

DARLAN RODRIGUES MACEDO

**CRIPTOSPORIDIOSE EM RUMINANTES E SUA IMPORTÂNCIA EM
SAÚDE PÚBLICA**

GARANHUNS

2018

DARLAN RODRIGUES MACEDO

**CRIPTOSPORIDIOSE EM RUMINANTES E SUA IMPORTÂNCIA EM
SAÚDE PÚBLICA**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária – Sanidade de Ruminantes, realizado na Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Preceptor: MSc. Jobson Filipe de Paula Cajueiro

GARANHUNS

2018

DARLAN RODRIGUES MACEDO

**CRIPTOSPORIDIOSE EM RUMINANTES E SUA IMPORTÂNCIA EM
SAÚDE PÚBLICA**

Monografia apresentada ao Programa de
Residência em Área Profissional de Saúde
em Medicina Veterinária – Sanidade de
Ruminantes, realizado na Clínica de
Bovinos, Campus Garanhuns, Universidade
Federal Rural de Pernambuco.

Aprovada em: 21/12/2018

BANCA EXAMINADORA

MSc. Jobson Filipe de Paula Cajueiro
Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns/UFRPE
Preceptor

Profa. Dra. Gílcia Aparecida de Carvalho
Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

Dr. José Augusto Bastos Afonso
Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns/UFRPE

AGRADECIMENTOS

A minha família e amigos que, mesmo sem saber ao certo o que faço, me apoiam em todos os momentos e decisões que tomo. Meu muito obrigado.

Ao professor Joselito Nunes Costa, que além de professor excepcional, um amigo, conselheiro e mostrou-me a beleza da medicina veterinária e as conquistas que esta poderia me proporcionar. Por revelar-me um mundo que não conhecia. Com certeza conseguir entrar neste programa de residência foi fruto de um trabalho prazeroso e gratificante vivido ao seu lado.

À Clínica de Bovinos de Garanhuns, toda sua equipe técnica: Dr. Nivaldo de Azevedo Costa, Dr. José Augusto Bastos Afonso, Dra. Carla Lopes de Mendonça, Dr. Jobson Filipe de Paula Cajueiro, Dr. Rodolfo Cavalcanti Souto, Dra. Maria Isabel Souza e Dr. Luiz Teles Coutinho, pelo exemplo de amor e dedicação à buiatria, pelo acolhimento, conselhos, paciência e oportunidade de aprendizado. Meu muito obrigado.

Toda equipe de apoio: Mano, Antônio, Timóteo, Luciano, Kelvin, Alexandre, Edson, Everaldo, Jaqueline, Monteiro, Cícero, Gago, Lucas, Jucélio, Rose, Dona Selma, Ivanilda, Cilene, Elaine, Luciana, por toda ajuda, atenção e por tornarem os dias mais fáceis.

Aos colegas residentes, Ana Clara, Ângela Imperiano, Laís Resende, Tatiane Vitor, Nitalmo Leite, Thayrlla Polessa, Lucas Spósito e Bárbara Alves, em especial a Lucas Dutra pela amizade, convivência, ajuda e companheirismo.

Aos colegas da pós-graduação Léo, Regina, Uila, Rodolpho, Beth, todos estagiários em especial a Eduardo (gaúcho), Eldon, Ernando, Maell, Wendell, Eugênio, Marcelo, Evandro, Geovane, Waléssia, Yanca, Álvaro, Tereza e demais colegas. A todos muito obrigado pela ajuda e pelos bons momentos vividos e claro pela paciência que tiveram comigo.

A Eliene pela atenção, cuidados e momentos de descontração.

Ao Jack, pela capacidade incrível de resiliência, por nos mostrar que não devemos desistir nunca daquilo que queremos e pelo grande amor à vida.

Aos criadores pela confiança em nosso trabalho, mesmo com as dificuldades da lida diária não desistem e enfrentam essas adversidades com coragem e dignidade. Espero ter ajudado de alguma forma.

“Estudar os fenômenos das doenças sem o auxílio dos livros é como navegar em mar desconhecido, enquanto estudar os livros sem os pacientes é não estar em mar algum”.

Sir. Willian Osler.

A caminhada foi árdua, os dias longos e o fardo pesado, porém, valeu a pena cada momento longe de tudo aquilo que me fez e me faz ser o que sou, família e amigos. Sei que não posso mudar o começo, mas talvez possa mudar o final.

Darlan Rodrigues

“Vim, vi e venci”

Júlio César

RESUMO

A criptosporidiose é uma importante enfermidade na criação de bovinos, sendo os bezerros até 30 dias de idade a categoria mais susceptível. Os agentes etiológicos são protozoários do gênero *Cryptosporidium*, que completam seu ciclo em células do epitélio respiratório, urinário e do trato gastrointestinal de aves, répteis e mamíferos inclusive o homem. A via de infecção é a fecal-oral. A infecção ocorre após ingestão de alimentos e água contaminada com oocistos esporulados, os quais contém esporozoítos em seu interior. Animais de produção principalmente bezerros são as principais fontes de contaminação ambiental e, portanto um importante fator de risco para outros animais e o homem. A manifestação clínica da doença é decorrente das lesões no trato gastrointestinal que ocorrem através da ruptura dos enterócitos cursando com diarreia aquosa e persistente. A diarreia é a principal causa de morte em bezerros até 30 dias de idade, sendo um dos principais agentes *Cryptosporidium* sp. A criptosporidiose é uma zoonose de distribuição mundial, sendo crianças de 1 a 5 anos de idade, adultos transplantados e indivíduos imunocomprometidos, grupos de alto risco, em que este enteroparasito pode ocasionar enterite grave, podendo levar à morte. Contudo adultos imunocompetentes podem apresentar episódios diarreicos. Os fatores de risco incluem contato com animais doentes ou portadores, aliados a falta de hábitos higiênicos adequados e saneamento básico. A profilaxia consiste na vacinação de vacas prenhes, uso de alguns fármacos que ajudam na prevenção das diarreias e bem como reduzem a quantidade de oocistos eliminados nas fezes, administração correta de colostro e nos casos dos animais doentes terapia de suporte para o reestabelecimento do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-básico. Outros fatores como a resistência do parasito no ambiente e aos desinfetantes, falta de conhecimento pelos profissionais de saúde sobre a epidemiologia e métodos diagnósticos e o tratamento ineficaz, tornam essa doença um grande problema de saúde pública no mundo.

Palavras-chave: Bezerros. *Cryptosporidium* spp.. Diarreia. Saúde pública. Zoonose.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is an important disease in cattle breeding, calves up to 30 days of age being the most susceptible category. The etiological agents are protozoans of the genus *Cryptosporidium*, which complete their cycle in respiratory, urinary and gastrointestinal epithelial cells of birds, reptiles and mammals including man. The route of infection is fecal-oral. The infection occurs after ingestion of food and water contaminated with sporulated oocysts, which contain sporozoites inside. Production animals mainly calves are the main sources of environmental contamination and therefore an important risk factor for other animals and man. The clinical manifestation of the disease is due to the lesions in the gastrointestinal tract that occur through the rupture of enterocytes with persistent and watery diarrhea. Diarrhea is the main cause of death in calves up to 30 days old, being one of the main agents *Cryptosporidium* sp. Cryptosporidiosis is a zoonosis with a worldwide distribution, with children between the ages of 1 and 5 years, adults being transplanted and immunocompromised individuals, high risk groups, where this enteroparasite can cause severe enteritis and may lead to death. However, immunocompetent adults may present with diarrheal episodes. Diarrhea is the main cause of death in calves up to 30 days old, being one of the main agents *Cryptosporidium* sp. Cryptosporidiosis is a zoonosis with a worldwide distribution, being children from 1 to 5 years of age, transplanted adults and immunocompromised individuals, high risk groups, in which this enteroparasite can cause serious enteritis and may lead to death. However, immunocompetent adults may present with diarrheal episodes. Risk factors include contact with sick animals or carriers, together with lack of adequate hygiene habits and basic sanitation. Prophylaxis consists of vaccination of pregnant cows, the use of some drugs that help prevent diarrhea, as well as reduce the amount of oocysts removed in the faeces, correct administration of colostrum and, in cases of sick animals, supportive therapy for the reestablishment of the hydroelectrolytic balance and basic acid. Other factors such as parasite resistance in the environment and disinfectants, lack of knowledge by health professionals about epidemiology and diagnostic methods, and ineffective treatment make it a major public health problem in the world.

Key words: Calves. *Cryptosporidium* spp.. Diarrhea. Public health. Zoonoses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-Ciclo biológico do <i>Cryptosporidium</i> spp.....	17
FIGURA 2-Mecanismos da diarreia desencadeados pelo <i>Cryptosporidium</i> spp.....	24
FIGURA 3 -Bezerro apresentando diarreia devido a infecção por <i>Cryptosporidium</i> <i>parvum</i>	25
FIGURA 4 -Oocistos do gênero <i>Cryptosporidium</i> em fezes de bezerros Técnica de Ziehl Neelsen modificada.....	27
-Formas parasitárias de <i>Cryptosporidium</i> spp. aderidas à superfície das FIGURA 5 vilosidades.....	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> e seus hospedeiros.....	15
TABELA 2	Valores aproximados das medidas do oocisto esporulado de <i>Cryptosporidium</i> spp. encontrados por vários autores.....	26
TABELA 3	Valores aproximados das medidas de estruturas de importância para medicina veterinária.....	27

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Método de coloração com Azul de Metileno	29
QUADRO 2	Técnica de centrifugo sedimentação	29
QUADRO 3	Técnica de Ziehl-Neelsen modificada	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO.....	14
2.2	CICLO BIOLÓGICO.....	16
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	17
2.3.1	FATORES DE RISCO.....	23
2.4	PATOGENIA.....	23
2.5	SINAIS CLÍNICOS.....	24
2.6	DIAGNÓSTICO.....	26
2.7	IMPACTO NA SANIDADE DE BEZERROS.....	30
2.8	IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA.....	31
2.9	CONTROLE E PREVENÇÃO.....	32
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é causada por protozoários do gênero *Cryptosporidium*, que são parasitos intracelulares obrigatórios. O resultado de sua infecção é uma má absorção intestinal culminando quase sempre com diarreia. Dentre os hospedeiros estão animais domésticos e o homem. Indivíduos neonatos e imunocomprometidos são mais susceptíveis a ação do parasito, pois apresentam agravamento dos sinais clínicos e casos de mortalidade.

Considerando a doença em bovinos sabe-se que a interação entre o neonato e fatores como imunidade, ambiente, nutrição e enteropatógenos, levam quase sempre esses animais a apresentarem uma sintomatologia clínica semelhante para a maioria dos casos: aumento na frequência de defecação ou no volume das fezes e de consistência variando de pastosa a liquefeitas, caracterizando assim um quadro de diarreia. Outras consequências desta síndrome seriam desidratação, acidose metabólica, desequilíbrio hidroeletrólítico, além de balanço energético negativo com ou sem hipoglicemia (LANGONI et al. 2004; FREITAS, 2009).

