

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul e a comparação de técnicas de coloração para detecção de oocistos nas fezes

Bruna Baccega

Pelotas, 2017

Bruna Baccega

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul e a comparação de técnicas de coloração para detecção de oocistos nas fezes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Parasitologia).

Orientadora: Profa. Dra. Eliza Simone Viegas Sallis

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B116o Baccega, Bruna

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul e comparação de técnicas de coloração para detecção de oocistos nas fezes / Bruna Baccega ; Eliza Simone Viégas Sallis, orientadora. — Pelotas, 2017.

72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Protozoários. 2. Criptosporidiose. 3. Fezes. 4. Bovinos. 5. Zoonoses. I. Sallis, Eliza Simone Viégas, orient. II. Título.

CDD : 636.2

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Agradecimentos

À meus Pais Bruno César Baccega e Inajara de Fatima Fruet Baccega, pessoas maravilhosas das quais me orgulho muito, e que com extrema dedicação nunca mediram esforços para que eu alcançasse este objetivo. Amo vocês.

Ao meu irmão, Jandyr Baccega Neto, pessoa que só veio para somar ainda mais na minha vida. Te amo muito!

Aos meus avós, Valeriano, Iole e Maria, todos meus Tios e Tias, primos e primas pelos conselhos e carinhos cedidos durante toda minha vida.

Aos meus amigos de fé Andréia, Sonia, Janice, Simone, Mariana, Cristina, Raquel, Cláudia, Pedro, Lucas, Rafael, Maicon, Guilherme, aos amigos desde a faculdade, que sempre não mediram esforços para me ajudar nas difíceis etapas que percorri, tanto na vida profissional quanto na vida pessoal.

Aos alunos da turma de Veterinária Especial III, pelo apoio nas coletas, e desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos, professores e técnicos de laboratório da Pós-graduação, pela ajuda, conselhos e orientações a mim oferecidos.

A minha orientadora Eliza Simone e co-orientadora Daniela Isabel por todo apoio, paciência e conhecimento a mim cedido durante todo o desenvolvimento desta dissertação.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia e ao apoio financeiro da CAPES, possibilitando a execução do projeto.

Muito Obrigada

*Aprender é como remar contra a correnteza:
se para se retrocede.*

(Edward Britten)

Resumo

BACCEGA, B. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul e a comparação de técnicas de coloração para detecção e oocistos nas fezes.** 2017. 68f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia)-Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Cryptosporidium spp. são coccídios reconhecidos como importantes patógenos causadores de diarreia em vertebrados, incluindo bovinos e o homem. Em bovinos, os bezerros neonatos são mais suscetíveis à infecção clínica, sendo os animais adultos acometidos por infecções de natureza assintomática. Os bovinos podem ainda atuar como reservatórios de *Cryptosporidium parvum*, que apresenta potencial zoonótico. Inúmeros métodos foram desenvolvidos para diagnóstico de criptosporidiose, sendo as técnicas que envolvem a detecção direta do parasito, por observação microscópica, as mais comumente utilizadas na rotina laboratorial. No entanto, essas técnicas podem apresentar resultados falsos positivos e baixa sensibilidade. Neste estudo, utilizaram-se 359 amostras fecais, provenientes de bezerros leiteiros, de 68 propriedades da região sul. Estas amostras foram submetidas a diferentes métodos de coloração, como a técnica de Auramina, Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen, para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Portanto, almeja-se padronizar uma técnica específica, eficaz e de baixo custo para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros leiteiros, da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

Palavras-chave: Protozoários, saúde pública, Auramina, Kinyoun, Ziehl-Neelsen, Safranina.

Abstract

Baccega, Bruna. **Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in calves from the southern region of Rio Grande do Sul and the comparison of techniques for detection of oocysts in feces.** 2017. 68f. Dissertation (Master in Science) – Postgraduate Program in Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

Cryptosporidium spp. are coccidia recognized as important pathogens that cause diarrhea in vertebrates, including cattle and man. In cattle, neonatal calves are more susceptible to clinical infection, and adult animals are affected by infections of an asymptomatic nature. Cattle may also act as reservoirs of *Cryptosporidium parvum*, which has a zoonotic potential. Numerous methods have been developed for the diagnosis of cryptosporidiosis, and the techniques that involve the direct detection of the parasite, by microscopic observation, are the most commonly used in the routine of laboratory. However, these techniques may present false positive results and low sensitivity. In this study, 359 fecal samples from dairy calves were used in 68 properties from the southern region. These samples were submitted to different staining methods, such as Auramine, Kinyoun, Safranina and Ziehl-Neelsen, for the detection of oocysts of *Cryptosporidium* spp. Therefore, it is desired to standardize a specific, efficient and low-cost technique for the detection of oocysts of *Cryptosporidium* spp. in faecal samples of dairy calves from the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil.

Keywords: Protozoan, public health, Kinyoun, Ziehl-Neelsen, Safranine, Auramine.

Lista de Figuras

Figura 1	Ciclo Biológico do <i>Cryptosporidium</i> spp.....	19
----------	--	----

Lista de Tabelas Artigo 1

Tabela 1	Comparação entre os métodos colorimétricos para detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras fecais	31
----------	--	----

Lista de Tabelas Artigo 2

Tabela 1	Ocorrência de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros	41
----------	--	----

Sumário

1	Introdução.....	12
2	Objetivos.....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
3	Revisão de Literatura.....	15
3.1	Classificação Taxonômica.....	15
3.2	Histórico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	15
3.3	Morfologia.....	16
3.4	Ciclo Biológico.....	17
3.5	Mecanismos de transmissão.....	18
3.6	Patologia.....	19
3.7	Diagnóstico.....	19
3.8	Tratamento.....	20
3.9	Prevenção e controle.....	20
3.10	Importância em saúde pública.....	21
3.11	Importância em bovinos.....	22
4.	Artigo 1 Detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras fecais de bezerros leiteiros: comparação entre métodos de colorações e imunofluorescência indireta	24
4.1	Resumo.....	25
4.2	Abstract.....	26
4.3	Introdução.....	26
4.4	Material e Métodos.....	27
4.5	Resultados.....	29
4.6	Discussão.....	29
4.7	Conclusão.....	32
4.8	Referências.....	32
5	Artigo 2 Ocorrência de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras fecais de bezerros no Sul do Rio Grande do Sul	37

5.1	Abstract.....	38
5.2	Resumo.....	38
5.3	Introdução.....	39
5.4	Material e Métodos.....	40
5.5	Resultados e Discussão.....	40
5.6	Conclusões.....	42
5.7	Referências	42
6	Conclusões Gerais.....	45
	Referências.....	46
	Anexos.....	59
	Anexo A Normas para submissão: Revista Brazilian Journal of Veterinary Parasitology	60
	Anexo B Normas para submissão: Revista Pesquisa Veterinária Brasileira	63
	Anexo C Aprovação da Comissão de Ética em experimentação animal	70

1. Introdução

O protozoário do gênero *Cryptosporidium* spp., coccídio que parasita mamíferos, aves, répteis, peixes e anfíbios. Este gênero pode ser encontrado aproximadamente em 170 espécies de animais silvestres e domésticos, bem como em seres humanos (O'DONOGHUE, 1995; FAYER et al., 2000; MORGAN, 2000; JEX et al., 2008).

Pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1984; XIAO 2004; FAYER, 2008).

De distribuição mundial, é considerado um agente zoonótico, responsável pelo acometimento gastrointestinal autolimitado em indivíduos imunocompetentes e por vezes, severo em imunodeficientes (CAMPBELL, 1983; PETERSON, 1993).

A infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* spp. encontra-se amplamente difundida em animais no Brasil (MEIRELES et al., 2010).

Cryptosporidium spp. está comumente associada a enterites, as quais se caracterizam em diarreia aguda, aquosa e cólica (JEX et al., 2008). Acomete principalmente bezerros (GRAAF et al. 1999). Os animais adultos são considerados como potencial fonte de infecção para o ambiente e restante do rebanho (FAYER et al. 2000).

É um patógeno de grande importância para o rebanho bovino, pois a morbidade pode chegar a 100%, causando grandes perdas econômicas. Infectando células superficiais do epitélio gastrintestinal, comprometendo o crescimento do animal, além dos custos com medicamentos e em casos extremos a perda com a morte dos animais (GRAAF et al. 1999; VERGARA & QUÍLEZ 2004).

O diagnóstico laboratorial normalmente é feito pela detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, utilizando-se para concentração o método de sedimentação em formalina-acetato de etila (De CARLI, 2001). Para visualização dos oocistos, diferentes métodos de coloração são utilizadas, como por exemplo,

Ziehl-Neelsen, Safranina e azul de metileno, Auramina, Sheather, Contraste de fase, Kinyoun, dentre outras.

Assim, devido ao pouco conhecimento dessa infecção em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul, como de um teste de diagnóstico rápido e preciso, realizou-se o estudo com o objetivo de detectar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de bezerros de leite na região, bem como padronizar um método diagnóstico coproparasitológico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Comparar técnicas microscópicas de coloração para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de bezerros no sul do Rio Grande do Sul, Brasil

2.2 Objetivos Específicos

Detectar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de bezerros de leite da região sul do Rio Grande do Sul, através de diferentes métodos de diagnóstico coproparasitológico.

Padronizar e avaliar os resultados obtidos pelos métodos de coloração na detecção de oocisto de *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais de bezerros de leite.

Analisar a especificidade e sensibilidade das técnicas utilizadas.

Contribuir com dados epidemiológicos sobre a ocorrência deste protozoário em bezerros leiteiros na região sul do Rio Grande do Sul.

