*Categoria de referência

Do total de 118 amostras positivas na nPCR, 56 foram selecionadas para a caracterização das espécies de *Cryptosporidium* pela técnica de RFLP, de acordo com o grau de positividade na técnica de Ziehl Neelsen. Todas as amostras analisadas foram compatíveis com *Cryptosporidium parvum*.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi observado que 52,9% das amostras analisadas pela técnica de Ziehl-Neelsen, foram positivas para *Cryptosporidium* spp. De ocorrência mundial, a criptosporidiose é endêmica principalmente em países em desenvolvimento (HLAVSA; ROELLIG, 2019). Frequências semelhantes ou maiores puderam ser observadas em estudos no Chile 56,1% (115/205) (DÍAS-LEE et al, 2011); no Japão, com 75% (60/80) e no Canadá com 78% (721/919) (TROTZ-WILLIAMS, 2007; KARANIS et al., 2010. No Brasil, Coelho et al. (2016) analisaram bezerros de propriedades distribuídas nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo, e obtiveram frequência de 6,5% (12/184). No Paraná, Toledo et al. (2017), ao estudarem bezerros e vacas de propriedades leiteiras, observaram uma frequência de 10,2% (96/937); Holsback et al. (2018) avaliaram a presença do parasita em bovinos leiteiros e de corte e obtiveram frequências de 8,3% (1/12) das vacas e 26,9% (14/52) dos bezerros de leite; e de 10,8% (4/37) das vacas e 12,2% (14/115) dos bezerros de corte. Esta variação nas frequências observadas entre os estudos pode estar associada às diferentes técnicas diagnósticas (WIDERSTRÖM et al., 2014).

Neste estudo todas as propriedades analisadas relataram presença de diarreia em seus rebanhos leiteiros, e quando avaliadas quanto à presença de *Cryptosporidium*, 89,7% (35/39) das propriedades apresentaram resultado positivo. Desta forma, é possível concluir que nestas propriedades, o *Cryptosporidium* pode ser o agente causador de diarreia nos rebanhos. Em estudo realizado com 207 bezerros com até sete meses de idade, Lee et al. (2019) demonstraram a ampla variedade de agentes etiológicos envolvidos nos quadros diarreicos de bezerros. No Brasil, Cruvinel et al. (2019) observaram que podem ocorrer associações entre esses agentes nos quadros de diarreia em bezerros, sendo as infecções por *Cryptosporidium* um fator de risco para a ocorrência do Rotavirus e vice-versa. No presente estudo, foi possível analisar que existe associação entre a positividade das amostras e a presença de diarreia nos bezerros. Este sinal clínico pode estar associado ao próprio *Cryptosporidium*, que leva a um quadro de má absorção pela atrofia das microvilosidades intestinais ou pela associação com outros agentes (OLIVEIRA; WILMSEN; ROSALINSKI-MORAES, 2012).

Não houve diferença significativa na associação entre a presença de *Cryptosporidium* e o sexo dos animais nas amostras avaliadas. Este achado é compatível com estudos, como o realizado na França por Delafosse et al. (2015) e na Argentina, por Garro et al. (2016).

Animais na faixa de sete a 28 dias mostraram-se mais susceptíveis à infecção por *Cryptosporidium*. Estudos realizados por Cardoso et al (2008), Meireles (2010), Toledo et al. (2017) verificaram que a ocorrência de *Cryptosporidium* era maior em bezerros com até dois meses de vida. Feitosa et al. (2008) descreve a criptosporidiose como grande causadora de diarreia em bezerros com menos de 15 dias de idade. Cruvinel et al. (2019) ao analisar amostras de bezerros até 60 dias, constataram que a faixa etária mais acometida foi de oito a 15 dias, o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo. É provável que este fato esteja relacionado com o sistema imunológico destes animais, que nesta faixa de idade ainda está em desenvolvimento, e com o fato de que, bezerros leiteiros são separados das mães ao