Tzipori et al. (1983) constataram que *Cryptosporidium* é um agente determinante primário no desenvolvimento da diarreia e ressaltam, a sua importância, juntamente com os demais agentes bacterianos e virais, no complexo etiológico das diarreias de bezerros neonatos. Os enteropatógenos mais importantes são: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Coronavírus*, *Rotavírus*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* sp. e *Eimeria* spp., (TZIPORI et al. 1980; CARVALHO et al. 2014). Dentre os quais destaca-se *Cryptosporidium* sp. por sua distribuição cosmopolita, importância e por serem enteroparasitos que infectam uma ampla gama de hospedeiros, cerca de 150 espécies inclusive o homem (RIEUX et al. 2013; SMITH; NICHOLS, 2010).

No ano de 1907, Ernest Edward Tizzer, relatou o primeiro caso de infecção pelo agente em camundongos que recebera o nome de *Cryptosporidium muris* (do latim, *Crypto*: oculto, ausente e *Sporidium*: esporo), sendo essas estruturas encontradas no epitélio gástrico de ratos de laboratório. Em bovinos a criptosporidiose foi descrita apenas em 1971, como causa de uma diarreia severa (STERLING; ARROWOOD, 1992), O primeiro relato em cabritos ocorreu na Austrália (MASON et al. 1981) e no Brasil, apenas em 1997, Vieira e colaboradores, diagnosticaram criptosporidiose em caprinos. Em humanos o primeiro caso de criptosporidiose foi diagnosticada através de biopsia intestinal e retal (MEISEL et al., 1976).

As perdas econômicas causadas por este protozoário são decorrentes principalmente das diarreias e atraso de crescimento nos rebanhos o que é considerável, além dos índices elevados de mortalidade de bezerros até três semanas de idade, ocasião em que somente a diarreia contribui com 50% a 75% dessas mortes (LANGONI et al. 2004; COSENDEY et al., 2008; FREITAS, 2009).

Por tratar-se de uma zoonose de distribuição mundial, a criptosporidiose vem sendo estudada em razão de sua importância em saúde pública, pois são crescentes os episódios diarreicos em crianças e também em adultos imunocompetentes, nos quais a maioria dos casos evoluem para a cura espontânea (THOMPSON, 2008). Contudo, este enteroparasito pode ocasionar enterite grave principalmente em indivíduos imunocomprometidos, associada quase sempre a desidratação e desnutrição, muitas vezes fatal, principalmente em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ROSSIT et al., 2007).

As gastroenterites são as principais enfermidades que acometem crianças de 1 a 4 anos de idade e ainda são as principais causas de mortalidade infantil tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (ALVERCA et al., 2000; MEDEIROS et al., 2001). A criptosporidiose é a segunda maior causa de diarreia em crianças, podendo responder por cerca de 30-50% das mortes em crianças até 5 anos (OCHOA et al., 2004; SNELLING et al., 2007; STRIEPEN, 2013). Esta doença ainda é um grande problema de saúde pública, em grande parte, por não haver tratamento eficaz (ASHBOLT, 2004).

Inicialmente acreditava-se que o *Cryptosporidium* spp tratava-se de um patógeno oportunista sendo um problema apenas para pessoas imunocomprometidas. Contudo, devido aos impactos causados à saúde pública e com os crescentes números de casos em crianças e adultos imunocompetentes, a Organização Mundial de Saúde pôs em evidência a importância desse parasito no cenário mundial (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Em razão da destacada importância da criptosporidiose tanto na produção animal quanto na saúde pública este trabalho se propõe a fazer uma revisão de literatura abordando a importância desta doença na sanidade de bezerros e seus aspectos zoonóticos mais importantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Segundo Cavalier-Smith (2014) o gênero *Cryptosporidium* apresenta a seguinte reclassificação sistemática:

Reino: *Protista*

Sub-Reino: Protozoa

Phylum: Apicomplexa

Classe: Gregarinomorphea

Subclasse: Cryptogregaria

Ordem: Eucoccidea

Sub-Ordem: Eimeriina

Família: Cryptosporidiidae

Gênero: *Cryptosporidium*

Até recentemente, *Cryptosporidium* sp. foi classificado como um parasito coccidiano, no entanto, há algum tempo especula-se que há semelhanças entre o *Cryptosporidium* sp. e o gênero *Gregarina* sp. esses últimos são protozoários que infectam principalmente invertebrados. Contudo, essas semelhanças foram comprovadas por extensos dados microscópicos, moleculares, genômicos e bioquímicos (HIJJAWI et al., 2004; ROSALES et al., 2005; BARTA; THOMPSON, 2006; BUTAEVA et al., 2006; PAZIEWSKA-HARRIS et al., 2016). Esses estudos serviram de base para a transferência formal de *Cryptosporidium* da subclasse Coccidia, classe Coccidiomorphea para uma nova subclasse, Cryptogregaria, dentro da classe Gregarinomorphea. O gênero *Cryptosporidium* é atualmente o membro único da subclasse Cryptogregaria (CAVALIER-SMITH, 2014).

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN), uma vez que uma espécie foi formalmente reclassificada em uma revista publicamente disponível, então essa reclassificação permanece (exceto, seja contestada na literatura). Como esta reclassificação não foi contestada, *Cryptosporidium* é agora oficialmente *gregarine* (KARANIS; ALDEYARBI, 2011; CLODE et al., 2015; ALDEYARBI; KARANIS, 2016a; 2016b; 2016c).

Com o advento de novas técnicas, como biologia molecular, permitiu-se a identificação até o momento de 21 espécies e cerca de 61 genótipos de *Cryptosporidium* (SMITH; NICHOLS, 2010). A Tabela 01 lista as principais espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros. São microrganismos intracelulares e extracitoplasmáticos, com ciclo direto, monoxeno, sua forma infectante são os oocistos esporulados (BOWMAN, 2010), estas estruturas microscópicas que medem aproximadamente 5 µm, permanecem viáveis por mais de 24 semanas em ambientes com temperaturas e condições de umidade adequadas (FAYER, 2008).

TABELA 01- Espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros.

Espécie de <i>Cryptosporidium</i>	Hospedeiro	Autores
<i>C. parvum</i>	mamíferos e roedores	Fayer et al. (2000)
<i>C. meleagridis</i>	aves	Fayer et al. (2000)
<i>C. baileyi</i>	aves	Thompson (2008)
<i>C. serpentis</i>	répteis	Thompson (2008)
<i>C. saurophillum</i>	répteis	Thompson (2008)
<i>C. nasorum</i>	peixes	Thompson (2008)
<i>C. felis</i>	felinos	Thompson (2008)
<i>C. wairi</i>	porquinho da índia	Thompson (2008)
<i>C. andersoni</i>	bovinos	Thompson (2008)
<i>C. bovis</i>	bovinos	Thompson (2008)

Dentre as espécies que merecem destaque está *C. parvum*, sendo portanto a espécie mais estudada, sobretudo, pela capacidade de infectar uma gama de hospedeiros e por sua patogenicidade para bovinos, ovinos, caprinos além do seu potencial zoonótico (RAMIREZ et al., 2004; XIÃO; FAYER, 2008; XIÃO, 2010). Além de *C. parvum*, existem duas espécies que são encontradas com frequência causando doença em bovinos são elas: *C. andersoni* e *C. bovis*. os quais também já foram isolados em ovinos (XIAO; FAYER, 2008).

Nas aves domésticas como perus, galinhas, papagaios e calopsitas, *C. meleagridis* tem grande importância não somente por causar sérios danos à criação (MORGAN et al., 2000; VARGA, 2000), mas sobretudo, pelo caráter zoonótico, sendo considerado semelhante ao *C. parvum* (CHALMERS; GILES, 2010; INSULANDER et al., 2013).

Segundo Caccio et al. (2005) as duas espécies de *Cryptosporidium* mais diagnosticadas em humanos são *C. parvum* e *C. hominis*, também, outras espécies como: *C. canis*, *C. felis*, *C. suis* e *C. muris*, esse último reclassificado como *C. andersoni* são diagnosticados infectando

humanos. No entanto, foi sugerido por muitos autores que todas as espécies de *Cryptosporidium* possuam potencial zoonótico (FELTUS et al., 2006).

2.2 CICLO BIOLÓGICO

Parasitos do gênero *Cryptosporidium* apresentam ciclo biológico semelhante aos coccídeos, também incluindo uma fase assexuada e outra sexuada, sendo considerado um parasito monoxeno (FAYER et al., 1990). A infecção do hospedeiro ocorre pela ingestão de oocistos esporulados, cada oocisto apresenta quatro esporozoítos. Os oocistos esporulados representam o estágio infectante do parasito, responsável pela transmissão e pela manutenção do parasito no ambiente, uma vez que são liberados aos milhões nas fezes de animais doentes ou ainda de animais portadores, onde permanecem viáveis por meses (ENTRALA et al., 2000; BOWMAN, 2010).

Após a ingestão dos oocistos esporulados, estes são expostos à algumas enzimas digestivas, ocorrendo seu rompimento e consequente liberação dos esporozoítos, que invadem os enterócitos, principalmente as vilosidades e nestes após a adesão há formação de vacúolos parasitófagos devido à invaginação pela membrana da célula hospedeira, no entanto este processo pode ocorrer em células epiteliais do trato respiratório, urinário, gastrointestinal, da conjuntiva e árvore biliar (STERLING; ARROWOOD, 1992) e também em células do abomaso somente por *C. andersoni* (LINDSAY et al., 2000). Esta localização na célula é descrita como intracelular, e extracitoplasmática, o que é explicado por sua localização no epitélio intestinal, pois mesmo sendo na superfície encontra-se logo abaixo da membrana da célula, por ocasião da invaginação (ABRAHAMSEN et al., 2004; XIAO et al., 2004).