3. Revisão de Literatura

3.1 Classificação taxonômica

Classificados taxonomicamente como PROTISTAS, pertencentes ao Filo APICOMPLEXA, Classe ESPOROZOASIDA, Subclasse COCCIDIASIDA, Ordem EUCOCCIDIA, Subordem EIMERIINA, Família CRYPTOSPORIIDAE (LEVINE,1984).

Segundo Tzipori & Ward (2002), este protozoário possui algumas características que se diferenciam de outros coccídeos. Como a ocorrência em espécies hospedeiras distintas, seus esporozoítos são livres e ausência de esporocisto, resistência aos agentes microbicidas, auto-infecção do hospedeiro, sua localização intracelular e extracitoplasmática na célula hospedeira.

Diversas espécies de *Cryptosporidium* spp. foram descritas e nomeadas, conforme o hospedeiro, considerando características fenotípicas, genotípicas, patogênicas e epidemiológicas. (FAYER et al., 1997; MORGAN et al., 1999; FAYER et al.,2000; XIAO et al., 2000; MOINS & THOMPSON, 2003; FAYER et al.,2004; XIAO et al.,2004; FAYER et al., 2005; FAYER et al., 2006;).

3.2 Histórico de *Cryptosporidium* spp.

A primeira descrição deste protozoário ocorreu em 1907, por Ernest Edward Tyzzer, observando em glândulas gástricas de camundongos, sendo denominado *C. muris*.

Dentre os seres humanos, os primeiros casos de infecção foram relatados em pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos em 1976 nos Estados Unidos da América (MEISEL et al.,1976; NIME et al.,1976;).

No ano de 1971, foi encontrado pela primeira vez este parasito em bezerros com diarreia, despertando interesse pelo agente em medicina veterinária (LALLO, 1996).

Em bovinos as espécies ocorrentes são: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. parvum* e *C. ryanae* ou genótipo *deer-like* (MEIRELES et al., 2011; RYAN et al., 2014).

No município de Campo dos Goytacazes, localizado na Região Norte Fluminense, foi encontrada uma positividade de 61% para o gênero *Cryptosporidium* spp. em bezerros com até 12 meses de idade, com maior excreção de oocistos nos primeiros dias de vida (ALMEIDA et al., 2008).

Criptosporidiose em cães ocorre principalmente em filhotes com menos de seis meses de idade. Em gatos foi descrita no Japão Iseki em 1979, que nomeou o parasita responsável como *C. felis* (ISEKI, 1979)

Nas aves está relacionado aos tratos digestivo e/ou respiratório (NAKAMURA et al., 2009). Suínos geralmente são acometidos por *C. suis* e *C. scrofarum*, embora, também, já tenham sido relatados *C. muris*, *C. tyzzeri* e *C. parvum* (RYAN et al., 2014).

Em equinos foi inicialmente descrita em potros com imunossupressão. A prevalência pode variar conforme a idade, localização e categoria do animal (TOSCAN et al., 2010).

Até o ano de 2009 considerava-se que *C. cuniculus* era específico de coelho, até ocorrer um surto relacionado à esta espécie em humanos no Reino Unido (PULESTON et al., 2014).

Cryptosporidium spp., também, é descrito em répteis como serpentes, tartarugas, lagartos e anfíbios, em camundongos, capivara, veados, porco espinho, cangurus e muitas outras espécies, como peixes de água doce, como a tilápia (ALVAREZ-PELLITERO & SITJÀ-BOBADILLA, 2002; MEIRELES, 2010; KOINARI et al., 2013; RYAN et al., 2014).

3.3 Morfologia

Cryptosporidium spp. possui várias formas durante o seu ciclo de vida. Podendo apresentar-se em forma elíptica ou esférica, medindo de 4 a 6 µm, o qual se dá o nome de oocisto. Dentro de cada oocisto, encontram-se quatro esporozoítos, e sua parede pode se apresentar em dois tipos: I- parede espessa; II- parede delgada (JACOBSEN et al., 2006).

3.4 Ciclo biológico

As espécies de *Cryptosporidium* spp. possuem um ciclo de vida monoxeno, muito semelhante aos de outros coccídios. Composto por seis estágios de desenvolvimento (assexual e sexual), ocorrendo em um único hospedeiro, e a eliminação de oocistos já esporulados nas fezes de animais ou pessoas infectados, (DUBEY et al.,1990), o que diferencia este protozoário dos demais coccídeos (AMARANTE, 1992; O'DONOGHUE, 1995).

Após a ingestão dos oocistos ocorre a fase de excitação, onde os esporozoítos infectantes são liberados. Estes ativamente procuram, tratos gastrointestinais fixam-se, invadem e tornam-se englobados pelas células epiteliais do hospedeiro (PEREIRA, 2007; CHALMERS & DAVIES, 2010). Os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, iniciando a multiplicação assexuada (XIAO et al., 2004; SMITH et al.,2007). Durante a maturação do trofozoíto ocorre a multiplicação assexuada (esquizogonia ou merogonia) e resulta na formação de esquizonte ou meronte tipo I que contém 6 a 8 merozoítos e o tipo II, com quatro merozoítos. Os merozoítos tipo I podem dar origem a novos merozoítos do tipo I ou do tipo II; os merozoítos tipo II iniciam a fase sexuada do ciclo ou gametogonia, com diferenciação em estágios masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas) (SMITH et al., 2007).

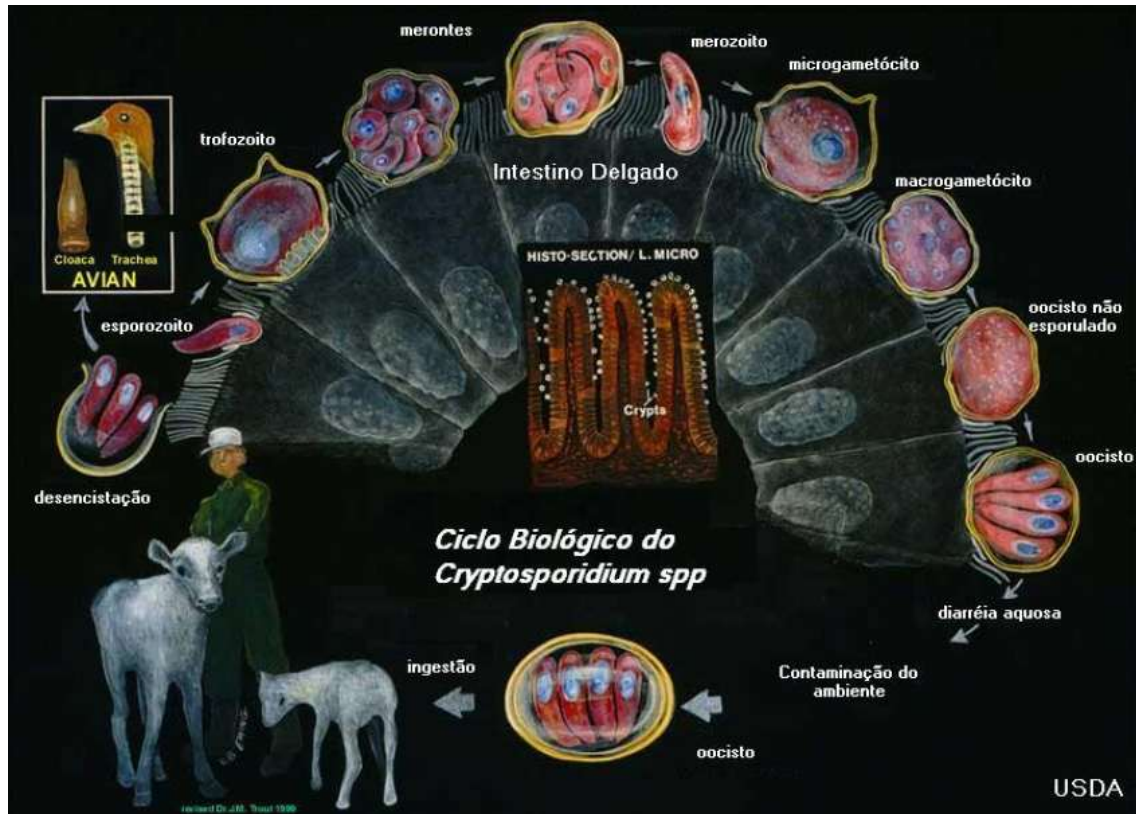
Após a fertilização, o macrogameta desenvolve-se em oocisto, podendo formar oocistos de parede delgada, que são responsáveis por autoinfecção. Capazes de iniciar um novo ciclo dentro do mesmo hospedeiro, e os de parede espessa, que são eliminados nas fezes e são resistentes às condições ambientais. A esporulação dos oocistos ocorre logo após sua formação, eliminados em sua forma infectante, o que potencializa a possibilidade de infecção de novos hospedeiros (DUBEY et al.,1990).

O potencial infeccioso de *Cryptosporidium* spp. está relacionado às características como: tamanho reduzido e baixa velocidade de sedimentação dos oocistos na água; baixa dose infectante (menos de 10 oocistos) e por serem eliminados já em sua forma infectante; grande quantidade de excreção de oocistos pelos hospedeiros infectados; baixa especificidade por hospedeiros mamíferos. (DILLINGHAMA et al., 2002; XIAO et al., 2004).

Os oocistos eliminados no ambiente são bastante sensíveis à dessecação, ao congelamento e às temperaturas de 55°C/30 segundos ou 70°C/5 segundos (FUJINO et al., 2002). Porém são extremamente resistentes à ação do cloro utilizado no tratamento de água (XIAO et al, 2004), e podem permanecer viáveis no

ambiente por até três meses em temperatura de 25-30°C, seis meses em temperatura de 20° C ou sete meses quando armazenados em água a 15°C (ANDERSON, 1985; FAYER et al., 1998).