nascimento e mantidos sob condições precárias de higiene, o que, dentre tantos outros fatores, justifica a maior ocorrência do *Cryptosporidium* nesta categoria (HOLSBACK *et al.*, 2018). A queda na eliminação de oocistos conforme avança a idade está associada à maturidade das células intestinais e a uma possível imunidade adquirida após a primeira exposição do animal ao parasita (HARP, 2003; GARRO *et al.*, 2016). É importante ressaltar que bovinos de todas as idades podem estar infectados pelo parasita, e que bovinos adultos são geralmente portadores assintomáticos de algumas espécies, contribuindo para a contaminação ambiental e infecção de bezerros recém-nascidos (MARTINS-VIEIRA; BRITO; HELLER, 2009).

Neste estudo, o sistema de criação “Casinha” foi fator associado à proteção da infecção pelo *Cryptosporidium*, devido ao fato deste sistema evitar a aglomeração, o contato entre animais e o acúmulo de matéria orgânica, que são facilitadores na transmissão do parasita. Neste sistema de casinha, além dos animais estarem separados uns dos outros, existe uma barreira natural formada pela pastagem e a exposição da matéria orgânica à luz solar, que torna inativos uma parcela dos oocistos presentes no ambiente (WALKER *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2015). Manyazewal *et al.* (2018) observaram uma maior prevalência de *Cryptosporidium* em animais mantidos em sistema de manejo intensivo quando comparado com animais criados em sistema extensivo. Maikai *et al.* (2011) afirmam que, em sistemas intensivos e semi-intensivos de fazendas leiteiras, os animais estão restritos ou confinados a uma pequena área, expostos ao contato com outros animais e susceptíveis à infecção pelo parasita, que é eliminado no ambiente esporulado e capaz de infectar outros indivíduos.

O fornecimento de água nas propriedades analisadas mostrou que águas provenientes de mina ofereceram maior risco de infecção para os bezerros do que águas oriundas de outras fontes. Este fato corrobora com achados de Nishi *et al.* (2009) que reportaram a presença do parasita em minas de terras indígenas no Paraná; de Tiyo *et al.*, (2015) que encontraram *Cryptosporidium* em águas provenientes de minas usadas para irrigação de hortaliças e de Toledo *et al.* (2017), que detectaram em amostras provenientes de minas usadas para abastecimento de fazendas leiteiras. A contaminação das águas de mina está geralmente associada à ausência de mata e degradação ambiental no entorno; porosidade do solo, presença de fossa ou esgoto nas proximidades, minas localizadas em partes baixas da propriedade, próximas de pastagens e tanques e encanamentos precários (BRANCO; LEAL; FRANCO, 2011; VAZ *et al.*, 2012). A vegetação atua como barreira para o escoamento de matéria orgânica e impede a erosão e consequente contaminação da água (ANDRADE; SANQUETTA; UGAYA, 2005; VAZ *et al.*, 2012).

Quanto à análise das amostras pela técnica de Ziehl-Neelsen e sua classificação em escore de cruces, foi observado que amostras classificadas como quatro cruces demonstraram maior positividade quando realizada a *nested* PCR do que aquelas classificadas como uma cruz, demonstrando que a sensibilidade da técnica de *nested* PCR aumenta na medida em que aumenta o número de oocistos nas fezes.

Na análise molecular, a espécie encontrada foi *C. parvum* em 100 % das amostras analisadas. Este achado pode estar associado à idade dos animais analisados, pois esta espécie é comum em animais jovens até dois meses, e sua ocorrência diminui conforme aumenta a idade dos bezerros (MEIRELES *et al.*, 2010; TOLEDO *et al.*, 2017). No Paraná, Toledo *et al.* (2017) em seus estudos relataram frequência de 42,2% (27/64) de *C. parvum* em bezerros até dois meses de idade. Na França, Delafosse *et al.*