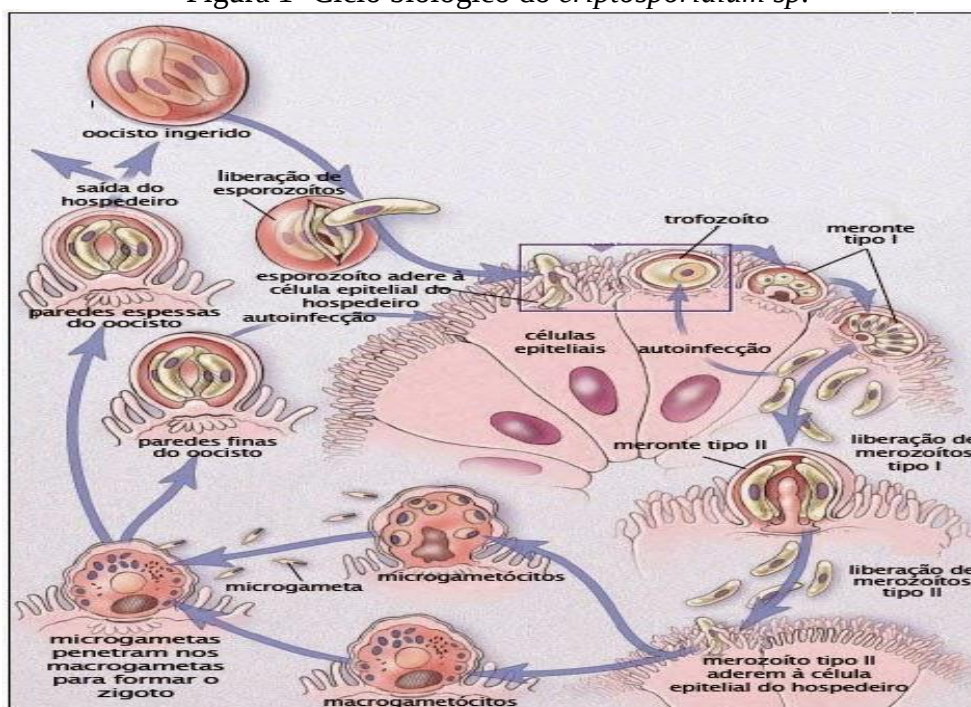
Uma vez no interior dos vacúolos, os esporozoítos perdem o complexo apical e desenvolvem para esquizontes, os quais dão origem a primeira geração de merozoítos, cada esquizonte pode dar origem de quatro a oito merozoítos. Com a ruptura do merócito e da membrana celular do enterócitos, há a liberação dos merozoítos que invadem novas células hospedeiras e produzem a segunda geração de merozoítos, esse processo de reprodução assexuada, comum para vários coccídeos é chamado de esquizogonia (URQUHART et al., 1998; FAYER, 2008; BOWMAN, 2010).

O passo seguinte em seu ciclo biológico é a reprodução sexuada ou gametogonia, que ocorre logo após a diferenciação dos merócitos de segunda geração em macrogametócitos e microgametócitos (gametas femininas e masculinos, respectivamente). Após a fusão dos

núcleos dos macrogametócitos e microgametócitos, surgem os zigotos ou células ovo, que se diferenciam em oocistos (URQUHART et al., 1998; BOWMAN, 2010).

Os oocistos são produzidos e liberados aos milhões juntos às fezes e somente após esporulação no ambiente passam para a forma infectante do parasito. É descrito um período pré-patente para bovinos que pode oscilar de 2 a 9 dias, sendo sujeito a variações por fatores como idade, imunidade, estado nutricional e carga parasitária ingerida pelo hospedeiro, chegando até 14 dias (ORTOLANI, 1988). Existem dois tipos de oocistos. Os oocistos de parede espessa representam cerca de 80% do total de oocistos produzidos, e estes esporulam apenas quando são liberados no ambiente, adquirindo assim sua forma infectante. Os 20% restantes são oocistos de parede fina, os quais são importantes na auto-infecção uma vez que ocorre a esporulação e rompimento de sua delgada parede ainda no lúmen intestinal do hospedeiro liberando assim os esporozoítos (ORTOLANI, 1988; BOWMAN, 2010). A Figura 01 ilustra o ciclo biológico completo do gênero *Cryptosporidium*.

Figura 1- Ciclo biológico do *criptosporidium* sp.



Fonte: Esquema do ciclo de vida do *Cryptosporidium parvum*. Ilustração adaptada de: XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. Criptosporidiose. N Engl J Med. 2002; 346:1723-31.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A criptosporidiose é uma doença emergente e de distribuição mundial, a infecção ocorre obrigatoriamente via fecal-oral, o que pode ser facilitado pelo contato animal-animal ou água

e alimentos contaminados com oocistos esporulados, os quais são formas infectantes do parasito. Portanto, sistemas intensivos de produção que proporcionam ambiente com maior umidade devido o acúmulo de fezes aumentam as chances de infecção pelo agente. (CONSENDEY et al., 2008).

A doença é um sério problema principalmente em bezerros até 30 dias de idade, essa categoria é mais susceptível e pode desenvolver quadros de diarreia (ORTOLANI; SOARES, 2003; SANTÍN et al., 2004), sua morbidade varia de 9 a 85%, e sua mortalidade normalmente é baixa. Contudo, acontecem infecções brandas em bovinos de todas as idades especialmente em adultos jovens por *C. andersoni* (LINDSAY et al. 2000; XIAO; FAYER, 2008).

No Brasil, pesquisas realizadas com amostras fecais de bezerros até 90 dias de idade revelaram que a prevalência para *Cryptosporidium* spp. varia de 0,6 a 72,1%, em muitos casos com a presença de sinais clínicos como diarreia, seja agindo de forma isolada ou associado a outros patógenos (FEITOSA et al., 2004; LANGONI et al., 2004; OLIVEIRA FILHO et al., 2007; CARDOSO et al., 2008; FEITOSA et al., 2008).

Surpreendentemente o número de bezerros positivos para criptosporidiose é maior no sistema de criação pré-empresarial em relação aos animais criados em sistema de produção familiar (ALMEIDA, 2006; FEITOSA et al., 2004). Devendo-se isso, possivelmente, aos métodos de manejo empregados nos sistemas de produção intensiva os quais exigem demais dos animais, diminuindo o status imune e esses provavelmente chegam ao limite fisiológico de produção. Este fator pode acarretar estresse metabólico e maior eliminação dos oocistos por animais adultos e consequente contaminação dos bezerros (WOUDA et al., 1999).

No entanto, esta doença também pode ser encontrada em bezerros de corte criados extensivamente, haja vista que Oliveira-filho et al. (2007), trabalhando com bezerros nelore, encontraram que 30% dos animais com diarreia foram positivos para *Cryptosporidium* spp e 10% dos animais hígidos também. Portanto, estes autores concluíram que estes últimos são portadores assintomáticos, reservatórios e fonte de contaminação do meio ambiente. Entretanto, bezerros doentes são a maior fonte de contaminação, uma vez que os recém-nascidos infectados eliminam milhões de oocistos por grama de fezes (Oopg) (De GRAAF et al., 1999a).

Feitosa et al. (2004) analisaram 459 amostras fecais de bezerros com até 30 dias de idade, na região de Araçatuba-SP, Brasil, destas 36,1% foram positivas para *Cryptosporidium*

sp. Com relação à idade a maior ocorrência foi constatada em bezerros com até 7 dias de idade (14,7%), seguida de bezerros de 8 a 14 dias (14,5%) e menor taxa em animais mais velhos com 15 a 30 dias de vida (7,6%). Três bezerros foram positivos para *Cryptosporidium sp.* às 24 horas de vida, indicando que foram infectados logo após o nascimento, contudo, como o período pré-patente é maior que 24 horas, provavelmente esses oocistos tenham sido ingeridos e eliminados de forma passiva, sem que houvesse o desencistamento (liberação dos esporozoítos), como já observado em outros vertebrados (GRACZYK et al. 1996).

Vacas no pós-parto parecem ter um grande papel na contaminação ambiental pela eliminação de oocistos do *C. bovis* e manutenção da criptosporidiose nas propriedades, com prevalência chegando a 42% nesta categoria animal, comportando-se como reservatórios do parasito (FEITOSA et al., 2004).

Em uma propriedade no município de Cristal-RS, ocorreram dois surtos de criptosporidiose, o primeiro no ano de 2011, onde morreram 70 bezerros e o segundo surto ocorrido em 2012, em um lote de 400 bezerros, dos quais 35 (8,75%) adoeceram e 16 (4%) morreram. Os bovinos eram fêmeas de aproximadamente 30-45 dias de idade, sem raça definida. Os bezerros nasciam fracos e logo após o nascimento apresentavam diarreia amarela, emagrecimento progressivo, desidratação, depressão e morte entre 10 e 15 dias após o início dos sinais clínicos. Esses animais eram criados extensivamente em campo nativo, o quadro clínico foi o mesmo e os dois surtos ocorreram exatamente na época de parição, quando as vacas eliminam o maior número de oocistos nas fezes e foram realocadas para o mesmo piquete maternidade (VARGAS et al., 2014).

Animais susceptíveis podem se infectar com a ingestão de apenas nove oocistos esporulados dependendo da amostra (FAYER et al., 2000). Esses oocistos mantêm sua infectividade por aproximadamente seis meses, sob condições ambientais favoráveis como 20° C, e três meses sob temperatura entre 25 e 30° C. São sensíveis à dessecação, ao congelamento e às temperaturas de 55°C/30 segundos ou 70°C/5 segundos (FAYER et al., 1998; FUJINO et al., 2002; SUNNOTEL et al., 2006).

Para alguns autores, esse período de sobrevivência dos oocistos no ambiente são menores e condicionados às condições as quais são expostos, sendo de quatro horas em ambientes secos e 72 horas quando são eliminados por fezes diarreicas. Também esses oocistos são altamente resistentes aos desinfetantes usuais na prática hospitalar, incluindo

cloro e glutaraldeído, sendo sensíveis ao Peróxido de Hidrogênio a 6% ou 7,5% (BARBEE et al., 1999).

Assim como ocorre com a maior parte das doenças transmitidas pela via fecal-oral, a infecção está diretamente ligada ao manejo sanitário do rebanho, ou seja, naquelas propriedades com piores condições higiênico-sanitárias, com manejo nutricional precário e inadequado fornecimento de colostro, ocorre um maior número de casos de diarreia. Em contra partida, o estado de portador assintomático é maior em propriedades com melhor manejo sanitário (BOMFIM & LOPEZ, 1995; De GRAAF et al. 1999a; ORTOLANI & SOARES, 2003; CONSENDEY et al. 2008).

A eliminação de oocistos de diferentes espécies de *Cryptosporidium* está relacionada com a idade de seus hospedeiros. Santín et al. (2004) trabalhando com bezerros leiteiros desmamados com idade entre dois e onze meses, oriundos de 15 fazendas norte- americanas, encontraram prevalência de 9 a 66%. Destes, 55% apresentaram *C. bovis*; 31% genótipo cervídeo; 13% *C. andersoni* e 1% *C. parvum*. Ao relacionar a idade dos bezerros com as espécies dos oocistos eliminados foi observado que animais dos dois aos sete meses de idade eliminavam predominantemente *C. bovis*, quanto a eliminação de *C. andersoni* houve um aumento proporcional à idade. Esses mesmos autores, em outro estudo, encontraram 85% de bezerros positivos para *C. parvum*, porém, não foi encontrado bezerro com mais de dois meses de idade positivo para este parasito. Vale ressaltar no entanto, que a presença do oocisto nas fezes não implica em doença clínica (RADOSTITS et al., 2002).