Figura 1 – Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp. (Adaptado de USDA*)



*United States Department of Agriculture

3.5 Mecanismos de transmissão

A transmissão de *Cryptosporidium* spp. ocorre principalmente pela propagação fecal-oral de oocistos por contato direto com pessoa-pessoa ou animal-pessoa, e indiretamente pela ingestão de alimento e água contaminados (OVERGAAUW et al., 2009; BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010.; XIAO, 2010). Ocorre, também, a possibilidade de infecção por meio do ar contaminado por oocistos ou mesmo durante a relação sexual (FAYER et al., 2000).

Alguns surtos de criptosporidiose já foram relatados em humanos, que haviam trabalhado diretamente com animais infectados, como veterinários e tratadores e profissionais da área de saúde como, médicos, enfermeiros e laboratoristas expostos a materiais contaminados (MORGAN et al., 1997; RUSH et al., 1990).

3.6 Patologia

O potencial infeccioso de *Cryptosporidium* spp. está correlacionado às características como: o seu tamanho reduzido (4 µm- 6 µm) , baixa velocidade de sedimentação dos oocistos na água, baixa dose infectante (menos de 10 oocistos) e por serem eliminados já em sua forma infectante (DILLINGHAMA et al., 2002; XIAO et al., 2004).

As manifestações clínicas, por este patógeno dependem da espécie isolada, idade e estado imunológico do hospedeiro. A intensidade dos sinais clínicos varia desde a forma subclínica até a forma grave (DUBEY et al.,1990).

A diarreia ocorre devido às alterações da mucosa intestinal, que é provocada pela diminuição da superfície absorptiva, devido à atrofia e fusão das microvilosidades (ABREU, 2001). A infecção severa por este patógeno pode levar de quatro a seis semanas para uma completa recuperação. Outros agentes patógenos como *Giardia*, *Lambliia*, *Escherichia coli* e rotavírus podem acometer os animais jovens, contribuindo para severidade da infecção do *Criptosporidium* spp. (RALSTON et al., 2003).

Em indivíduos imunocompetentes, criptosporidiose pode manifestar-se na forma subclínica ou na forma de uma diarreia autolimitada, ocorrendo de cinco a dez dias (ISAACS et al.,1985). Já em indivíduos imunocomprometidos, o quadro clínico de diarreia é caracterizado por fezes aquosas, frequentes e volumosas, seguidas de dor abdominal, cólica, náuseas e vômitos, anorexia, podendo ocorrer febre e grande perda de peso. Em quadros mais graves, podem levar a óbito, devido à má-absorção intestinal e a desnutrição (PITLIK et al.,1983; MULLER et al., 1993).

3.7 Diagnóstico

Os métodos tradicionalmente mais utilizados para o diagnóstico deste protozoário consistem na detecção direta do parasito por meio de microscopia óptica (FALL et al.,2003).

Inúmeros métodos de concentração podem ser usados com os objetivos de aumentar a sensibilidade do exame e de diminuir os artefatos fecais (De CARLI, 1994). Como o método de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (técnica de Faust), Sheather com centrífugo-flutuação em sacarose e o método de centrífugo-sedimentação pelo formaldeído-éter (técnica de Ritchie modificada).

As técnicas colorimétricas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. mais empregadas são: Kinyoun, Ziehl-Neelsen, os quais podem ser feitos após a fixação de esfregaços de fezes frescas ou preservadas (De CARLI,1994). E safranina de azul de metileno, considerada rápida, simples e eficaz para a detecção de oocistos (BAXBY et al.,1984).

Os diagnósticos desse gênero baseado em métodos morfométricos acabam sendo pouco confiáveis (PÉREZ-CORDON et al., 2005). O método de Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) é mais sensível e específico podendo ser feito diagnóstico em amostras com baixa concentração de oocistos (MORGAN & THOMPSON, 1998).

3.8 Tratamento

Segundo Schnyder et al. (2009), mais de duzentas substâncias terapêuticas têm sido testadas para o controle de *Cryptosporidium* spp. Algumas drogas testadas como a halofuginona e decoquinato causaram efeitos positivos em estudos realizados com bezerros.

A halofuginona reduziu a excreção de oocistos e o decoquinato aumentou a média de ganho de peso diário de bezerros (SCHNYDER et al.,2009).

Em animais já foram testadas inúmeras drogas terapêuticas porém sem sucesso (AMARANTE, 1992). Não existe tratamento eficaz contra a criptosporidiose. Em indivíduos imunocomprometidos é necessária à hidratação intensa seguida de medicação, e para indivíduos imunocompetentes não é necessário um tratamento específico (ASHBOLT, 2004).

3.9 Prevenção e controle

A adoção de medidas de controle e prevenção ajudam a reduzir a incidência e gravidade de diarreia neonatal em bezerro. Bem como a redução do número de animais no mesmo local, evitando aglomerações, higiene local, isolamento de animais doentes, utilização de espaços limpos e secos, são fatores que diminuem a ocorrência da doença (BARRINGTON et al.,2002). É recomendado, também, controlar a veiculação hídrica do *Cryptosporidium* spp., impedindo que fezes de animais cheguem a rios e mananciais (KANJO et al.,2000).

3.10 Importância em Saúde Pública

Infecções em seres humanos por *Cryptosporidium* spp. ocorrem tanto em populações na área urbana quanto na área rural (MEINHARDT et al., 1996). O bezerro tem um papel importante na criptosporidiose humana, onde a infecção tem incidência de aumento devido ao manejo inadequado do rebanho (HUNTLEER et al., 2004). Sendo que as espécies mais frequentes em humanos são *C. parvum* e *C. hominis* (SMITH et al., 2006).

A ocorrência dessas espécies em humanos varia de acordo com áreas geográficas e condições socioeconômicas. Em países europeus e na Nova Zelândia, *C. hominis* e *C. parvum* são comumente detectados em humanos (SNEL et al., 2009; RYAN et al., 2014). Anteriormente, acreditava-se que no Reino Unido a principal espécie responsável pela criptosporidiose humana era o *C. parvum*, mas na década de 2000 descobriu-se que 50,3% dos casos eram associados a *C. hominis* e 45,6% a *C. parvum*. Outros estudos conduzidos na Austrália, Canadá, Europa, Estados Unidos e Japão também mostraram maior prevalência de *C. hominis* (XIAO & FAYER, 2008; RYAN et al., 2014).

Há diferença, também, na distribuição geográfica de *C. parvum* e *C. hominis* dentro de um mesmo país. Nos Estados Unidos, Reino Unido e Nova Zelândia *C. parvum* é mais comumente encontrado em áreas rurais e *C. hominis* em áreas urbanas (XIAO & FAYER, 2008; RYAN et al., 2014). Esta diferença na distribuição é provavelmente devida às diferentes fontes e rotas de transmissão (RYAN et al., 2014), apoiando a probabilidade de criptosporidiose zoonótica (XIAO & FAYER, 2008).

C. parvum pode apresentar dois tipos de genótipos, como agentes etiológicos de diarreia em humanos. O genótipo I, infectando somente humanos e o genótipo II infectando humanos e bovinos (PIENIAZEK et al., 1999, SULAIMAN et al., 1998).

Entre os humanos há dois tipos de transmissão: a antrozooponótica, que envolve principalmente *C. hominis* e ocorre mais frequentemente em áreas urbanas, devido à densidade populacional, e contato pessoa-a-pessoa (LAKE et al., 2007). E a transmissão zoonótica, mais frequente com *C. parvum*, e associado principalmente aos ruminantes, em sua maioria em áreas rurais (MORGAN et al., 1999).

3.11 Infecção em bovinos

Bezerros são mais suscetíveis a infecção por *Cryptosporidium* spp., já os adultos são considerados fontes de infecção para o ambiente e para rebanho, normalmente sendo portadores assintomáticos (O'DONOGHUE, 1995).

As principais espécies que infectam bovinos são: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. parvum*, *C. ryanae* ou/e *C. genótipo deer-like*.

C. andersoni colonizam as glândulas gástricas do abomaso (SANTIN et al., 2004). Segundo KVÁC et al. (2008), essa espécie acomete bezerros com idade superior a quatro semanas, e também podem acometer animais imunodeprimidos no período pós-desmame e bovinos adultos. Geralmente os animais acometidos não apresentam diarreia ou sinais clínicos visíveis.

C. bovis ocorre, principalmente, em animais com três meses a dois anos de idade (FAYER et al., 2006).

Uma nova espécie de *Cryptosporidium* spp. em bovinos foi diagnosticada e denominada como *Cryptosporidium* genótipo *deer-like* e depois nomeado de *C. ryanae*. Esta espécie é semelhante morfológicamente a *C. bovis* e *C. parvum*, diferenciando apenas nos tamanhos de seus oocistos (FAYER, 2008).

C. hominis foi identificado em bovinos na Escócia, Coréia e Índia (FENG et al., 2007; PARK et al., 2006; SMITH et al., 2005).

Bezerros lactentes são infectados por *C. parvum*, e são considerados como reservatórios desta espécie, o qual apresenta um alto potencial zoonótico (FEITOSA et al., 2004; CARDOSO et al., 2008).

No Brasil, tem sido relatada a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de bovinos nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (ALMEIDA et al., 2008; CARDOSO et al., 2008).

Bezerros de aptidão leiteira que são criados de forma extensiva são raramente acometidos, já os que são mantidos em confinamento estão mais predispostos à infecção por *C. parvum* (MARTINS-VIEIRA et al., 2009).