(2015) relataram 51% (n=968) de *C. parvum* em bezerros leiteiros com idade entre sete e 15 dias de idade. Na Nova Zelândia, Mawly *et al.* (2015) observaram predominância de *C. parvum* em bezerros até 21 dias em 50,5% (49/97) das propriedades analisadas e Smith *et al.* (2014) detectaram *C. parvum* em bezerros com menos de um mês de vida. Na Argentina, Díaz *et al.* (2018) demonstraram *C. parvum* ser a espécie mais frequente, estando presente em animais com e sem diarreia. O fato de *C. parvum* ter sido a única espécie encontrada não exclui a possibilidade de existirem outras espécies do parasita concomitantes, pois alguns estudos sugerem que, infecções por *C. bovis* e *C. ryanae* em animais que estão severamente parasitados por *C. parvum* podem ser suprimidas no diagnóstico, devido ao fato da análise do 18SSU rRNA identificar a espécie que está predominando na amostra (FENG *et al.*, 2007; PLUTZER; KARANIS, 2009). *C. parvum* é a espécie com maior potencial zoonótico e mais encontrada em ambientes rurais, tendo o bovino como importante reservatório para a espécie (XIAO, 2010).

5. CONCLUSÃO

Cryptosporidium spp. está amplamente disseminado nos estados avaliados, tendo sido encontrada a espécie com alto potencial zoonótico, *Cryptosporidium parvum*. Quanto maior o escore de positividade em cruces, por meio da técnica de coloração de ZN, maior a positividade na PCR. A presença de diarreia nos bezerros está associada à criptosporidiose. Bezerros com menos de um mês de vida, na faixa de sete a 28 dias de idade, foram mais acometidos. Bezerros mantidos em sistemas de produção “Casinha” foram menos propensos à infecção pelo parasita, quando comparado aos sistemas coletivos. Água de mina foi um fator associado à presença de *Cryptosporidium* nas propriedades avaliadas.

A circulação da espécie zoonótica do parasita, *C. parvum*, no rebanho bovino de estados brasileiros oferece risco de contaminação do meio ambiente e de infecção aos seres humanos. É necessária uma maior atenção no manejo dos bezerros, principalmente na faixa de sete a 28 dias e nos locais onde ficam abrigados devido a ampla disseminação ambiental dos oocistos, além da preservação e proteção das fontes de água.