Em pequenos ruminantes também esses agentes impactam de forma negativa no desenvolvimento dos rebanhos. Animais jovens com menos de 150 dias são mais susceptíveis à infecção por *Cryptosporidium* spp., bem como eliminam maior quantidade de oocistos no ambiente, o que coincide com o período de fezes com aspecto diarreico (BOMFIM et al. (2005). Entretanto, há grandes variações na idade e nas características das fezes de animais positivos para *Cryptosporidium* spp. haja vista que Brito et al. (2014) trabalhando com caprinos, com idade entre três e 360 dias, de ambos os sexos, com padrão racial definido (CPRD) e sem padrão racial definido (SPRD), de 25 propriedades no município de Quixadá – CE, encontraram animais positivos para *Cryptosporidium* spp. em 64% (16/25) das propriedades e 7,5% (30/400) dos animais apresentaram protozoários nas fezes. Dos animais positivos 80% (24/30) tinham idade entre 61 e 180 dias. As amostras fecais desses animais positivos apresentavam aspectos que variaram de amolecidas à cíbalas bem formadas, cujo

maior número foi constatado no período seco do ano. Não foi encontrada amostra positiva para *Cryptosporidium* sp. em animais com idade superior há 10 meses.

Tembue et al. (2006) trabalhando com ovinos de idade variando de 3 meses a 4 anos de 22 propriedades no município de Ibirim-PE, encontraram ocorrência de 3,7% (3/81) de *Cryptosporidium* spp., sendo todas amostras positivas oriundas de borregos.

Com relação à transmissão do parasito aos humanos, esta também ocorre via fecal-oral, seja por ingestão de água ou alimentos contaminados, seja de uma pessoa para outra e principalmente pela contaminação ambiental por oocistos que são eliminados por bovinos em especial por bezerros. A transmissão por água é considerada de extrema importância (XIAO, 2010).

No que diz respeito à suscetibilidade, idosos, crianças e pessoas imunodeprimidas, principalmente portadoras do vírus HIV, são grupos de alto risco e são acometidos com gastroenterites persistentes. Pessoas que gozam de plena saúde também podem infectar-se com *Cryptosporidium* spp. no entanto, são acometidos com uma forma mais branda da doença (XAGORARAKI et al., 2004).

Ambientes fechados como as creches, que aglomeram um grande número de crianças e por período de horas, possibilitam a transmissão do *Cryptosporidium* spp., uma vez que há uma maior exposição dessas crianças às formas infectantes do parasito. A condição sócio-econômica desfavorável também é um fator a ser considerado, e crianças frequentando a mesma creche quase sempre pertencem ao mesmo estrato social (GURGEL et al., 2005). Outros fatores que são importantes nesse grupo são: o estado subnutricional e/ou de desnutrição, o consumo de água não tratada, geofagia, falta de saneamento básico, imaturidade do sistema imune e hábitos higiênicos inadequados. Estes fatores associados são determinantes para ocorrência da criptosporidiose nos infantes até 5 anos de idade (CASTRO et al., 2004; FERREIRA et al., 2000).

Nascimento et al. (2009), realizando exames coproparasitológicos de crianças com idades entre 1 e 14 anos, de uma creche pública localizada no bairro da Várzea, Recife – PE, observaram que das 182 amostras 32% foram positivas para *Cryptosporidium* spp, esta prevalência foi consideravelmente alta em relação a outros estudos realizados no Brasil, cujos números foram de 4,2% em Uberlândia-MG (GENNARI-CARDOSO et al., 1996), 3,3% no Rio de Janeiro-RJ (SILVA et al., 2003) e 1,8%, em Ribeirão Preto-SP (MEDEIROS et al.,

2001) e de 7,6% de positividade para o parasito em amostras fecais de crianças de 0-6 anos, em Blumenau-SC (ANDRADE et al., 2008).

Trabalhos semelhantes com crianças que frequentam creches, escolas e ou convivem em comunidades sem saneamento básico, demonstram resultados preocupantes para a saúde pública (STARK et al., 2011).

Hernandes et al. (2017), conduziram um trabalho na cidade de Pelotas-RS, com trabalhadores de cooperativas de recicláveis e obtiveram 16% de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho conduzido em 11 comunidades da região metropolitana de Recife, onde das 326 amostras fecais de pessoas com idades variadas, verificou que 17,7% (64/326) destas foram positivas para *Cryptosporidium* spp. (COSTA, 2016).

Um levantamento realizado com amostras fecais de indivíduos com gastroenterites revelou prevalência para criptosporidiose de 1 a 4% na Europa e América do Norte e 3 a 20% na América Central, do Sul, Ásia, África e Austrália. Entretanto, quando foram analisadas amostras de pacientes portadores do vírus HIV, mesmo em países desenvolvidos a prevalência foi de 10 a 20% (CURRENT; GARCIA, 1991).

Adultos se comportam, principalmente, como portadores assintomáticos, geralmente a soroprevalência é elevada nesses indivíduos, por volta de 25 a 35% em países desenvolvidos e de até 95% na América latina (CASEMORE et al., 1997).

A infecção de seres humanos por oocistos de *Cryptosporidium* spp. pode ocorrer de várias formas e oocistos tem sido detectados em redes de fornecimento de água que são incriminadas como uma das principais fontes de infecção (OLSON et al., 2004). A importância da veiculação hídrica da criptosporidiose ganhou destaque a partir de surtos como o de Milwaukee, USA, em 1993, neste 403.000 pessoas foram infectadas, e dessas, 4.400 foram hospitalizadas, ocorrendo 100 óbitos (FAYER et al., 2000).

No entanto, outra importante fonte de contaminação são os alimentos. De Quadros et al. (2008), analisando amostras de alimentos como verduras no município e Lages-SC, observaram positividade em 88,5% das amostras, ficando claro a importância dessa fonte.

A criptosporidiose é uma zoonose que por vezes assume caráter ocupacional, uma vez que médicos veterinários, estudantes de medicina veterinária e tratadores de animais são

grupos de alto risco, por trabalharem diretamente com animais infectados e expostos ao ambiente e as fezes desses (BOWMAN, 2010).

Mais recentemente tem surgido casos de infecção por *Cryptosporidium* spp., em proprietários de calopsitas, essas são aves de companhia cada vez mais presentes em domicílios. Essa intensa convivência é motivo de preocupação, já que essas aves podem atuar como reservatórios desses agentes com potencial zoonótico (PANEGOSSO, 2017).

2.3.1 Fatores de Risco

Em propriedades de exploração leiteira o contato com os animais é constante, em especial bezerros, que muitas vezes se tornam infectados com *C. parvum*, e eliminam grandes quantidades de oocistos em suas fezes, por um período prolongado, contaminando o ambiente e tornando a infecção viável ao homem. Outros fatores importantes são: a falta de um tratamento específico e adequado; falta de higiene nos bezerreiros; superlotação; a não segregação de animais; adoção de medidas equivocadas quanto ao destino das fezes, que muitas vezes são lançadas nas pastagens; contaminação de fontes de água com oocistos; a falta de conhecimentos básicos sobre a doença, aliado à falta de higiene pessoal; e por fim a grande facilidade em adquirir a infecção (GALVÃO et al., 2012).

2.4 PATOGENIA

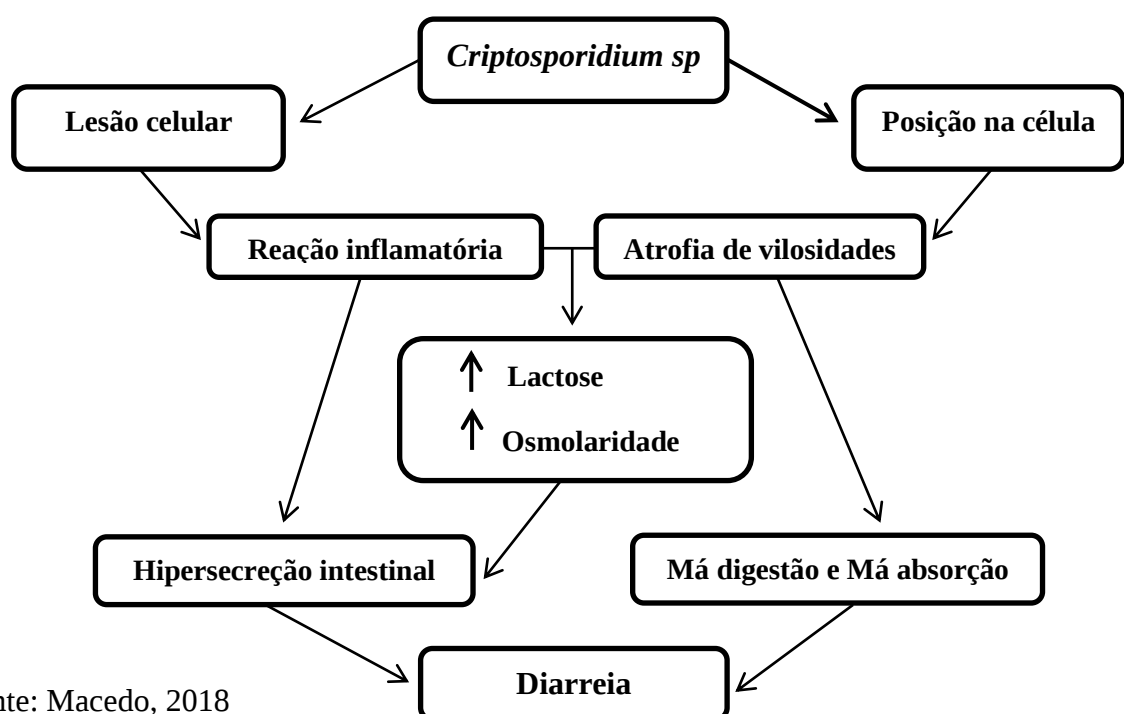
As lesões entéricas causadas por *Cryptosporidium* spp. são decorrentes do seu ciclo de vida. Essas lesões se localizam principalmente na parte distal do intestino delgado, mas podem ser encontradas também no duodeno, ceco e cólon (GRAAF et al., 1999), as quais são observadas nas bordas das microvilosidades do intestino delgado e grosso principalmente no parasitismo por *Cryptosporidium parvum* (CONSENDEY et al., 2008). No entanto, podem ser encontradas também em abomaso de bovinos adultos, causadas pelo *C. andersoni* e em bezerros desmamados por *C. bovis* (LINDSAY et al., 2000; SANTIN et al., 2004; XIAO; FAYER, 2008). As lesões entéricas causadas por *Cryptosporidium* spp. alteram o metabolismo do hospedeiro, sobretudo acarretando numa diminuição das atividades enzimáticas intracelulares da mucosa intestinal (MODOLO et al., 1988).