Segundo Sanford & Josephson (1982), em bezerros recém-nascidos com diarreia pode-se verificar um grande número de estágios evolutivos para *Cryptosporidium* spp. em enterócitos do jejuno e íleo.

Os principais sinais clínicos observados em bovinos caracterizam-se por apatia, desidratação, anorexia e diarreia profusa (ENEMARK et al., 2003). A duração dos sintomas dependem de inúmeros fatores, como a contaminação ambiental,

virulência, infectividade da amostra, suscetibilidade do hospedeiro e idade da primo-infecção (LORENZO et al.,1995)

Graaf et al. (1999) descrevem *C. parvum* como o principal patógeno causador de diarreia em bezerros, resultando em perdas econômicas aos produtores (HARP et al.,1998). A mortalidade de bovinos por *Criptosporidium* spp. geralmente é baixa, podendo ser elevada quando associada a outros patógenos (CHERMETTE & BOUFASSA-OUZROUT, 1988).

Artigo 1

Conforme as normas da revista Brazilian Journal of Veterinary Parasitology
<http://www.cbpv.com.br/rbpv>

Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros leiteiros: comparação entre métodos de colorações e imunofluorescência indireta

Detection of oocysts of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples of dairy calves: comparison between staining methods and indirect immunofluorescence

Bruna Baccega¹, Juliana Montelli Fenalti, Andrios da Silva Moreira¹, Cibele Velleda dos Santos¹, Daniela Isabel Brayer Pereira, Eliza Simone Viegas Sallis²

¹Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 18, Sala 14. UFPel- Campus Universitário Capão do Leão, s/nº. Pelotas, RS, Brasil.

²Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Medicina Veterinária-UFPel, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brasil.

RESUMO- Criptosporidiose é uma doença entérica grave, responsável por causar grandes impactos econômicos, ocasionando manifestações clínicas variadas e eventual mortalidade, principalmente em animais jovens. Este estudo objetivou comparar técnicas de coloração para a detecção de oocistos *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros leiteiros, provenientes dos 22 municípios da Região Sul do Rio Grande do Sul. Amostras fecais foram colhidas diretamente do reto de 359 bezerros de diferentes raças, machos e fêmeas, com até doze meses de idade. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados por meio dos métodos colorimétricos de Auramina, Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen, os materiais corados foram visualizados na microscopia óptica. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados em 6,69% (24/359) das amostras analisadas. Dentre as 68 propriedades analisadas, em 24 delas foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp., correspondendo a 35,29%. Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que a infecção por *Cryptosporidium* spp. está presente em rebanhos bovinos de diferentes municípios da região Sul, podendo esta espécie animal, atuar como uma importante fonte de infecção do subtipo zoonótico de *Cryptosporidium* spp. para outras espécies animais, em especial para o ser humano.

Palavras-Chave: Criptosporidiose, Zoonose, Métodos colorimétricos, fezes, bovinos leiteiros, diarreia, diagnóstico.

ABSTRACT- Cryptosporidiosis is a serious enteric disease, responsible for causing great economic impacts, causing various clinical manifestations and eventual mortality, especially in young animals. This study aimed to compare staining techniques for the detection of oocysts *Cryptosporidium* spp. in feces of dairy calves, from the 22 cities of the Southern Region of Rio Grande do Sul. Fecal samples were collected directly from the rectum of 359 calves of different breeds, male and female, up to twelve months old. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. were observed using the colorimetric methods of Auramine, Kinyoun, Safranine and Ziehl-Neelsen, the stained materials were visualized by light microscopy. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. were observed in 6.69% (24/359) of the analyzed samples. Among the 68 analyzed properties, in 24 of them were found oocysts of *Cryptosporidium* spp., corresponding to 35.29%. Through the obtained results, it can be concluded that the infection by *Cryptosporidium* spp. is present in bovine herds of different cities of the South region, and this animal species can act as an important source of infection of the zoonotic subtype of *Cryptosporidium* spp. for other animal species, in particular for humans

Key words: Cryptosporidiosis, Zoonosis, Colorimetric methods, feces, dairy cattle, diarrhea, diagnosis.

INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. são reconhecidos causadores da condição denominada criptosporidiose, classificada como doença emergente e re-emergente, responsável por causar diarreia em vertebrados, incluindo bovinos e o homem (FAYER, 2008; YODER *et al.*, 2012; ROBERTSON & CHALMERS, 2013). Criptosporidiose em bovinos foi relatada pela primeira vez no ano de 1971, em animais com quadro de diarreia crônica em bezerros (PANCIERA, 1971). Desde então, a doença tem sido descrita em bovinos em todo o mundo, sendo diagnosticada tanto em rebanhos de bovinos de corte, como de aptidão leiteira (MEIRELES *et al.*, 2011; NAZELHOSSEINI-MOJARAD *et al.*, 2011). Em bovinos, os bezerros neonatos são mais susceptíveis à infecção clínica, cursando com diarreia intensa, elevada morbidade e até a morte (CHAKO *et al.*, 2010). Os animais adultos podem ou não apresentar sinais clínicos, são considerados fontes de infecção para

o ambiente e para o rebanho bovino, sendo geralmente portadores assintomáticos (KHAN *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2011).

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. são considerados zoonóticos, responsáveis pelo acometimento gastrointestinal. Os sinais clínicos e a sua gravidade geralmente estão associados à cepa de *Cryptosporidium* spp. e ao estado imunológico do hospedeiro (BROGLIA *et al.*, 2008; XIAO, 2010).

A infecção dos hospedeiros ocorre pela ingestão de oocistos, que são eliminados juntamente com as fezes de portadores, na forma infectante. Os oocistos são resistentes às condições ambientais podendo permanecer infectantes por longos períodos (GRACZYK *et al.*, 2008; THOMPSON *et al.*, 2008). A transmissão geralmente está associada ao contato com animais e/ou através da contaminação alimentar ou hídrica (CHALMERS *et al.*, 2011; RYAN *et al.*, 2014).

Vários métodos foram desenvolvidos para o diagnóstico de criptosporidiose, sendo que os mais tradicionalmente utilizados consistem na detecção direta do parasito por observação microscópica (FALL *et al.*, 2003). As técnicas colorimétricas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. comumente empregadas são Kinyoun e Ziehl-Neelsen, as quais podem ser feitas após a fixação de esfregaços de fezes frescas ou preservadas (De CARLI, 1994). Além dessas, a coloração empregando Safranina de azul de metileno é considerada rápida, simples e eficaz para a detecção de oocistos (BAXBY *et al.*, 1984). No entanto essas técnicas podem apresentar baixa sensibilidade e resultados falso-positivos. A imunofluorescência indireta (IFI) tem mostrado maior sensibilidade e especificidade do que os métodos convencionais na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (XIÃO & HERD 1993).

Pesquisadores têm relatado em seus estudos a ocorrência de divergências entre a eficiência dos diferentes métodos coproparasitológicos para a detecção de oocistos *Cryptosporidium* spp. (FEITOSA *et al.*, 2004).

O objetivo do presente trabalho foi de avaliar os resultados obtidos pelos métodos colorimétricos em esfregaço de fezes, corados pelas técnicas de Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen e pela IFI para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros leiteiros da região sul do RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise comparativa entre os diferentes métodos de coloração foram coletadas amostras fecais de 359 bezerros com até um ano de idade, de 68 propriedades leiteiras da região sul do Rio Grande do Sul. Com auxílio de uma luva de palpação retal as fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais, devidamente contidos, acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e mantidas sob refrigeração até seu processamento.

As fezes foram classificadas de acordo com Silverlas et al., (2009), em consistência firme ou pastosas, não diarreicas e, líquidas ou semi-líquidas como diarreicas. As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, através dos quatro métodos de coloração. Os métodos utilizados seguiram o protocolo estabelecido, de acordo as orientações estabelecidas por Rey (1991). Método de Ritchie (1948) modificado por Young (1979), baseado na concentração por sistema de centrifugo sedimentação em Acetato de Etila.

Das amostras coletadas foram pesadas quatro gramas de fezes, transferindo-as para um becker, acrescentando-se 10 ml de água destilada. Após homogeneização, o material foi filtrado em gaze dobrada quatro vezes e transferido para tubos de ensaio e centrifugados a 300 rpm por três minutos. Este procedimento foi repetido de três a quatro vezes, até a limpeza das amostras. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se dois ml solução de formol a 10% e três ml de acetato de etila. Para a análise desse material, centrifugaram-se as amostras formolizadas por 10 minutos a 300rpm, descartando-se o sobrenadante. O sedimento obtido foi utilizado para a confecção dos esfregaços.

De cada sedimento obtido nesse procedimento, foram confeccionadas três lâminas para cada método, através de esfregaços fecais, e coradas pelas técnicas de coloração de Auramina "O" Fenicada (HENDERSON et al.,1942), Kinyon (MOURA & OLIVEIRA, 1985), Ziehl-Neelsen (GARCIA et al.,1983) e Safranina (BAXBY et al., 1983). As três lâminas confeccionadas foram observadas no microscópio óptico, com exceção das destinadas a técnica de coloração por Auramina "O" Fenicada, que foram visualizadas no microscópio de fluorescência.

Para a confirmação das amostras, foi utilizado um microscópio com ocular contendo régua de medição. Todas as técnicas foram previamente testadas em

amostras positivas. Para a realização dos métodos, sempre utilizou-se um controle positivo.

A associação dos resultados dos exames coproparasitológicos com as variáveis de sensibilidade das técnicas foram analisadas pelo programa EPI INFO (Versão 7.1 Center for Disease Control, Atlanta, USA) utilizando o teste de qui-quadrado (χ^2). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, em 06/06/2016, sob o protocolo 23110.001818/2016-73.