REFERÊNCIAS

- Andrade, J., Sanquetta, C.R., & Ugaya, C. (2005). Identificação de áreas prioritárias para recuperação da mata ciliar na UHE Salto Caxias. Espaço energia, 3.
- Branco, N., Leal, D.A.G., & Franco, R.M.B. (2011). A Parasitological Survey of Natural Water Springs and Inhabitants of a Tourist City in Southeastern Brazil. Vector Borne Zoonotic Disease, 12 (5), 410-417. doi: 10.1089/vbz.2011.0679
- Cardoso, J. M. S., Silveira, F. L., Araújo, A.J.U.S., Carvalho, J.C.C., & Kanamura, H. Y. (2008). Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 17(1), 239-242. Doi:10.5747/ca.2016.v12.nesp.000175
- Chalmers, R. M., & Davies, A. P. (2010). Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Experimental Parasitology, 124, 138-146. Doi:10.1016/j.exppara.2009.02.003
- Coelho, W. M. D., Widmer, G., Oliveira, F. P., Amarante, A. F. T., & Bresciani, K. D. S. (2016). Natural infection by *Cryptosporidium* spp. In production animals: first description of subtype IIaA15G2R1 in goat kids and piglets in Brazil. Journal of Tropical Pathology, 45(4), 361-368.
- Cruvinel, L. B., Ayres, H., Zapa, D. M. B., Nicaretta, J. E., Couto, L. F. M., Heller, L. M., Bastos, T. S. A. Cruz, B. C., Soares, V. E., Teixeira, W. F., Oliveira, J. S., Fritzens, J. T., Alfieri, A. A., Freire, R. L., & Lopes, W. D. Z. (2019). Prevalence and risk factors for agents causing diarrhea (Coronavirus, Rotavirus, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., and nematodes helminthes) according to age in dairy calves from Brazil. Tropical Animal Health and Production, 2019. Doi:10.1007/s11250-019-02069-9
- Delafosse, F. A., Chartier, C., Dupuy, M. C., Dumoulin, M., Pors, I., & Paraud, C. (2015). *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. Preventive Veterinary Medicine, 118, 406-412. Doi:10.1016/j.prevetmed.2015.01.005
- Díaz, P., Varcasia, A., Pipia, A.P., Tamponi, C., Sanna, G., Prieto, A., Ruiu, A., Spissu, P., Díez-baños, P., Morrondo, P., & Scala, A. (2018). Molecular characterisation and risk factor analysis of *Cryptosporidium* spp. in calves from Italy. Parasitology Research, 117, 3081-3090. Doi:10.1007/s00436-018-6000-x
- Díaz-Lee, A., Mercado, R., Onuoha, E. O., Ozaki, L. S., Muñoz, V., Martínez, F. J., & Fredes, F. (2011). *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. Veterinary Parasitology, 176 (2-3), 139-144. Doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.001
- Duhain, G. L. M., Minnaar, A., & Buys, E. M. (2012). Effect of chlorine, blanching, freezing, and microwave heating on *Cryptosporidium parvum* viability Inoculated on green peppers. Journal of Food Protection, 75 (5), 936-941. Doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-367
- Feitosa, F. L. F., Shimamura, G. M., Roberto, T., Meireles, M. V., Nunes, C. M., Ciarlini, P. C., & Borges, A. S. (2004). Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. Ciência Rural, Santa Maria, 34(1), 189-193. Doi:10.1590/S0103-84782004000100029
- Feitosa, F. L.F., Shimamura, G. M., Roberto, T., Mendes, L. C. N., Peiró, J. R., Féres, F. C., Bovino, F., Perri, S. H.V., & Meireles, M. V. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarréia em bezerros. Pesquisa Veterinária Brasileira, n.28, v.10, p. 452-456, oct. 2008. Doi:10.1590/S0100-736X2008001000002.

Fayer, R., Speer, C.A., & Dubey, J.P. (1990). General biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidiosis of man and animals* (pp. 1-29). Boca Raton: CRS Press.

Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V., & Xiao, L. (2007). Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, 144 (1-2), 1-9. Doi:10.1016/j.vetpar.2006.10.001

Garro, C. J., Morici, G. E., Utgés, M. E., Tomazic, M. L., & Schnittger, L. Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. (2016). *Parasite Epidemiology and Control*, 1, 36-41. Doi:10.1016/j.parepi.2016.03.008

Harp, J. A. (2003). *Cryptosporidium* and host resistance: historical perspective and some novel approaches. *Animal Health Research Reviews*, 4 (1), 53-62. Doi:10.1079/ahrr200352

Henriksen, S.A., & Pohlenz, J.F.L. (1981). Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22 (3-4), 594-596.

Hlavsa, M. C., Roellig, D. M. (2019). Cryptosporidiosis. Retrieved from <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/cryptosporidiosis>

Holsback, L., Lima, H. E., Vidotto, O., Silva, M. A., Patelli, T. H. C., Martins, F. D. C., & Seixas, M. (2018). Ocorrência de *Cryptosporidium* em ruminantes da mesorregião norte pioneiro do Estado do Paraná, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 27 (2), 248-253. Doi:10.1590/s1984-296120180037

IBGE. Brazilian Institute of Geographic and Statistics. (2017). Available in: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2017> Accessed on 18 jan. 2020.