São descritos dois mecanismos pelos quais são desencadeados quadros de diarreia causada por *Cryptosporidium* spp. O primeiro mecanismo ocorre após invasão e formação dos vacúolos ou invólucros parasitários formados pelas microvilosidades intestinais, há então o desenvolvimento do parasito com isso há ruptura da membrana que forma o vacúolo e

liberação de formas intermediárias. Nesse processo ocorre atrofia, intumescimento e fusão das microvilosidades, como consequência há uma redução na absorção de nutrientes sendo assim uma das causas da diarreia (URQUHART et al., 1998). Em resposta às agressões há uma tentativa de regeneração das vilosidades atrofiadas, então, o epitélio das criptas sofre hiperplasia com consequente hipersecreção (ARGENZIO, 1985).

O segundo mecanismo refere-se aos baixos níveis de lactase encontrados em animais parasitados pelo *Cryptosporidium* spp. uma vez que esta enzima é produzida pelos enterócitos. Com isso a lactose não é digerida de maneira satisfatória, ocorrendo um acúmulo deste nutriente no lúmen intestinal o que eleva a osmolaridade do meio atraindo assim fluidos para a luz intestinal. Isso explica não somente a diarreia em animais parasitados, como também o baixo desenvolvimento desses animais, visto que o leite é o alimento mais importante para animais nessa faixa etária (TZIPORI et al., 1983) como descrito na Figura 2. Além disso, parece evidente que a participação de macrófagos no processo inflamatório aumenta a permeabilidade intercelular e pode alterar as funções secretórias e prejudicar a absorção dos enterócitos dos vilos (McGAVIN, 2013). Vale ressaltar que o grau de infecção e a severidade dos sinais clínicos dependem do status imunológico do hospedeiro (OLIVEIRA-SILVA et al., 2007).

Figura 2- Mecanismos da diarreia desencadeados pelo *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Macedo, 2018

A posição do parasito na célula hospedeira é sem dúvida um dos mecanismos mais importantes de sua manutenção no organismo hospedeiro. Esta posição garante ao parasito uma proteção do sistema imunológico do hospedeiro além de se beneficiar do transporte de solutos que ocorre através da membrana da célula parasitada (ABRAHAMSEN et al., 2004). Além da proteção contra o sistema imunológico, esta posição intracelular e extracitoplasmática, parece exercer alguma importância para a ineficiência dos tratamentos realizados com coccidiostáticos e coccidicidas (BOWMAN, 2010).

2.5 SINAIS CLÍNICOS

Os quadros clínicos observados em infecções por *Cryptosporidium* spp. são quadros de enterite aguda, com diarreia profusa, desidratação e perda de peso, acometendo principalmente bezerros em lactação (ORTOLANI, 1988). Alguns animais podem nascer fracos e logo após o nascimento apresentar diarreia amarela, que pode persistir de 4 a 13 dias (Figura 3), emagrecimento progressivo, desidratação, depressão e morte entre 10 e 15 dias após o início dos sinais clínicos (VARGAS et al., 2014)..

Em cordeiros e cabritos, *Cryptosporidium parvum* é considerado um dos parasitos mais importantes, pois causar graves enterites que cursam com diarreia e morte em animais experimental e naturalmente infectados (TZIPORI et al., 1983; GOMA et al., 2007).

Figura 2- Mecanismos da diarreia desencadeados pelo *Cryptosporidium* spp.



Fonte: VARGAS et al., 2014.

Em humanos os sinais clínicos aparecem em torno de cinco dias após o contágio com oocistos esporulados, levando quase sempre o desenvolvimento náuseas, diarreia aquosa e prolongada, febre, dor abdominal e sudorese, vômito, no entanto, a forma clínica mais comum de sua apresentação em pacientes suscetíveis são as enterites que cursam com diarreia grave (PEREIRA et al., 2009).

2.6 DIAGNÓSTICO

A criptosporidiose é uma doença pouco diagnosticada no dia-dia das fazendas e clínicas veterinárias. Algumas características inerentes aos oocistos como: o seu tamanho diminuto e por seu aspecto incolor podem dificultar seu diagnóstico (Tabela 2). Portanto, o conhecimento e a experiência dos veterinários e outros profissionais de saúde são de extrema importância para o correto diagnóstico (BOWMAN, 2010). Ao longo de décadas vários métodos foram desenvolvidos e outros aperfeiçoados para diagnóstico de criptosporidiose, alguns desses permitem a visualização direta do parasito, por observação microscópica (JEX et al., 2008).

TABELA 2 - Valores aproximados das medidas do oocisto esporulado de *Cryptosporidium* sp. encontrados por vários autores.

Espécie	Diâmetro equatorial (µm)	Diâmetro polar (µm)	Autores
<i>C. parvum</i>	4.0-4.5	3.0-3.3	TYZZER, 1912
<i>C. parvum</i>	5,0 (4.5-5.4)	4,5 (4,2-5,0)	UPTON; CURRENT, 1985
<i>C. bovis</i>	4,89 (4.76–5.35)	4,17–4,76	FAYER et al., 2005
<i>C. andersoni</i>	6.0–8.1	5.0–6.5	LYNDSAY et al., 2000

Alguns desses métodos de observação direta são realizados pela visualização microscópica dos oocistos entre lâmina e lamínula a fresco (diretamente das fezes diarreicas ou após diluição das fezes pastosas em solução salina a 0,85%), sendo observados em microscópio óptico com objetiva de imersão (De CARLI, 1994). Quando a técnica utilizada é a de flutuação em solução saturada de sacarose, com densidade específica de 1,33, há um aumento na concentração dos oocistos elevando assim a sensibilidade do teste. Os oocistos podem apresentar um halo hialino (BOWMAN, 2010).

O método de centrífugo-sedimentação pelo formaldeído-éter (técnica de Richie modificada) determina a quantidade de oocistos por grama de fezes, utilizando uma diluição em solução de Tween (0,1%), com posterior contagem em câmara de Neubauer (De CARLI, 1994).

Exames laboratoriais utilizando métodos de observação direta são realizados para visualização microscópica de alguns parasitos em exames coproparasitológicos para identificação e quantificação de ovos dos helmintos e oocistos de *Eimeria* sp. Na tabela 3 estão descritos as medidas em (μm) de algumas estruturas e agentes de importância na medicina veterinária.

TABELA 3- Valores aproximados das medidas de estruturas de importância para medicina veterinária.

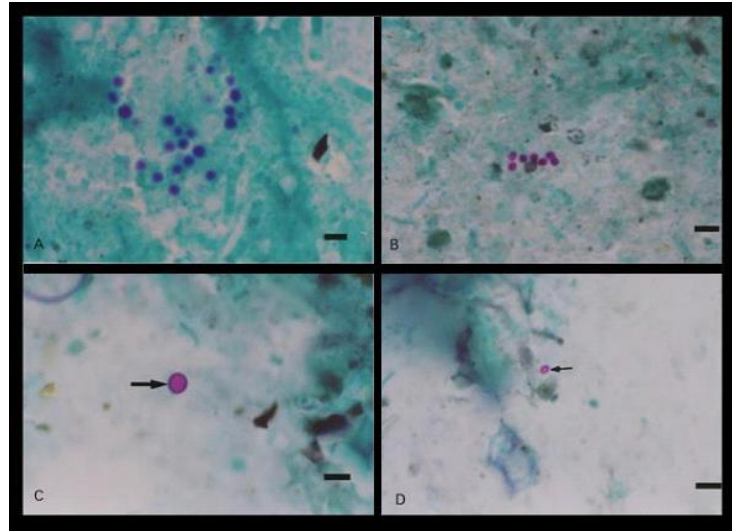
Estrutura	Gênero/espécie	Tamanho (μm)	Objetiva	Autores
Oocistos	<i>Eimeria</i> sp	16,41 x 32,8	10	AHID ET AL., 2009
Ovos	Helmintos	60 - 85	10	UENO;GONÇALVES, 1998

Como mencionado anteriormente algumas características peculiares dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. dificultam sua observação em exames coproparasitológicos, por tanto, para uma melhor visualização dos oocistos são sugeridos alguns métodos de coloração como: azul de metileno, giemsa, Kinyon modificado, PAS (Reação do Ácido Periódico - Schiff), PAS modificado, tricromio, iodo, mentamina e Ziehl- Nielsen (ORTOLANI, 1988; URQUHART et al., 1998; BOWMANN, 2010).

O método de Ziehl Nielsen modificado, é de escolha para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, porém apresenta baixa sensibilidade, sendo necessário aproximadamente 5×10^4 oocistos por grama de fezes, e possibilita uma melhor diferenciação entre oocistos de *Cryptosporidium* spp. de outras estruturas principalmente de leveduras (Figura 4) (ORTOLANI, 1988; WEBER et al., 1991).

Figura 4 - Oocistos do gênero *Cryptosporidium* em fezes de bezerros. Em A, bezerro com sintomas clínicos de diarreia, desidratação e apatia. Em B, bezerro em bom estado de saúde e sem sinais clínicos de criptosporidiose. Em C e D detalhe da parede dos oocistos.

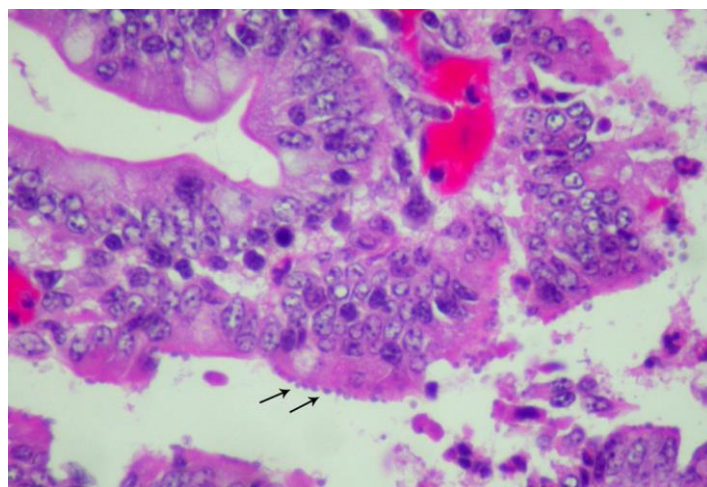
Técnica de Ziehl-Neelsen modificada (- = 5 μm)



Fonte: ALMEIDA, 2006.

Existem ainda provas biológicas como a inoculação de material suspeito em animais de laboratório. Neste caso, destaca-se o uso de camundongos neonatos que usualmente eliminam grandes quantidades de oocistos nas fezes cerca de cinco a seis dias após infecção, o material para histopatologia pode ser fixado em solução de formol a 10% ou líquido de Bouin e corado com Hematoxilina e Eosina (H&E). Exames histológicos também podem ser utilizados como diagnóstico *post mortem* em bovinos para o diagnóstico da criptosporidiose mesmo após 24 a 36 horas da morte (Figura 5) (ORTOLANI, 1988; FAYER et al., 1998).