RESULTADOS

De um total de 359 amostras fecais incluídas no estudo, 24 (6,69%) apresentaram positividade para oocistos de *Cryptosporidium* spp., nos quatro métodos colorimétricos utilizados. O procedimento de Auramina permitiu uma maior observação de oocistos em 10,61% dos casos (n=38), seguido do método de coloração de Safranina, com 6,69% (n=25) e para os métodos de Kinyoun e Ziehl-Neelsen 6,69% (n=24). Nos quatro métodos utilizados foi identificado os 335 casos negativos (Tabela 1).

Tabela 1- Comparação entre os métodos colorimétricos para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais.

Métodos	N(%) NEG	POS
AURAMINA	321(89,39)	38(10,61)
KINYOUN	335(93,31)	24(6,69)
SAFRANINA	334(93,04)	25(6,69)
Z-N	335(93,31)	24(6,69)

Quando considerada a comparação das técnicas para a detecção de oocistos presentes nas preparações submetidas ao processo de centrífugo-sedimentação, foram detectados oocistos em 38 esfregaços submetidos à coloração de Auramina.

As colorações de Kinyoun e Ziehl-Neelsen, permitiram a detecção de 24 amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp., enquanto o método de Safranina, detectou 25 amostras positivas.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, das 68 propriedades leiteiras que foram coletadas amostras fecais de bezerros para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* spp.,

em 24 dessas propriedades (35,29%) haviam bezerros positivos para o agente, o que corrobora com os achados por outros autores, em que a positividade nas propriedades para este patógeno, variou de 10 a 100% (GARCIA & LIMA 1994; NETA et al., 2010) e de 6,67 a 71,4% (VENTURINI et al., 2006).

Dentre as técnicas utilizadas, o método de imunofluorescência indireta com a coloração de Auramina, mostrou-se mais sensível para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de fezes de bezerros.

No presente estudo a prevalência de *Cryptosporidium* spp. por esta técnica, foi de (6,69%), dados similares aos observados nos estados de São Paulo com 9,43% de prevalência (RIBEIRO et al, 2000), no Paraná com 8,3% de prevalência (MACEDO, 2014) e em Minas Gerais com 9,2% (LANGONI et al. 2004) em bovinos com aptidão leiteira.

Neste trabalho, esta técnica propiciou uma melhor visualização dos oocistos que apresentavam diferentes tonalidades de amarelo a esverdeado brilhante em microscópio fluorescente, considerando-se uma técnica de eleição para ser utilizada em laboratórios para triagem de amostras, como mencionado por Quadros & Araújo (2003). Segundo esses autores o método de coloração de Auramina permite rastrear a lâmina com objetiva de 40x, possibilitando uma visualização mais rápida em todos os campos. Por outro lado, esse método não deve ser utilizado sozinho para o diagnóstico de criptosporidiose, por apresentar um número elevado de amostras fecais falso-positivas (QUADROS & ARAÚJO, 2003). Como observado no presente estudo, em que das 38 amostras fecais positivas para o patógeno pela Auramina, 14 amostras foram positivas somente nesse método, sendo que nas outras técnicas de coloração o resultado dessas amostras foi negativo.

Métodos colorimétricos (Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen) são adequados para detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, por apresentarem relativa facilidade no preparo das soluções. Além de exigir apenas equipamentos já existentes na maioria dos laboratórios que realizam o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. Entretanto, o preparo do esfregaço e a coloração requer muitas etapas e muito tempo, o que dificulta sua utilização em larga escala. Ainda, a sensibilidade dos métodos pode ser diminuída em amostras contaminadas com grande quantidade de leveduras ou baixa concentração de oocistos nas fezes. Por isso, para a correta identificação dos oocistos ao microscópio, é necessário treinamento e experiência do observador (KEHL et al.,

1995; IGNATUS et al., 1997; FAYER et al., 2000). No presente trabalho, nos métodos de Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen, houve uma melhor visualização dos oocistos que apresentavam diferentes tonalidades de róseo-avermelhado e os esporozoítos foram facilmente observados na maioria dos oocistos presentes. Essas técnicas mostraram-se eficazes para o diagnóstico de criptosporidiose; porém, evidenciou-se a necessidade da utilização simultânea de pelo menos duas técnicas, conforme descrito por outros autores (NETA et al., 2010).

Corroborando com nossos resultados, diversos estudos têm demonstrado a utilização de métodos de coloração na detecção de *Cryptosporidium* spp. como no estudo de Martinez et al. (2001), frente a tais dificuldades, realizaram modificações na coloração de contraste do método de Kinyoun, a fim de facilitar a visualização dos oocistos. Os mesmos autores, todavia, descrevem que, em amostras com pouca quantidade de oocistos, tais modificações não melhoraram a sensibilidade e especificidade do método.

Com relação ao método de Auramina, apresenta maior afinidade para os oocistos de *Cryptosporidium* spp., do que os que utilizam fucsina de Ziehl-Neelsen, demonstrando ser esse método mais vantajoso quando comparado com o de Ziehl-Neelsen. E, também, a sua leitura é mais rápida. Sendo, portanto, a técnica de eleição para ser utilizada num grande número de amostras ou para estudos epidemiológicos. Isto é corroborado pelo estudo por Diaz-Lee et al (2015).

Mundin et al. (1995) analisando 112 fezes de bezerros provenientes do município de Uberlândia-MG, compararam quatro métodos laboratoriais para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Método de Sheather (18,18%), método de Ziehl-Neelsen (30,12%), Safranina azul de metileno (28,12%) e Kinyoun (27,14%), observaram resultados similares na detecção de oocistos deste protozoário. No presente estudo, baseado no número de amostras, os resultados foram similares.

A prevalência observada por Cunha et al. (2002) para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. pelo método de Ziehl-Neelsen foi de 9,3% e para PCR 10,12%; mostrando que estes resultados foram similares com os apresentados neste estudo, não ocorrendo diferença significativa entre as técnicas utilizadas.

Vários métodos de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes têm sido utilizados por pesquisadores. O método Ziehl-Neelsen, baseado no reconhecimento da morfologia específica do parasito pela microscopia de luz

(ARROWOOD, 1997) e a Polymerase Chain Reaction (PCR), técnica fundamentada na extração e amplificação do material genético do parasito são alguns exemplos, entretanto, BROOK et al. (2008) afirmam que nenhuma técnica é 100% sensível e específica (TAYLOR & WEBSTER, 1998).

Sobre as vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas, deve-se mencionar que a principal vantagem de Ziehl-Neelsen, Kinyoun e Safranina como técnicas de diagnóstico é o seu baixo custo, visto que as lâminas coradas por estes reagentes podem ser armazenados por muito tempo, ao contrário da IFI, em que a duração da coloração, dura em torno de 72 horas (BROOK et al., 2008). Como desvantagem dessas três colorações, é o maior tempo que se utiliza para visualizar uma lâmina no microscópio ótico (MUÑOZ et al., 2011).

Vale ressaltar que para o método de Auramina é necessário a utilização de um microscópio de fluorescência, o que nem sempre está disponível em laboratórios e, também, a fluorescência de fundo da amostra pode representar um problema de leitura em esfregaços corados com essa coloração se o espécime tem uma grande quantidade de detritos fecais (BROOK et al., 2008), no presente estudo, não foram encontradas tais dificuldades, para a realização das colorações, bem como, a leitura das lâminas, para o diagnóstico de criptosporidiose.

CONCLUSÕES

O método de coloração de Auramina "O" Fenicada demonstrou ser um bom método para triagem de amostras positivas, o que facilitou a detecção dos oocistos que se apresentam fluorescentes quando observados ao microscópio de imunofluorescência, seguido pelos outros métodos de colorações para a confirmação da positividade da amostra.

Os métodos utilizados apresentaram excelente sensibilidade na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de bezerros. Os testes de Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen devido sua precisão e baixo custo, pode ser o método de escolha na rotina clínica para o diagnóstico de criptosporidiose.

REFERÊNCIAS

ARROWOOD, M.J. 1997. Diagnosis. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Fayer R (ed), CRC Press, New York.

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, 1983.

BAXBY D, HART CA, BLUNDELL N. Shedding of oocysts by immunocompetent individuals with cryptosporidiosis. **Journal of Hygiene** , v.95, n.3, p.703–709, 1985.

BROGLIA, A.; RECKINGER, S.; CACCIÓ, S.M.; NÖCKLER, K. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 154, n. 1-2, p. 8-13, 2008.

BROOK, E.; HART, C.A.; FRENCH, N.; CHRISTLEY, R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 1-2, p. 46-52, 2008.

CHALMERS, R. M.; SMITH, R.; ELWIN, K.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; GILES, M. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004–2006. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 05, p. 700-712, 2011.

CHAKO, C.Z.; TYLER, J.W.; SCHULTZ, L.G.; CHIGUMA, L.; BEERNTSEN, B.T. Cryptosporidiosis in people: It's not just about the cows. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 37-43, 2010.

CUNHA, M. J. R da; ARANTES, V. M.; SILVA, M. B. de O.; CURY, M.C. Comparação da eficácia do Ziehl-Neelsen e da Reação em Cadeia de Polimerase (pcr) para o diagnóstico do *Cryptosporidium* spp. em bovinos e suínos provenientes da região de Uberlândia. 2002

DAS, G.; CHANGKIJA, B.; SARKAR, S.; DAS, P. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* isolates in bovine population in Kolkata and characterization of new bovine genotypes. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 246-250, 2011.

DECARLI, G.A. **Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas –Métodos e Técnicas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 313p. 1994.