Karanis, P., Eiji, T., Palomino, L., Boonrod, K., Plutzer, J., Ongerth, J., & Igarashi, I. (2010). First description of *Cryptosporidium bovis* in Japan and diagnosis and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pre-weaned calves in Hokkaido. *Veterinary Parasitology*, 169 (3-4), 387-390. Doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.014

Khan, A., Shaik, J. S., & Grigg, M. E. (2018). Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica*, 184, 1-14. Doi:10.1016/j.actatropica.2017.10.023

Langoni, H., Linhares, A.C., Avila, F.A., Silva, A.V., & Elias, A.O. (2004). Contribuição ao estudo da etiologia das diarreias em bezerros de aptidão leiteira no Estado de São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 41 (5), 313-319. Doi:10.1590/S1413-95962004000500004

Lee, S.H., Kim, H.Y., Choi, E. W., & Kim, D. (2019). Causative agents and epidemiology of diarrhea in Korean native calves. *Journal of Veterinary Science*, 20 (6), 1-13. Doi:10.4142/jvs.2019.20.e64

Li, X., Atwill, E.R., Dunbar, L.A., & Tate, K.W. (2010). Effect of daily temperature fluctuation during the cool season on the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 989-993. Doi: 10.1128/AEM.02103-09

- Lima, R. C. A., Aquino, M. C. C., Inácio, S. V., 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. (2013). Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em bezerros (*Bos taurus* e *Bos indicus*) no município de Formiga, Minas Gerais – Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 34 (6), 3747-3754. Doi:10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3747
- Liu, Y., Dong, S., Kuhlenschmidt, M. S., Kuhlenschmidt, T. B., Drnevich, J., & Nguyen, T. H. (2015). Inactivation mechanisms of *Cryptosporidium parvum* oocysts by solar ultraviolet irradiation. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 1, 188-198. Doi:10.1039/C4EW00079J
- Maikai, B. V., Umoh, J. U., Kwaga, J. K. P., Lawal, I. A., Maikai, V. A., Cama, V., & Xiao, L. (2011). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. *Veterinary Parasitology*, 178 (3-4), 241-245. Doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.048
- Manyazewal, A., Francesca, S., Pal, M., Gezahegn, M., Tesfaye, M., Lucy, M., Teklu, W., & Getachew, T. (2018). Prevalence, risk factors and molecular characterization of *Cryptosporidium* infection in cattle in Addis Ababa and its environs, Ethiopia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 13, 79-84. Doi:10.1016/j.vprsr.2018.03.005
- Martins-Vieira, M. B. C., Brito, L. A. L., & Heller, L. (2009). Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerro infectado experimentalmente. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61 (6), 1454-1458. doi:10.1590/S0102-09352009000600030
- Mawly, J. A. I., Alex, G., Velathanthiri, N., & French, N. (2015). Cross sectional study of prevalence, genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* cycling in New Zealand dairy farms. *Parasites & Vectors*, 8 (240). Doi:10.1186/s13071-015-0855-9
- Meireles, M. V. (2010). *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19, 197–204. Doi:10.1590/S1984-29612010000400002
- Meireles, M. V., Oliveira, F. P., Teixeira, W. F. P., Coelho, W. M. D., & Mendes, L. C. N. (2011). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. *Parasitology Research*, 109 (3), 949-951. Doi:10.1007/s00436-011-2336-1
- Modolo, J. R., Gonçalves, R. C., & Kuchembuck, M. R. G. (1988). Ocorrência de criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu-SP. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 10 (1), 9-10.
- Nishi, L., Bergamasco, R., Toledo, M.J.O., Falavigna, D.L.M., Gome, M.L., Mota, L.T., Guilherme, A.L.F. (2009). *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in the Ivaí Indigenous Land, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9 (5), 543-547. Doi:10.1089/vbz.2008.0021
- Oliveira Filho, J.P., Silva, D.P.G., Pacheco, M.D., Mascarini, M.L., Ribeiro, M.G., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., Stipp, D.T., Barros, B.J.P., & Borges, A.S. (2007). Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27 (10), 419-424. Doi:10.1590/S0100-736X2007001000006
- Oliveira, S., Wilmsen, M.O., & Rosalinski-Moraes, F. (2012). Criptosporidiose em ruminantes: revisão. *Pubvet*, 8 (6), 1307-1312.