Figura 5 - Formas parasitárias de *Cryptosporidium* spp. aderidas à superfície das vilosidades (setas). H & E.



Fonte: VARGAS et al., 2014.

As técnicas indiretas também são utilizadas para diagnóstico da criptosporidiose, no entanto, esses imunodiagnósticos são métodos restritos a centros de pesquisas como universidades, pois possuem custos elevados e principalmente necessitam de laboratórios e equipamentos sofisticados. Alguns desses métodos são o ELISA, para pesquisa de coproantígeno (BOWMAN, 2010) e imunofluorescência indireta (ORTOLANI, 1988).

Mais recentemente o advento da biologia molecular possibilitou a detecção e diferenciação de espécies, genótipos e subtipos de *Cryptosporidium* spp. E essas ferramentas desde então são utilizadas em estudos epidemiológicos em áreas endêmicas, bem como para compreender o potencial zoonótico das espécies/genótipos e o papel dos diferentes hospedeiros na ecoepidemiologia da doença (XIAO, 2010). Ainda nesse contexto, a técnica de PCR por apresentar elevada sensibilidade e especificidade tem sido utilizada para detectar *Cryptosporidium* spp. em amostras clínicas e ambientais (ROCHELLE et al. (1999).

Nos quadros a seguir são descritos alguns métodos de diagnóstico do *Cryptosporidium* spp.

- 1-Pesar 2g de fezes;
- 2-Adicionar 4 mL de formol (10%);
- 3-Adicionar 3 mL de éter etílico sulfúrico (PA);
- 4-Homogenizar bem;
- 5-Centrifugar a 3000 r.p.m. por 10 minutos;
- 6-Descartar o sobrenadante;
- 7-Pipetar uma alíquota do pellet e espalhar na lâmina com a própria pipeta;
- 8-Deixar a lâmina secar em estufa;
- 9-Corar com fucsina fenicada por 10 minutos;
- 10-Lavar com água;
- 11-Lavar com solução descorante e em seguida lavar com água novamente;
- 12-Corar com azul de metileno por 3 minutos;
- 13-Lavar com água;
- 14-Secar em temperatura ambiente;
- 15- Realizar a leitura em microscópio com objetiva de 100x, com óleo de imersão.

Quadro 1- Método de coloração com azul de metileno

Fonte: Ortoloni, 1998.

- 1-Pesar 2g de fezes;
- 2-Adicionar 10 ml de éter etílico (PA);
- 3-Centrifugar a 3000 r.p.m por 10 minutos;
- 4-Descartar o sobrenadante e observar se está limpo. Se não estiver limpo, adicionar 2 ml de água + 2 ml de éter etílico centrifugar novamente. Repetir o procedimento até o pellet ficar pequeno;
- 5-Adicionar 10 ml de tween 0,1% e homogeneizar;
- 6- Colocar 10 µL na Câmara de Neubauer e ler.

Quadro 2- Técnica de centrifugo-sedimentação

Fonte: De Carli, 1994.

1. Separa-se cerca de 1g de cada amostra para fixação em solução de formol a 10% em tubos cônicos de polipropileno de 15mL individualmente identificados para posterior fixação e coloração;
2. As amostras são então filtradas em camada dupla de gaze;
3. Cerca de 7 a 8mL de cada solução é transferida para novos tubos cônicos de 15 mL;
4. Adiciona-se 4mL de éter etílico e homogeniza bem;
5. Centrifuga a 500g por 10 minutos;
6. Descarta o sobrenadante;
7. Confecciona- se esfregaços em lâminas a partir dos sedimentos restantes, com o auxílio da parte romba de palitos de madeira, executando-se movimentos circulares;
8. A secagem das lâminas em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas;
9. Fixadas com metanol absoluto por cinco minutos, e deixadas secar, inclinadas, por 15 minutos em temperatura ambiente;
10. Adiciona-se sobre as lâminas, solução de fucsina, por cinco minutos;
11. As lâminas são lavadas com álcool etílico a 50% e depois em água corrente;
12. As lâminas são submersas em álcool ácido a 3% por algumas vezes e posteriormente, lavadas em água corrente;
13. Adiciona-se solução de verde malaquita por sobre as lâminas por três minutos, em seguida são novamente lavadas em água corrente, e secas à temperatura ambiente;
14. As lâminas coradas e secas são montadas com cerca de duas gotas de bálsamo e lamínula;
15. Após secagem completa, as lâminas são observadas em microscópio óptico, em objetiva de 100X (imersão).
- 16- Realizar a leitura em microscópio com objetiva de 100x, com óleo de imersão.

Quadro 3- Técnica de Ziehl-Neelsen modificada

Fonte: Ortolani, 1998.

2.7 IMPACTO NA SANIDADE DE BEZERROS

As gastroenterites são a causa de 50% a 75% das mortes de bezerros com até três semanas de idade, sua morbidade é elevada podendo chegar a 100% neste período, o que resulta em consideráveis perdas econômicas para o sistema de produção (LANGONI et al., 2004; FREITAS, 2009). Segundo Davis; Drackley (1998) e McGuirk (2008) as gastroenterites e as broncopneumonias são as principais causas de mortalidade em bezerros, do nascimento ao desmame.

Na América do Norte estima-se que as perdas devido a diarreia sejam de 33,46 dólares/bezerro/ano (CAMPBELL et al., 2008). No Brasil, no estado de Minas Gerais, maior produtor de leite do país, foi demonstrado que a taxa de mortalidade em bezerros jovens chega a 14%, sendo a diarreia um importante fator de manutenção desta taxa (FROIS et al., 1994). O manejo é o fator que mais influencia as taxas de mortalidade dos bezerros jovens, sendo a taxa aceitável de 5%, do nascimento até os 30 dias de idade (RADOSTITS et al., 2007).

Os prejuízos com enfermidades parasitárias em neonatos são devidos à redução do consumo de alimentos com perdas no ganho de peso e aumento da mortalidade de animais (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005). Custos com diagnóstico, administração de fármacos, reposição de eletrólitos, desinfecção de utensílios e instalações e despesas com mudanças de manejo, as quais consomem tempo e mão-de-obra, impactam substancialmente a bovinocultura (FITZGERALD, 1980; GRAAF et al., 1999).

2.8 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

As gastroenterites são as principais causas de mortalidade infantil não somente em países em desenvolvimento como também em países desenvolvidos. Alguns vírus, bactérias e parasitos podem ser considerados agentes etiológicos. Com relação aos parasitos, destacam-se os protozoários do gênero *Cryptosporidium*. Estima-se que a criptosporidiose seja responsável por 30 a 50% das mortes em crianças até 5 anos de idade, sendo considerada a segunda maior causa de diarreia e morte em crianças imunocomprometidas no mundo perdendo apenas para o rotavírus (OCHOA et al., 2004).

Ao analisar os mais de 120 surtos de doenças causadas por protozoários em seres humanos, ocorridos no mundo entre os anos de 2004 e 2010, *Cryptosporidium* spp. foi o agente etiológico em 60,3% deles (BALDURSSON; KARANIS, 2011).

Em países desenvolvidos, o estabelecimento de métodos de monitoramento da contaminação de água potável por *Cryptosporidium* spp., ainda é uma das maiores preocupações, já que dejetos de animais e esgotos podem contaminar fontes de abastecimento para a população. Já em países em desenvolvimento esta doença está relacionada à falta de saneamento básico, hábitos higiênicos inadequados, subnutrição além da contaminação de reservatórios e redes de abastecimento de água, elevando assim a prevalência da criptosporidiose nesses países (De GRAAF et al., 1999b).

Uma portaria do Ministério da Saúde nº 518/2004, recomenda a pesquisa para *Cryptosporidium* spp. e outros organismos patogênicos em redes de tratamento de água. Entretanto, em função da baixa recuperação e do alto custo da técnica de detecção e quantificação dos oocistos, tem sido avaliado o emprego de outros parâmetros que permitem estimar a remoção de protozoários na água tratada, dado sua importância. Desta forma, alguns indicadores biológicos como coliformes, *Clostridium perfringens* e parâmetros físicos tais como, turbidez, microesferas e a contagem de partículas, são estudados como indicadores da remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (BRASIL, 2004).

A criptosporidiose também é um sério problema e está intimamente relacionada a estados imunes deficientes, tais como ocorre nos casos da síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), nas doenças linfoproliferativas e em indivíduos transplantados.

Nos países desenvolvidos como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e países em desenvolvimento como o Brasil, a infecção humana por *C. hominis* é mais comum, e a transmissão é principalmente zoonotrófica (XIAO; FAYER, 2008; XIAO, 2010). Nesses países, a infecção parece ser mais importante em crianças de áreas rurais e em pessoas com risco ocupacional como veterinários e tratadores que teriam maior possibilidade de contágio (MORGAN et al., 1997; XIAO et al. 2004; XIAO; FAYER, 2008).

Outra preocupação é a falta de conhecimento da criptosporidiose por grande parte dos médicos, o que foi demonstrado por um trabalho realizado com 92 médicos de diversas especialidades: 41 internistas, 11 gastroenterologistas, seis infectologistas, 18 pediatras, oito médicos comunitários e sete ginecologistas, de dois hospitais de Porto Alegre no Rio Grande do Sul, Brasil. Quando perguntados sobre os sinais clínicos da criptosporidiose, 62,5% dos médicos comunitários e 38,8% dos pediatras reconhecem a diarreia aquosa e prolongada como sintoma da doença. No entanto 62,5% dos médicos comunitários e 44,4% dos pediatras, não reconhecem crianças em creches como grupo em risco, apesar de, atualmente, as crianças

de diferentes classes socioeconômicas permanecerem nestes estabelecimentos grande parte de seu dia. Portanto, a enfermidade pode estar sendo subestimada, especialmente em crianças. Isso acontece em parte pelo desconhecimento dos testes laboratoriais relativos à doença os quais não fazem parte da rotina desses profissionais. A maioria dos entrevistados (60,2%) acha que os laboratórios são capazes de detectar o parasita em um exame parasitológico de fezes de rotina, sem requisição médica para a sua procura específica (WIEBBELLING et al., 2001).

2.9 CONTROLE E PREVENÇÃO

Em cordeiros experimentalmente infectados e em bezerros natural ou experimentalmente infectados, o uso da halofuginona mostrou-se eficaz na prevenção da diarreia bem como reduziu acentuadamente a eliminação oocistos. Estes resultados sugerem que esta droga é eficiente contra a reinfecção por esporozoítos e merozoítos de gerações posteriores. A dose recomendada em estudos preliminares foram de 0,06 a 0,125 mg/kg por via oral diariamente durante 7 dias, conferindo proteção contra a doença clínica, no entanto, permitindo que infecções subclínicas aconteçam (RADOSTITS et al., 2002).