DIAZ-LEE, A, MOLINA, R, DOUGNAC, C., MERCADOB, R.; RETAMALA, P., FREDESA, P. Sensibilidad analítica de técnicas de tinción tradicionales y una técnica molecular para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. aislados de bovinos en muestras de agua: estudio preliminar. **Archive medicine veterinary**, v.47, n1, p.91-96, 2015.

FAYER R, MORGAN U, UPTON SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal of Parasitology**. v.30, n.12-13,p.1305-1322, 2000.

FAYER, R., SANTIN, M. AND TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplex: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology** v.156, n.3-4, p. 191–190, 2008.

FALL, A., THOMPSON, R.C.A., HOBBS, R.P., MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 399-402, 2003.

FEITOSA, F. L., 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**, v. 34, n.1, p. 189- 193, 2004.

GARCIA, L.S., BRUCKNER, D.A., BREWERT, T.C., SMINITZU, R.Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **Journal Clinical of Microbiology**, v.18, n.1, p.185-190, 1983.

GARCIA, A.M., LIMA, A.D. Frequência do *Cryptosporidium* em bezerros lactentes de rebanho leiteiros de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, n.2, p.193-198, 1994.

GRACZYK, T. K.; MAJEWSKA, A. C.; SCHWAB, K. J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 2, p. 55-59, Feb2008.

HENDERSON, H.J.; SPAULDING, E.H.; GAULT, E.S. Demonstration of globi and leprosy bacilli by fluorescence microscopy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.50, p.91-2, 1942.

IGNATIUS, R., EISENBLÄTTER, M., REGNATH, T., MANSMANN, U., FUTH, U., HAHN, H., WAGNER, J. Efficacy of different methods for detection of low *Cryptosporidium parvum* oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimens- *Eur. Journal Clinical Microbiology Infections Diseases*, v.16, n.10, p.732-6, 1997.

KHAN, S.M.; DEBNATH, C.; PRAMANIK, A.K.; XIAO, L.; NOZAKI, T.; GANGULY, S. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.171, n. 1-2, p. 41-47, 2010.

KHEL, K. S. C.; CIRELLO, H.; HAVENS, P. L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 416-418, 1995.

LANGONI, H., LINHARES, A.C., AVILA, F.A., DA SILVA, A.V., ELIAS, A.O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, n.5, p.313-319, 2004.

MACEDO, R. *Detecção e caracterização molecular de picobirnavirus em fezes de bezerros naturalmente infectados*. [Dissertação] Paraná, Universidade Federal do Paraná, 2014.

MARTINEZ, I., BELDA NETO, F.M. Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo** , v.43, n.2, p.79-82, 2001.

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**, Berlin, v. 109, n. 3, p. 949-951, 2011.

MOURA, H., OLIVEIRA, L. M. *Cryptosporidium*: parasito de imunocomprometidos. **Revista Brasileira Patologia Clínica**, v.21, n.6, p.198-201, 1985.

MUNDIN, M.J.S.; SOUZA, L. M. de; MUNDIM, A.V.; MORAIS, R.N. Frequência de oocistos de *Cryptosporidium* sp em fezes de bezerros criados sob condições naturais no município de Uberlândia, analisadas por quatro métodos laboratoriais. **Veterinária Notícias**, v.1, n.1, p. 33-36, 1995.

MUNÕZ P, F FREDES, A DIAZ-LEE, R MERCADO, L OZAKI. Deteccion de *Cryptosporidium* spp. em terneras de lecherias de la Region Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografia y ensayo molecular. **Archive Medicine Veterinary** ,v.43, n.2, p. 111-116, 2011.

NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E.; HAGHIGHI, A.; TAGHIPOUR, N.; KESHAVARZ, A.; MOHEBI, S.R.; ZALI, M.R.; XIAO, L. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 179, n. 1-3 ,p. 250-252, 2011.

NETA, E. S. M., SAMPAIO, D. C., GALVÃO, G S., MUNHOZ, A. D. Oocistos de *Cryptosporidium* (Apicomplexa: cryptosporidiidae) em bovinos leiteiros de uma área endêmica na Microrregião de Ilhéus-Itabuna, Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.32, n.2, p.75-78, 2010.

PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. *Cryptosporidial* infection in a calf. **Veterinary Pathology**, Amsterdam, v.8, p.479-484, 1971.

QUADROS, R. M. D.; ARAÚJO, F. A. P. de. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp. Tyzzer, 1907 detectada pelo método de imunofluorescência através da técnica de coloração da auramina em bovinos em propriedades rurais do município de Lages (SC), Brasil. **Revista de Ciência Agro veterinária**, v.2, n.1, p.68-73, 2003.

QUADROS, R. M. D.; MARQUES, S. M. T.; AMENDOEIRA, C. R. ; SOUZA, L. A. de; AMENDOEIRA, P. R.; COMPARIN, C. C. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl-Neelsen staining methods. **Parasitologia Latinoamericana**, v.61, n.3-4, p.117-120, 2006.

RIBEIRO M.G., LANGONI H., JEREZ J.A., LEITE D.S., FERREIRA F. & GENNARI S.M. Identification of enteropathogens from buffalo calves with and without diarrhoea in the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.2, p.34-39, 2000.

REY, L. **Parasitologia**. 2ªed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.1991.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the United States Army Medical Department**. v.8, n.4, p.326, 1948.

ROBERTSON, L. J.; CHALMERS, R. M. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? **Trends in parasitology**, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2013.

RODRIGUES, R. D.; GOMES, L. R.; SOUZA, R. R de; BARBOSA, F. C. Comparação da eficiência das colorações de Ziehl-Neelsen modificado e Safranina modificada na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida, cryptosporidiidae) a partir de amostras fecais de bezerros de 0 a 3 meses. **Ciências Animais Brasileira**, v.17, n.1, p. 119-125, 2016.

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.

SILVERLAS, C., EMANUELSON, U., VERDIER, K., BJORKMAN, C. Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 90, n.3, p.242-253, 2009.

TAYLOR, M.A.; WEBSTER, K.A. Recent advances in the diagnosis in livestock of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Giardia* and other protozoa of veterinary importance. **Research and Veterinaria Science**, v.65, n.,p.183-193, 1998.

THOMPSON, R. C.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Vet J**, v. 177, n. 1, p. 18-25, Jul2008.

VENTURINI, L., BACIGALUPE, D., BASSO, W., UNZAGA, J.M., VENTURINI, M.C., MORÉ, G. *Cryptosporidium parvum* em animais domésticos y em monos de um zoológico. **Parasitologia Latinoamericana**,v. 61, n.1-2, p. 90-93, 2006.

XIAO L, HERD RP. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Veterinary Parasitology**, v.55, n.3, p.257-62, 1993.

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

YODER, J. S.; WALLACE, R. M.; COLLIER, S. A.; BEACH, M. J.; HLAVSA, M. C.; CENTERS FOR DISEASE, C.; PREVENTION. Cryptosporidiosis surveillance United States, 2009–2010. **The Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries**, v. 61, n. 5, p. 1-12, 2012.

YOUNG, K. H., BULLOCK, S. L., MELVIN, D. M., SPRUILL, C. L. Ethyl Acetat as a substitute for Diethyl e Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Tecnique. **Journal Clinical Microbiology**., v.10, n.1,p. 852-853,1979.

Artigo 2

Conforme as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira
<http://www.pvb.com.br>

Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros no Sul do Rio Grande do Sul¹

Bruna Baccega², Juliana M. Fenalti³, Andrios da S. Moreira³, Cibele V. dos Santos³, Andreia Saggin Nagel³, Daniela I. B. Pereira⁴, Eliza Simone V. Sallis^{5**}

ABSTRACT.- Baccega B., Fenalti J.M., Moreira A. da S., Santos C.V. dos, Nagel A.S., Pereira D.I.B. & Sallis E.S.V. 2017. [Occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* spp. In faecal samples of calves in the South of Rio Grande do Sul]. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em bezerros da Região Sul, do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):000-000. Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: esvsallis@yahoo.com.br

Cryptosporidium spp. is an emerging parasite in Brazil and in the world, classified as one of the main causes of diarrhea in animals and man. The importance of this protozoan is mainly due to the fact that it has a wide variety of hosts, and present zoonotic potential. The oocysts of *Cryptosporidium* spp. are excreted in the feces infectively, and have high environmental resistance. This high environmental resistance allows the contamination of food, water and soil and contamination through ingestion allows the occurrence of large-scale outbreaks, which result in economic losses. The laboratory diagnosis is made from the detection of oocysts by coproparasitological methods. The present study aims to establish the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in calves of the Southern Region of the State of Rio Grande do Sul. Fecal samples were collected directly from the rectal ampule of calves up to 1 year of age, at the end of the study, totaling 359 samples. The faeces were processed by the modified Ritchie's method for sedimentation of the samples and fluorescence staining of Auramin "O" Fenicada, Kynioun, Safranin and Ziehl-Neelsen. Afterwards they were analyzed in a fluorescence microscope and optical microscope for oocysts. The results showed the presence of *Cryptosporidium* spp. in 6.69% (24) of the samples.

INDEX TERMS: Cryptosporidiosis, bovine, coccidia, epidemiology, zoonosis.

¹Recebido em

Aceito para publicação em

²Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil. Pesquisa de mestrado com apoio CAPES, CNPq (proc. 150246/2014-5).

³Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil.

⁴ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 18, Sala 14. Campus Universitário Capão do Leão, s/nº. CEP: 96160-000.

⁵Laboratório Regional de Diagnóstico, FV-UFPel, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS.