- Paz e Silva, F. M., Lopes, R. S., & Araújo-Júnior, J. P. (2013). Identificação de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em bovinos leiteiros no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22 (1), 22-28. Doi:10.1590/S1984-29612013005000010
- Plutzer, J., & Karanis, P. (2009). Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology*, 165, 187-199. Doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.003
- Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., Del Cacho, E., Clavel, A., & Causapé, A.C. (1996). Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, 66, 139-146. Doi:10.1016/s0304-4017(96)01015-1
- Ryan, U., Fayer, R., & Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, 141 (13), 1667-1685. Doi:10.1017/S0031182014001085
- Ryan, U., Hijjawi, N., & Xiao, L. (2018). Foodborne cryptosporidiosis. *International Journal of Parasitology*, 48, 1-12. Doi:10.1016/j.ijpara.2017.09.004
- Robert, B., Ginter, A., Antoine, H., Collard, A., & Coope, P. (1990). Diagnosis of bovine cryptosporidiosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, 37, 1-8. Doi:10.1016/0304-4017(90)90020-c
- Sevá, A. P., Funada, M. R., Souza, S. O., Nava, A., Richtzenhain, L. J., & Soares, R. M. (2010). 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*, 19 (4), 249-253. Doi:10.1590/S1984-29612010000400011
- Smith, R.P., Clifton-Hadley, F.A., Cheney, T., & Giles, M. (2014). Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on farm transmission routes. *Veterinary Parasitology*, 204 (3-4), 111-119. Doi:10.1016/j.vetpar.2014.05.022
- Thompson, R.C. A., Palmer, C. S., & O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 177 (1), 18-25. Doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.022
- Tiyo, R., Souza, C. Z., Nishi, L., Brustolin, C. F., Ratti, B. A., & Falavigna Guilherme, A. L. (2015). Water from different sources used for the irrigation of vegetables to be marketed: Research on *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and coliforms in Paraná, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57 (4), 333-336. Doi:10.1590/S0036-46652015000400010
- Toledo, R. S., Martins, F. D. C., Ferreira, F. P., Almeida, J. C., Ogawa, L., Santos, H. L. E. P. L.; Santos, M. M., Pinheiro, F. A., Navarro, I. T., Garcia, J. L., & Freire, R. L. (2017). *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. *PLOS ONE*, 12 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175311>
- Trotz-Williams, L. A., Martins, S. W., Leslie, K. E., Duffield, T., Nydam, D. V., & Peregrine, A. S. (2007). Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 82, 12-28. Doi:10.1016/j.prevetmed.2007.05.003

- Vaz, L., & Orlando, P.H.K. (2012). Importância das matas ciliares para manutenção da qualidade das águas de nascentes: diagnóstico do ribeirão Vai-Vem de Ipameri-GO. Anais do XXI Encontro Nacional de Geografia Agrária (p.1-20). Uberlândia, MG: UFU.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R, J., Fayer, R., Lal, A. A. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Applied and Environmental Microbiology, 65 (4), 1578-1583.
- Xiao, L., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T.K., Gradus, S., & Lal, A. (2001). Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. Applied and Environmental Microbiology, 67 (3), 1097-1101. doi: 10.1128/AEM.67.3.1097-1101.2001
- Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Experimental Parasitology, Atlanta, 124, 80–89. Doi:10.1016/j.exppara.2009.03.018
- Walker, M., Leddy, K., & Hagar, E. (2001). Effect of combined water potential and temperature stressors on *Cryptosporidium* parvum oocysts. Applied Environmental Microbiology, 67, 5526–5529. Doi:10.1128/AEM.67.12.5526-5529.2001
- Wells, B., Shaw, H., Hotchkiss, E., Gilray, J., Auton, R., Green, J., Katzer, F., Wells, A., & Innes, E. (2015). 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 & Vectors, 8 (66),1-13. Doi:10.1186/s13071-015-0684-x
- Widerstom, M., Schönning, C., Lilja, M., Lebbad, M., Ljung, T., Allestam, G., Ferm, M., Björkholm, B., Hansen, A., Hiltula, J., Langmark, J., Lofdahl, M., Omberg, M., Reuterwall, C., Samuelsson, E., Widgren, K., Wallensten, A., Lindh, J. (2014). Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply. Emerging infectious diseases, 20 (4), 581-589. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2004.121415>