Outra alternativa é a utilização de vacinas para os bezerros. Davis et al. (2010), estudaram o efeito da vacina *C. parvum* rCP15/60 em vacas. Neste estudo foram analisados dois grupos de vacas, um de 20 vacas prenhes imunizadas com uma proteína recombinante de *C. parvum*, e um grupo controle de 20 vacas não imunizadas. As vacas vacinadas apresentaram uma titulação de anticorpos significativamente superior às vacas do grupo controle, o mesmo foi observado no colostro destas vacas, sendo assim, há indícios que a vacina pode conferir proteção para bezerros contra a criptosporidiose.

Diante do grau de complexidade da criptosporidiose e da pouca eficiência dos tratamentos disponíveis até o momento, a abordagem profilática com cuidados com os neonatos (colostragem adequada, higienização de utensílios e instalações, etc) e imunização de vacas no pré-parto associada ao tratamento de suporte como hidratação, correção dos desequilíbrios hidro-eletrolítico e ácido- básico, além do adequado suporte nutricional são fundamentais para a redução dos prejuízos causados pela doença (STEINER ET AL., 1997; FREITAS, 2009).

Em humanos ainda não há tratamento específico para criptosporidiose, devido principalmente a fatores ligados ao agente (ASHBOLT, 2004). Entretanto, o tratamento com

paramomicina, antimicrobiano aminoglicosídeo, reduziu a excreção de oocistos (STEINER et al., 1997). Já em pacientes HIV positivos, o uso da paramomicina para o tratamento de enterite por *Cryptosporidium* sp. não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo placebo (HEWITT et al., 2000).

Em um estudo com o uso do nitazoxanide um antiprotozoário do grupo das tiazolidas, em crianças com criptosporidiose foi observado que houve uma resposta satisfatória em apenas 56% das crianças que eram soronegativas para HIV, naquelas soropositivas a droga não se mostrou eficiente (AMADI et al., 2002).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A veiculação do agente, através de água e alimentos contaminados também é de extrema importância para sua manutenção nas populações. Porém, apesar dos impactos mencionados a criptosporidiose é uma enfermidade subdiagnosticada pelos profissionais de saúde, atribuindo-se a isso a falta de conhecimento sobre sua epidemiologia e métodos diagnósticos. Além destes, fatores como manutenção e resistência do agente no ambiente, grande facilidade de contaminação/infecção, falta de um tratamento específico, grande interação com outros patógenos e características morfológicas do agente contribuem para sua manutenção nas populações.

A veiculação do agente, através de água e alimentos contaminados também é de extrema importância para sua manutenção nas populações. Porém, apesar dos impactos mencionados a criptosporidiose é uma enfermidade subdiagnosticada pelos profissionais de saúde, atribuindo-se a isso a falta de conhecimento sobre sua epidemiologia e métodos diagnósticos. Além destes, fatores como manutenção e resistência do agente no ambiente, grande facilidade de contaminação/infecção, falta de um tratamento específico, grande interação com outros patógenos e características morfológicas do agente contribuem para sua manutenção nas populações.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSEN, M. S. et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, Vancouver, v.,304(5669) , p. 441-445, apr. 2004.
- ADILIA, M. P. et al. Avaliação do conhecimento sobre criptosporidiose em uma amostra de médicos de Porto Alegre, RS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, 119-123, 2002.
- AHID, S. M. M. et al. Espécies do gênero *eimeria schneider*, 1875 (apicomplexa: eimeriidae) em pequenos ruminantes na mesorregião oeste do estado do Rio Grande do norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia v. 10, n. 3, p. 984-989, 2009.
- ALDEYARBI, H. M.; KARANIS, P. Electron microscopic observation of the early stages of asexual multiplication and development of *Cryptosporidium parvum* in in vitro axenic culture. **Eur. J. Protistol.**, Cologne, v. 52, p. 36-44, feb. 2016b.
- ALDEYARBI, H. M.; KARANIS, P. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. **Parasitology**, Cologne, v. 143, n. 6, p. 749-61, 2016c.
- ALDEYARBI, H. M.; KARANIS, P. The ultra-structural similarities between *Cryptosporidium parvum* and the gregarines. **J. Eukaryot. Microbiol.**, Cologne, v. 63, n. 1, p. 79-85, jan./feb. 2016a.
- ALMEIDA, A. J. **Diagnóstico e fatores de risco da Criptosporidiose bovina na microrregião de Campos dos Goytacazes – RJ, e identificação de *Cryptosporidium parvum* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. 2006. 80 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- ALVERCA V. O. et al. Incidência de gastroenterite infantil de etiologia viral em Juiz de Fora, Minas Gerais, no período de janeiro a dezembro de 1998. **Jornal Brasileiro de Patologia**, Rio de Janeiro, n. 4, p. 219-227, 2000.
- AMADI, B. et al. Effect of nitroimidazole on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis. **The Lancet**, Reino Unido, v. 360, n. 2, p. 1375-1380, 2002.

ARGENZIO, R. A. Pathophysiology of neonatal calf diarrhea. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practic*, v.1, n.3, p.461-469, 1985.

ARROWOOD, M. J.; STERLING, C. R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *Journal of Clinical Microbiology*, v.27, n.7, p.1490-1495, 1989.

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, v. 198, n. 1-3; p. 229-238, 2004.

BARTA, J.R.; THOMPSON, R. C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol.* v. 22, n. 10, p. 463-468, oct. 2006.

BARBEE, S. L. et al. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. *Gastrointest Endosc*, v. 49, n. 5, p. 605-11, mayo 1999.

BOMFIM, T.C.B.; LOPES, C.W. Aspectos comparativos dos oocistos de *Cryptosporidium* (APICOMPLEXA: CRYPTOSPORIDIIDAE), procedente de suínos (*Sus scrofa domestica*), camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus rattus*) coabitando o mesmo local. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.4, n.1, p.29-32. 1995.

BOWMAN, Dwight D. *Parasitologia Veterinária de Georgis*. 9. ed. São Paulo: Saunders-Elsevier, 2010. 432 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece o procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo*, Brasília, DF, 2004.

CACCIO, S. M. et al. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.

CAMPBELL, R. C. et al. Frequência de diarreia em bezerros mestiços sob diferentes condições de manejo na região do médio Paraíba-Rio de Janeiro e Minas Gerais. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, São Paulo, v.45, n.2, p.153-160, 2008.

- CARDOSO J. M. S. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. **Revista Bras. Parasitol. Vet.** São Paulo v. 17(Supl.1), p. 239-242, 2008.
- CASEMORE, D. P.; WRIGHT, S. E.; COOP, R.L. Cryptosporidiosis-human and animal epidemiology. In: FAYER, R. (Ed). ***Cryptosporidium and cryptosporidiosis***. Florida: CRC Press Boca Raton, FL, p.65-92, 1997.
- CASTRO, A. Z. et al. Levantamento das parasitoses intestinais em escolares da rede pública na cidade de Cachoeiro do Itapemirim-ES. **NewsLab**, n.64, p. 140-144, 2004.
- CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. **Eur. J. Protistol**, v. 50, n. 5, p. 472–495, oct. 2014.
- CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis, **Experimental Parasitology**, v. 214, n. 1, p. 138-146, jan. 2010.
- CLODE, P. L.; KOH, W. H.; THOMPSON, R. C. A. Life without a host cell: What is *Cryptosporidium*. **Trends Parasitol.**, v. 31, n. 12, p. 614-24, dec. 2015.
- COSENDEY, R. I. J.; FIUZA, V. R. S.; OLIVEIRA, F. C. R. Importância do manejo na criptosporidiose em criações de ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.17, supl.1, p. 209-214, 2008.
- COSTA, J.; CRISTINA, C.; EIRAS, J. C.; SARAIVA, A. Characterization of a *Cryptosporidium* scophthalmi-like isolate from farmed turbot (*Scophthalmus maximus*) using histological and molecular tools. Dis. Aquatic Organisms. **In press**, 2016.
- CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Local da revista, v. 4, n. 3, p. 325-358, jul. 1991.
- DAUGSCHIES, A.; NAJDROWSKI, M. Eimeriosis in cattle: current understanding. **J.Vet.B.Infect. Dis.Vet.Public Health**, v.52, n.1, p.417-427, dec. 2005.
- DAVIS, C.L.; DRACKLEY, J.K. **The development, nutrition and management of the young calf**. Iowa: Iowa University, p.329, 1998.

DAVIS, R.; BROWN, A.; BROMAN, D. D. Antibody responses following administration of *Cryptosporidium parvum* rCP15/60 vaccine to pregnant cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 9, n. 13, 2010.

De GRAAF, D. C. et al. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, New York, v.29, p.1269-1287, 1999a.

De GRAAF, D. C. et al. Speculation on whether a vaccine against cryptosporidiosis is a reality or fantasy. **International Journal for Parasitology**, New York, v.29, p.1289-1306, 1999b.

DE QUADROS, R. M. et al. Parasitos em alfaces (*Lactuca sativa*) de mercados e feiras livres de Lages – Santa Catarina. **Ciência e Saúde**, Campina Grande, v. 1, n. 2, p 78-84, 2008.

De CARLI, G. A. D. **Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas: Métodos e Técnicas**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 313p. 1994.

EDWINSON, A.; WIDMER, G.; MCEVOY, J. Glycoproteins and free Gal/GalNAc cause *Cryptosporidium* to switch from an invasive sporozoite to a replicative trophozoite. *Int. J. Parasitol.*, Local da revista, v. 46, n. 1, p. 67-74, 2016.

ENTRALA, E. et al. Antigen incorporation on *Cryptosporidium parvum* oocyst walls. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 233-235, 2001.

FAYER, R. Biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. 2 ed. Boca Raton, Fl: CRC Press and IWA Publishing, London. 2008. p. 119-163.

FAYER, R. et al. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. **International Journal Parasitology**, New York, v.28, p.49-56, 1998.

FAYER, R. General Biology. In: FAYER R, XIAO L. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC; London.2008. p. 1-42.

FAYER, R. General Biology. In: FAYER, R. & XIAO, L. (Ed.), ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**. 2. ed. CRC Press; IWA Pub., Boca Raton, London. 2008. p. 1-7.

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

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

FAYER, R.; SPEECER, C. A.; DUBEY, J. P. General biology of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEECER, C. A.; FAYER, R. (Eds). **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boston: CRC Press, 1990. p.1-29.

FEITOSA, F. L. F. et al. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Goiânia, v.28, n.10, p.452-456, 2008.

FEITOSA, F. L. F. et al. 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, 2004.

FELTUS, D. C. et al. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. In Wisconsin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4303-4308, 2008.

FERREIRA, M. S. Infections by Protozoa in Immunocompromised Hosts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95 (supl I), p.159-162, 2000.

FITZGERALD, P. R. Economic Impact of Coccidiosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.24, p.121-143, 1980.