**Autor para correspondência: esvsallis@yahoo.com.br

RESUMO.- *Cryptosporidium* spp. é um parasito emergente no Brasil e no mundo, classificado como uma das principais causas de diarreia em animais e no homem. A importância deste protozoário deve-se principalmente ao fato de possuir uma ampla variedade de hospedeiros, e possuir potencial zoonótico. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são eliminados nas fezes de forma infectante, e possui alta resistência ambiental. Esta alta resistência ambiental viabiliza a contaminação de alimentos, águas e solo, a contaminação através da ingestão possibilita a ocorrência de surtos em alta escala, que resultam em prejuízos econômicos. O diagnóstico laboratorial é realizado a partir da

detecção de oocistos por meio de métodos coproparasitológicos. O presente estudo tem como objetivo estabelecer a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros da Região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. As amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal de bezerros com até 1 ano de idade, ao final do estudo totalizaram 359 amostras. As fezes foram processadas por meio do método de Ritchie modificado para a sedimentação das amostras e colorações de fluorescência de Auramina "O" Fenicada, Kynioun, Safranina e Ziehl-Neelsen. Posteriormente foram analisadas em microscópio de fluorescência e microscópio óptico para a pesquisa de oocistos. Os resultados encontrados revelaram a presença de *Cryptosporidium* spp. em 6,69% (24) das amostras.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: criptosporidiose, bovinos, coccídeos, epidemiologia, zoonose.

INTRODUÇÃO

O protozoário *Cryptosporidium* spp. é um parasito obrigatório, intracelular, que causa diarreia, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (FAYER et al., 2000). A criptosporidiose, zoonose com ampla distribuição geográfica, vem sendo estudada, particularmente devido a sua importância em saúde pública, sendo descrita em 95 países (FAYER et al., 1998). Mais de 40 espécies foram descritas em animais e no homem. Estas, diversas espécies, completam seu ciclo de vida no epitélio do trato gastrointestinal e/ou respiratório (ONGERTH & STIBBS, 1989).

A criptosporidiose bovina foi descrita pela primeira vez em 1971, em animais que apresentaram um quadro clínico de diarreia crônica (PANCIERA et al., 1971). Os bovinos podem ser infectados por quatro espécies de *Cryptosporidium*: *C. parvum*; *C. andersoni* (LINDSAY et al., 2000); *C. bovis* (FAYER et al., 2005) e *C. genótipo deer-like* (XIAO et al., 2004; FAYER et al., 2006). Esta enfermidade é uma das causas mais comuns de diarreia em bezerros com até 30 dias de idade, chegando a totalizar 37,2% dos casos (BLANCHARD, 2012). A maior prevalência de infecção ocorre em bezerros de até duas semanas de idade sendo considerada como uma das principais causas da diarreia neonatal bovina (AI MAWLY et al., 2015). Pode causar sérios prejuízos econômicos, como retardo no crescimento, mortalidade e gastos com medicamentos (SANTIN et al. 2008).

No homem, a transmissão ocorre de maneira fecal-oral, pessoa-pessoa e/ou animal-pessoa, pela ingestão de oocistos que estão esporulados e infectantes quando são excretados pelo hospedeiro (FAYER et al., 1997). A criptosporidiose se caracteriza por diarreia, desidratação, má absorção e perda de peso (TZIPORI & WARD, 2002). Segundo Al-Braiken et al. (2003), infecções autolimitantes podem ocorrer em indivíduos imunocompetentes e em pacientes imunocomprometidos, podendo a doença evoluir para a forma crônica e até mesmo causar a morte dos pacientes (ABRAHAMSEN et al., 2004).

O tamanho dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem variar de 4 µm a 6 µm, tal fator dificulta o diagnóstico, sem uma técnica de coloração auxiliar (IRWIN, 2000). Diferente de outros gêneros como *Toxoplasma*, *Isospora*, *Eimeria* e *Sarcocystis*, cujos oocistos variam de 10 a 40µm, é difícil a identificação da espécie através do tamanho, formato ou estruturas internas, já que estas não são bem distinguíveis em microscópio óptico (FAYER et al., 2000; XIAO & FAYER, 2008; MEIRELES, 2010). Dessa forma, a coloração dos esfregaços de fezes permite um diagnóstico mais confiável, rápido e simples na detecção de oocistos em amostras fecais (ARROWOOD, 1997).

Alguns oocistos de espécies de *Cryptosporidium* spp., como o *C. parvum*, podem permanecer viáveis por seis meses ou mais quando as condições de umidade e temperatura (20°C) forem ideais (XIAO & FAYER, 2008). Em ambientes mais quentes (30°C), a viabilidade dos oocistos diminui para três meses. Entretanto, ficam inviabilizados pelo calor, visto que os oocistos em temperaturas acima de 71,7°C são destruídos. No entanto, por serem resistentes ao frio, podem sobreviver vários dias em temperaturas negativas até -10°C, e até oito horas a -20°C (FAYER et al., 2000). Portanto, existem três importantes fatores, que contribuem para a infecção e manutenção do parasita: a grande quantidade de oocistos infectantes excretados no ambiente, a resistência ambiental e a alta infectibilidade de oocistos (RYAN et al., 2014).

No Brasil tem sido relatada a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de bovinos nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (FEITOSA et al. 2004, ALMEIDA et al. 2008, CARDOSO et al. 2008).

Dessa forma, o presente estudo objetivou determinar a ocorrência da infecção por protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 359 amostras fecais de bezerros com até um ano de idade, diretamente da ampola retal. Para a coleta foram visitadas 68 propriedades leiteiras de 22 municípios da área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. As propriedades foram escolhidas aleatoriamente dentro de cada município e, coletou-se um número mínimo de 10 amostras fecais/fazenda e uma amostra de fezes/animal.

As amostras foram devidamente acondicionadas, identificadas e remetidas ao Laboratório de Parasitologia Médica e Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Para a sua conservação foram armazenadas em Solução de MIF, a uma temperatura de 2 a 8 °C. Foi realizada a homogeneização das amostras seguindo por liquefação em água destilada estéril e esfregaço com duas gramas de fezes por amostra, segundo técnica descrita por Ritchie et al. (1948) modificado por Young (1979). As amostras foram fixadas em calor e submetidos ao método de Auramina "O" Fenicada (HENDERSON et al., 1942), coloração de Kinyon (MOURA & OLIVEIRA, 1985), Ziehl-Neelsen (GARCIA et al., 1983) e Safranina (BAXBY & BLUNDELL, 1983).

Durante as coletas, o responsável da propriedade foi entrevistado com base nos aspectos epidemiológicos da enfermidade. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, em 06/06/2016, sob o protocolo 23110.0011818/2016-73.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 359 amostras fecais, foram identificados oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de 24 bezerros leiteiros (6,69%), dos quais 13 animais (3,62%) apresentaram fezes diarreicas e 346 (96,38%), não diarreicas. A técnica de Auramina, embora tenha detectado um maior número de amostras positivas que as outras técnicas de colorações utilizadas, apresentou um maior número de falso-positivos, evidenciando-se a necessidade da utilização de mais de um método de detecção, para minimizar o risco de falso-negativos ou falso-positivos. Pelo método de coloração de Auramina 10,61% continham oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Tabela 1), e para os outros métodos de colorações 6,69% apresentaram oocistos nas amostras analisadas (Tabela 1).

Tabela 1-Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros

Métodos	Com Diarreia	Sem Diarreia	Total	p*
Auramina	4(30,77%)	34(9,68%)	38(10,61%)	0,03
Kinyoun	2(15,38%)	22 (6,36%)	24(6,69%)	-
Ziehl-Neelsen	2(15,38%)	324(93,64%)	24 (6,69%)	-
Safranina	2(15,38%)	22 (6,36%)	24(6,69%)	-

Nas propriedades leiteiras estudadas, os animais, em sua maioria, são criados juntos em um local para bezerros (potreiro) 54,04,3% (n=194), seguido do método de criação individual com o uso de estacas 37,05% (n=133). Sistemas de criação que possibilita a contaminação do ambiente por patógenos específicos.

No presente estudo a criptosporidiose foi mais frequente em bezerros jovens, com média de idade de 168 dias (10,58%), mantidos em sistema de criação com o uso de estacas ou criados em um mesmo local com vários bezerros, dados similares aos descritos

por outros autores, como Maldonado-Camargo et al. (1998), Faubert e Litvinski (2000) e Silva Junior et al. (2011). Cabe salientar que a maioria dos animais positivos, para oocistos em amostras fecais, não apresentavam sinais clínicos de diarreia e desidratação.

Evidenciou-se, também, que a agregação e a superlotação dos bezerros, sempre num mesmo local, foram os fatores determinantes para a contaminação do ambiente e a proliferação de micro-organismos, visto que a maioria dos animais eram criados em bezerreiros coletivos, nos seus primeiros meses. De acordo com Boufassa-Ouzrout et al. (1986), a transmissão da criptosporidiose é aumentada quando há contato direto de animais susceptíveis com infectados ou indiretamente pela exposição dos indivíduos susceptíveis a ambientes contaminados por *Cryptosporidium* spp.

Com relação a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos é bastante variada. Os índices variam de 0,6 a 82,54%, existindo relato de até 100,0% de acometimento dos animais (SOUZA et al., 1995; LIMA et al., 2013). Neste estudo, a prevalência encontrada em bovinos, independente da técnica utilizada, foi considerada baixa quando comparada com outros autores (Watanabe et al. 2005; Castro-Hermida et al. 2007; Geurdin et al. 2008; Ederli et al. 2004), provavelmente pelo número de amostras analisadas.