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO

- *Cryptosporidium* spp. está amplamente disseminado nos estados avaliados, tendo sido encontrada a espécie com alto potencial zoonótico, *Cryptosporidium parvum*.
- Quanto maior o escore de positividade em cruces, por meio da técnica de coloração de ZN, maior a positividade na PCR
- A presença de diarreia está associada à criptosporidiose em bezerros.
- Bezerros com menos de um mês de vida, na faixa de sete a 28 dias de idade, foram mais acometidos.
- Bezerros mantidos em sistemas de produção “Casinha” foram menos propensos à infecção pelo parasita, quando comparado aos sistemas coletivos.
- Água de mina foi um fator associado à presença de *Cryptosporidium* nas propriedades avaliadas.

ANEXO I

Escore para classificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (ROBERT *et al.*, 1990).

- (+) Até 3 oocistos por lâmina
- (++) Mais de 3 oocistos por lâmina e até 5 oocistos por campo
- (+++) 5 a 10 oocistos por campo
- (+++++) Mais de 10 oocistos por campo

APÊNDICE 1

Questionário epidemiológico aplicado nas propriedades de bovinocultura leiteira.

Questionário Epidemiológico de Diarreia Bovina

Colaborador da MSD Saúde Animal:	RBU:
Nome da Propriedade:	
Proprietário:	
Interesse da exploração: <input type="checkbox"/> Comercial <input type="checkbox"/> Subsistência	
Cidade:	Estado:
Telefone: ()	E-mail:
Coordenadas: _____ ° _____ ' _____ , _____ "S _____ ° _____ ' _____ , _____ "W	
Área total:	Área construída com instalações:

Questionário Geral

1) Finalidade:

- Produção
 Reprodução

2) Quais atividades pecuárias da propriedade?

- Bovinocultura de corte
 Bovinocultura de leite
 Outras:
-

3) Quais raças são exploradas na propriedade?

4) Qual o tamanho do rebanho?

5) Como é dirigida a reprodução do rebanho?

- Não existe estação de monta
 Estação de monta com touro
 Estação de monta com IATF
 IA com observação de cio
 Outros: _____

6) Diferentes espécies animais dividem o mesmo espaço?

- Não
 Sim, especificar: _____

7) Qual a fonte de alimentação dos animais?

- Pasto
 Forrageira
 Ração
 Silagem
 Outras: _____

8) Se os animais recebem alimentos, qual é o local que é servido:

- Diretamente no chão
 Coxos
 Outros: _____

9) Reposição de animais.

- Rebanho próprio
 Outras propriedades

10) Animais recém-introduzidos são submetidos à quarentena?

- Não
 Sim, especificar período: _____

11) Animais de diferentes categorias são criados em mesmo piquete/ambiente?

- Não
 Sim, descrever quais: _____

12) Algum medicamento (por exemplo monensina ou qualquer outro ionóforo) é fornecido junto à alimentação ou suplementação mineral? Sim Não

Se sim, especificar qual produto e quais categorias o recebem: _____

13) Qual a fonte da água fornecida para os animais?

- Mina
- Poço Raso (até 20 m)
- Poço artesiano
- Córrego ou rio
- Açude/Represa
- Empresa de abastecimento
- Outra: _____

14) Ocorrência de diarreia?

- Não
- Sim

Se sim:

- Diarreia branca
 - Diarreia amarelada
 - Diarreia negra
 - Não acompanhada por sangue
 - Acompanhada por sangue
- Especificar categorias (idade): _____

15) Qual a produção média diária de leite? _____ litros/dia

16) Número de vacas em lactação _____ vacas

17) Como é dirigida a reprodução do rebanho?