FIÚZA, V. R. S.; COSENDEY, R. L. L.; OLIVEIRA, F. Criptosporidiose suína associada aos sistemas de produção no estado do rio de janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 224-229, 2008.

FREITAS M. D. 2013. **Avaliação de diferentes protocolos de fluidoterapia em bezerros neonatos com diarreia**. 2013. 222 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.

FREITAS, M. D. **Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais de bezerras com diarreia neonatal naturalmente adquiridas**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.

FROIS, M. C. M. et al. Tendência histórica dos coeficientes de mortalidade de bezerros em Minas Gerais, 1960 a 1985. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Rio de Janeiro, v.46, n.6, p.741-747, 1994.

FUJINO, T. et al. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **Journal of Veterinary Medical Science**, v 64, p. 199-200, 2002.

GENNARI-CARDOSO, M. L. et al. *Cryptosporidium* sp in children suffering from acute diarrhea at Uberlândia city, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, p. 551-554, 1996.

GOMA, F. Y. et al. The prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. In small ruminants in Zambia. **Small Ruminant Research**, v. 72, n. 1, p. 77-80, 2007.

GRAAF, D. C. et al. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, New York, v.29, n.1, p.1269-1287, 1999.

GRACZYK T. K. et al. Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3234-3237, 1996.

GRACZYK T. K.; FAYER R.; CRANFIELD M. R. *Cryptosporidium parvum* is not transmissible to fish, amphibians, or reptiles. **J. Parasitol.**, v. 82, p. 748- 751, 1996.

GURGEL R. Q. Et al. Creche: ambiente expositor ou protetor nas infestações por parasitas intestinais em Aracajú, SE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, p. 267-269, 2005.

HERNANDES, J. C. et al. Educação em saúde ambiental nas cooperativas de triagem de materiais recicláveis do município de Pelotas, Rio Grande do Sul. **Expressa Extensão**, v.21, n.1, p. 33-41, 2016.

HEWITT, R. G. et al. Paromomycin: No more effective than placebo for treatment of cryptosporidiosis in patients with advanced HIV infection. **Clinical Infectious Disease**, v. 31, n. 4, p. 1084-1092, 2000.

HIJAWI, N. S. et al. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell free culture. **Int. J. Parasitol.**, New York v. 34, p. 769-777, 2004.

INSULANDER, M. et al. Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. **Epidemiol. Infect.**, v. 141, n. 5, p. 1009-1020, 2013.

JEX, R. et al. *Cryptosporidium* - Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v.26, n.4, p.304-317, 2008.

JOACHIM, A. Human Cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, n. 6, p. 251-259, 2004.

KARANIS, P; ALDEYARBI, H. M. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. **Int. J. Parasitol.**, New York, v. 41, p. 1231-1242, 2011.

LANGONI, H. et al. Contribuição ao estudo da etiologia das diarreias em bezerros de aptidão leiteira no Estado de São Paulo, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo v. 41, p. 313-319, 2004.

LINDSAY, D. S. et al. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.47, p. 91–95, 2000.

MASON, R. W.; HARTLEY W. J.; TILT L. Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. **J. Aust. Vet. Assoc.**, v. 57, p. 386-388, 1981.

MCGUIRK, S. M. Disease management of dairy calves and heifers. **Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.**, v. 24, p.139-153, 2008.

MEDEIROS M. I. C. et al. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, n. 43, p.21-24, 2001.

MEISEL, J. L. et al. Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v. 70, n. 1156-1160, 1976.

MODOLO, J R. et al. Ocorrência de criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu - SP. **Rev. Bras. Med. Vet.**, São Paulo, v. 10: 9-10. Botcatu- São Paulo, 1988.

Moore D.A. & Zeman D.H. Cryptosporidiosis in neonatal calves: 277 cases (1986-1987). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 198, n. 11, p. 1969-1971, 1991.

MORGAN, U. N. et al. *Cryptosporidium* spp. in domestic dog: the “dog” genotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2220-2223, 2000

MUNIZ NETA E. S. et al. Comparação das técnicas de Ziehl-Neelsen modificada e contraste de fase na detecção de oocistos do gênero *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em bovinos assintomáticos. **Revista Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 201-204, 2010.

NASCIMENTO, R. C. et al. Presença de *Cryptosporidium* spp. em crianças com diarreia aguda em um creche pública de Recife, Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 175-178, 2009.

OCHOA, T. J.; SALAZAR-LINDO, E.; CLEARY, T. G. Management of children with infection associated persistent diarrhea. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, p. 229 – 236, 2004.

OCHOA, T. J.; SALAZAR-LINDO, E.; CLEARY, T. G. Mangement of children with infection-associated persistent diarrhea. **Seminaris in pediatric infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 229-36, 2004.

OLIVEIRA FILHO, J. P. et al. Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.27, n.10, p.419-424, 2007.

OLIVEIRA-SILVA, M. B. et al. Perfil sazonal e nível de linfócitos CD4+ na ocorrência de criptosporidiose e cistoisporidiose em pacientes HIV/AIDS na região do Triângulo Mineiro, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba , v. 40, n. 5, p. 542-515, 2007.

OLSON, M. E.; APPELBEE, A.; MEASURES, L. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in pinnipeds. Zoonotics protozoa in the marine environment: a threat to aquatic mammals and public health. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 131-135, 2004.

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

ORTOLANI, E L. **Padronização da técnica de Ziehl - Neelsen para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*. Estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em**

bezerros de rebanhos leiteiros no estado de São Paulo.1988. 85 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

OVERGAAUW, P A. et al. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 13, n. 1, p. 115-122, 2009.

PANEGOSSI, MARIELE FERNANDA DA CRUZ. **Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*)**. 2017, 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo.

PAZIEWSKA-HARRIS, ANNA. et al. Quantitative analysis of *Cryptosporidium* growth in in vitro culture the impact of parasite density on the success of infection. **Parasitology Research**, v. 115, n. 1, p. 329–337, 2016.

PEREIRA, C. et al. Ocorrência da esquistossomose e outras parasitoses em crianças e adolescentes de uma escola municipal de Jequié, Bahia, Brasil. **Revista de Saúde Coletiva**, , v.6, n. 1, p. 24-31, 2009.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: in update. **Veterinary Parasitology**, , v. 165, n. 3-4, p.187-199, 2009.

RADOSTITS, O. M. et al. Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed. W.B. Saunders, London. 2007. 2065p.

RAMIREZ, N.E., WARD, L.A., SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and infection**, , v. 6, p. 773-785, 2004.

RIEUX, A. et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from high-excreting young dairy calves in dairy cattle herds in Western France. **Vet. Parasitol.**, v. 192, n. 1/3, p. 268-272, 2013.

ROCHELLE, P. A. et al. Polymorphisms in the b-tubulin gene of *Cryptosporidium parvum* differentiate between isolates based on animal host but not geographic origin. **The Journal of Parasitology**, v.85, n.5, p.986-989, 1999.

- ROSSIT, A. R. B. et al. Bacterial yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State. Southeastern Brazil, **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 57, n. 1, p. 59-66, 2007.
- SANFORD, S. A.; JOSEPHSON, G. K. A. Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves protozoal disease. **Canadian Veterinary Journal**, v.23, n.12, p.243-347, 1982
- SANTÍN, M. et al. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, , v. 122, p. 103-177, 2004.
- SERGIO, F. et al. Surto de criptosporidiose em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, Goiania v. 34, n. 8, p.749-752, 2014.
- SILVA, S. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais de crianças, menores de 10 anos de idade, com indicação clínica de Rotavírus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36. 421-423, 2003..
- SMITH, H. V, NICHOLS R. A. B. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Experimental of Parasitology**, v. 124, n. 6, p. 61-79, 2010.
- SNELLING, W. J. et al. Cryptosporidiosis in developing countries. **J. Infect. Dev. Ctries**, , 1, p. 242 – 256, 2007.
- STARK, D. et al. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragylis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis* in Clinical stool samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 257-252, 2011.
- STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; GUERRANT, R. L. Protozoal agents: what are the dangers for the public water supply? **Annual Review Medicine**, v. 48, p. 329-340, 1997.
- STERLING, C. R., ARROWOOD, M. J. Cryptosporidia. In: KREIER , J. P. **Parasitic Protozoa**. Academic press, INC., 1992. 159-225.
- STERLING, C.R., ARROWOOD, M.J. (1992) Cryptosporidia. In: KREIER , J. P. **Parasitic Protozoa**. Academic press, INC., 159-225.
- STRIEPEN, B. Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. **Nature**, 503, 189 – 191, 2013.

- SUNNOTEL, G. et al. *Cryptosporidium*. **Letters in applied microbiology** v. 43, n. 1, p. 7-16, 2006.
- TEMBUE, A. A. M. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ovinos no município de Ibimirim, Estado de Pernambuco. **Ciênc. Vet. Tróp.**, Recife, 9:41-43, 2006.
- THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Journal Veterinary**, v. 177, n. 1, p. 18-25, 2008.
- TYZZER, E. A. sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, n. 5, p. 12-13, 1907.
- TYZZER, E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archives of Protistenkd.**, v.26, p. 394-412, 1912.
- TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in animals and humans. **Microbiological Reviews**, , v.47, n.1, p. 84-96, 1983.
- TZIPORI, S. et al. An outbreak of calf diarrhea attributed to cryptosporidial infection. **Vet. Rec.**, n. 107, p. 579-580, 1980.
- UENO, H.; GONÇALVES P. C. **Manual para Diagnóstico das Helminthoses de Ruminantes**. Japan International Cooperation Agency, Tokyo, p.14-28, 1998.
- UPTON, S. J.; CURRENT, W. L. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. **Journal of Parasitology**, 71: 625-629, 1985.
- URQUHART, G. M. et al. In: **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1998. 285p.
- VARGAS, S. F. et al. Surto de criptosporidiose em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro v. 34, n. 8, p. 749-752, 2014.
- WANDURAGALA, L. et al. Rickettsial and chlamydial disease of Domestic animals. England: **Pergamon Press Ltda**. c.3, p.65-87, 1993.
- WANDURAGALA, L.; RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. Rickettsial and chlamydial disease of Domestic animals. England: **Pergamon Press Ltda**, C.3, p.65-87, 1993.

WEBER R. et al. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.7, p.1323-1327, 1991.

WOUDA, W.; BARTELS, C. J. M.; DE MOEN, A. R. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995- 1997). **Theriogenology**, n. 52, p. 233-245, 1999.

XAGORARAKI, I., HARRINGTON, G. W., ASSAVASILAVASUKUL, P., STANDRIDGE, J. Removal of emerging waterborne pathogen. **Journal Awwa**, v. 93, n. 2, p.102-113, mayo 2004.

XIAO, L. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 17, p.72-97,2004.

XIAO, L. Molecular epidemiology of Cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, v.124, n. 1, p. 80-89, 2010.

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, p. 1239-1255, 2008.