- Monta com touro Observação de cio e IA IATF
- IATF + Observação de cio e IA
- Outros: _____

18) Qual o sistema de produção para vacas?

- Free Stall
- Loose Housing
- Compost Barn
- Outro: _____

19) Qual o sistema de produção para bezerros?

Composto de Barn

Corrente

Casinha

se casinha: Suspensa do chão Não suspensa do
chão

Outro: _____

20) Forma de fornecimento de leite:

Direto na vaca

Mamadeira

Balde

Outros: _____

21) Idade à desmama: _____ dias

22) Cria os machos? Não Sim

se sim: juntos as fêmeas separados das
fêmeas

Relação dos animais

Breve Histórico:

Ord	Número	Idade	Sexo	Presença Diarreia		Ord	Número	Idade	Sexo	Presença Diarreia
1						26				
2						27				
3						28				
4						29				
5						30				
6						31				
7						32				
8						33				
9						34				
10						35				
11						36				
12						37				
13						38				
14						39				
15						40				
16						41				
17						42				
18						43				
19						44				
20						45				
21						46				
22						47				
23						48				
24						49				
25						50				

APÊNDICE 2

Tabela. Frequência das variáveis de exposição analisadas em 39 propriedades leiteiras de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 2017.

Variáveis de exposição bezerras	Frequência (%)
Idade	
0 - 7 dias	107 (27,5)
7 - 28 dias	278 (71,5)
> 28 dias	4 (1,0)
TOTAL	389 (100)
Sexo	
Feminino	330 (86,1)
Masculino	53 (13,8)
TOTAL	383 (100)
Diarreia nos bezerras	
Sim	212 (53,7)
Não	183 (46,3)
TOTAL	395 (100)
Variáveis de exposição propriedade	
Interesse da Exploração	
Comercial	30 (77)
Comercial e subsistência	9 (23)
TOTAL	39 (100)
Finalidade	
Produção	22 (56,4)
Produção e reprodução	17 (43,6)
TOTAL	39 (100)
Região	
Sudeste	22 (56,4)
Sul	13 (33,3)
Centro-oeste	2 (5,1)
Nordeste	2 (5,1)
TOTAL	39 (100)
Estado (UF)	
MG	19 (48,7)
PR	6 (15,4)
RS	5 (12,8)
CE	2 (5,1)
GO	2 (5,1)
SC	2 (5,1)
SP	2 (5,1)
RJ	1 (2,7)
TOTAL	39 (100)

Continua

Conclusão

Tabela. Frequência das variáveis de exposição analisadas em 39 propriedades leiteiras de oito estados do Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 2017.

Variáveis de exposição propriedade	Frequência (%)
Tamanho do Rebanho	
80 - 328	8 (20,5)
328 - 581	10 (25,6)
581 - 1200	12 (30,8)
>1200	9 (23,1)
TOTAL	39 (100)
Média 1041 ±1057; Mediana 600; Amplitude 80-4200	
Produção média de leite (diária)	
Até 50 litros/dia	8 (21)
>250 litros/dia	30 (78,9)
TOTAL	38 (100)
Idade à desmama	
0 - 60 dias	5 (12,8)
60 - 90 dias	32 (82)
90 - 120 dias	2 (5,1)
TOTAL	39
Reposição dos animais	
Rebanho próprio	29 (74,4)
Outras propriedades	9 (23)
Rebanho próprio e outras propriedades	1 (2,6)
TOTAL	39 (100)
Fonte de água	
Poço artesiano	29 (74,4)
Córrego/Rio/Açude/Represa	17 (43,4)
Mina	14 (35,9)
Poço Raso	1 (2,6)
TOTAL	39*

Fonte: o próprio autor.

*Propriedades selecionaram mais que uma categoria da mesma variável.