Das 359 amostras de fezes dos animais, foram visualizados oocistos de *Cryptosporidium* em 24 (6,69%). Estes achados foram similares aos encontrados por Castro-Hermida et al. (2007) que analisou 379 amostras de bovinos com idades entre três e 14 anos, verificando 32 (8,4%) amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. Estes achados foram inferiores aos encontrados por Almeida (2008) com 61%; e Venturini et al. (2006) com 26,6%, sendo que estes autores avaliaram animais de faixas etárias com até um ano de idade, que representam uma categoria mais predisposta à infecção pelo *Cryptosporidium* spp. Estas diferenças de resultados podem ser devido as variações epidemiológicas, número de amostras por propriedade, metodologia de diagnóstico empregada, dificuldade no reconhecimento dos oocistos, o fator mais importante, no entanto, é o padrão de excreção dos oocistos de forma intermitente, que pode levar a subestimação dos dados, principalmente no final da infecção. Portanto, deve-se levar em consideração todos esses dados na comparação entre prevalências.

Feitosa et al. (2004) avaliaram a prevalência de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em amostras de fezes de 459 bezerros com até 30 dias de idade e em amostras de água e piso dos bezerreiros de 33 propriedades leiteiras na região de Araçatuba, no Estado de São Paulo. A maior porcentagem de excreção de oocistos foi verificada em bezerros com faixa etária entre oito e 14 dias de idade (14,5%) sendo, a menor taxa (6,4%), detectada no grupo de animais mais velhos (22 a 30 dias de idade). Em nosso estudo os resultados obtidos diferem deste estudo, provavelmente pela idade dos animais que variou de cinco a 365 dias, tornando a grande maioria dos bezerros menos favoráveis a infecção por este protozoário e, também, pelo número de amostras analisadas. Quadros et al. (2000), que ao analisarem amostras fecais de bezerros de até três meses de idade, em Lages (SC), estimaram uma positividade de 17%, em 200 amostras analisadas. Estes achados foram superiores aos encontrados no presente estudo, possivelmente pela faixa etária dos bezerros analisados, pois são considerados uma categoria mais predisposta à infecção pelo *Cryptosporidium* spp.

CONCLUSÕES

A aglomeração de bezerros leiteiros e a contaminação ambiental, são os fatores determinantes para a instalação e ocorrência de criptosporidiose no rebanho.

O elevado número de animais assintomáticos observado nas propriedades visitadas, permitiu demonstrar que é necessário alertar os criadores a respeito da criptosporidiose, para que possam adotar práticas de manejo com o objetivo de diminuir a contaminação ambiental, evitando com isso, perdas econômicas.

Embora tenha sido observada uma baixa ocorrência do parasito nas amostras de fezes analisadas, o agente está presente no rebanho bovino leiteiro do sul do RS, podendo ocorrer infecção de animais susceptíveis, como bezerros neonatos e até riscos para a saúde pública, por ser uma doença considerada re-emergente.

REFERÊNCIAS

- Abrahamsen, M.S, Templeton T.J., Enomoto S., Abrahante J.E. & Zhu G.2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. Science, 304(5669):441-445.
- Al-Braiken F.A., Amin A., Beeching N.J., Hommel M & Hart C.A. 2003. Detection of *Cryptosporidium* amongst diarrhoeic and asymptomatic children in Jeddah, Saudi Arabia. Ann Trop Med Parasitol, 97(5):505–510.
- Almeida A.J., Monteiro M.I., Braga R.S., Mariano F. de A. & Caldeira M. C. 2008. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais errantes apreendidos em Campos dos Goytacazes, RJ. J. Bras. Cienc. Anim., 1(2):66-75.
- Al Mawly J., A. Grinberg D., Prattley J., Moffat J. Marshall J. & French N. 2015. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. Vet J, 203 (2):155–160.
- Arrowood M.J. Sterling, C.R & Healey M.C. 1991. Immunofluorescent microscopical visualization of trails left by gliding *Cryptosporidium parvum* sporozoites. J Parasitol. 77(2):315-31.
- Baxby, D., Blundell, N. 1983. Sensitive, rapid, simples methods for detectiong *Cryptosporidium* in feces. Lancet. 2(1): 1149.
- Blanchard P.C. 2012. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. Vet Clin Food Anim, 28:443-464.
- Boufassa-Ouzrout, S., Chernette, R. & Meissonier, E. 1986. La Cryptosporidiose - une maladie animale et humaine cosmopolita. Int Epizooties. 5(1):1- 97.
- Cardoso J. M. S., Silveira, F. L., Araújo, A. J.S., Carvalho J. C. C. de., Kanamura, H. Y.2008. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet, 17(1): p. 239-242.
- Castro-Hermida, J.A.; González-Warleta, A.A.M.; Costa, J.M.; Rumbo-Lorenzo, C.; Mezo, M. 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants, Parasitol Res, 101(5):1443-1448.
- Ederli B.B., Carvalho C.B. & Sales L.G. 2004. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13(8):45-48.
- Faubert G.M. & Litvinsky Y. 2000. Natural transmission of *Cryptosporidium* spp. between dams and calves on dairy farm. J. Parasitol. 86:495- 500.
- Fayer R., Speer C.A. & Dubey J.P. 1997. 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., Gasbarre L., Pasquali P., Canals A., Almeria S. & Zarlenga D. 1998. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. Int J Parasitol, 28(1): 49-56.
- Fayer R., Morgan U. & Upton S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol, 30(1):1305-1322.

- Fayer R., Santin M. & Xiao, L. 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). J. Parasitol. 91(3): 624– 629.
- Fayer R., Santin M., Trout J.M. & Dubey J. P. 2006. Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. Vet Parasitol, 140(1):44-53.
- Feitosa, F.L.F., Shimamura, G.M., Meireles, T.R.M.V., Nunes, C.M., Ciarlini, P.C. & Borges, A.S. 2004. Prevalencia de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. Cien Rur., 34(1):189-193.
- Garcia, L.S., Bruckner, D.A., Brewert, T.C. & Sminitzu, R.Y. 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. J Clin Microbiol. 18(1): 185-190.
- Henderson, H.J., Spaulding, E.H. & Gault, 1942. E.S. Demonstration of globi and leprosy bacilli by fluorescence microscopy. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 50(1):91-92.
- Irwin P.J. 2002. Companion Animal Parasitology: A clinical perspective. Int J Parasitol, 32(5): 581-593.
- Lima R.C.A, Aquino M.C.C, Inácio S.V, Viol M.A, Zucatto A.S, Silveira Neto L., Oliveira B.C.M., Vasconcelos E.M., Bresciani K.D., Oliveira G.P. & Costa AJ. 2013. Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em bezerros (*Bos taurus* e *Bos indicus*) no município de Formiga, Minas Gerais – Brasil. Semina: Ciências Agrárias.34(6) supl.2:3747-3754.
- Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R. & Blagburn BL. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. J. Eukaryot. Microbiol.,47 (1):91-95.
- Maldonado-Camargo, S., Atwill, E.R., Saltijeral-Oaxaca, J.A., Herrera-Alonso, L.C. 1998. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. Prev Vet Med, Amsterdam, 36(2):95-107.
- Meireles, M.V. 2010. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. Braz J Vet Parasitol. 19(4):197-204,
- 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.
- Moura, H., Oliveira, L.M. 1985. *Cryptosporidium*: parasito de imunocomprometidos. Rev Bras Pat Clin. 21(6): 198-201.
- Ongerth J.F. & Stibbs H. H. 1989. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in dairy calves in Western Washington. Am J Vet Rés 50(7):1069-1070.
- Panciera R.J., Thomassen R.W. & Garner F.M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. Vet. Pathol. 8:479-484.
- Quadros, R. M. 2002. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. (Tyzzer,1907) detectado pelo método de imunofluorescência através da técnica de coloração de auramina em propriedades rurais no município de Lages (SC), Brasil. Porto Alegre-RS. 66 f. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em < <http://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/download/5613/3795>> Acesso em 15/12/2016

Ritchie, L.S. 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bull U S Army Med Dep 8(4):326.

Ryan, U., Fayer, R. & Xiao, L. 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. Parasitol. 141(13):1667- 1685.

Santín M., Trout J.M. & Fayer R. 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Vet. Parasitol. 155(1/2):15-23.

Silva Júnior, F. A., Carvalho, A.H.O., Rocha, C. M.B.M., Guimarães, A. M. 2011. 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. Pesq. Vet. Bras. 31(8): 690-696.

Souza J.C.P. & Lopes C.W.G. 1995, Criptosporidiose em bezerros de rebanhos da bacia leiteira Sul-Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,4(1):33-36.

Tzipori S. & Ward H. 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbiol. Infect., 4 (10):1047-1058.

Venturini L., Bacigalupe D., Basso W., Ungaza J.M., Venturini, M. C. & Moré, G. 2006. *Cryptosporidium parvum* en animales domésticos y en monos de un zoológico. Parasitologia Latinoamericana, 61 (1-2):90-93

Xiao L., Fayer R., Ryan U. & Upton S. J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev. 17(1):72-97.

Xiao, L. & Fayer, R. 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int Jour Parasitol. 38(11):1239-1255.

Young, K. H., Bullock, S. L., Melvin, D. M. & Spruill, C. L. 1979. Ethyl Acetat as a substitute for Diethyl e Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Tecnique. J. Clin. Microbiol., 10(6): 852–853.

Watanabe, Y.; Yang, C.H.; Ooi, H.K. 2005. *Cryptosporidium* infection in livestock and first identification of *Cryptosporidium parvum* genotype in cattle feces in Taiwan, Parasitology Research, 7(3): 238-241.

6. Conclusões Gerais

O método de Auramina, é uma técnica de escolha para estudos epidemiológicos e investigação de surtos de diarreia, em situações em que há necessidade de processar grande número de amostras, por ser rápido e eficaz.

O método de coloração pelo Kinyoun, Ziehl-Neelsen e Safranina demonstraram ser um bom método para ser utilizado na rotina de diagnóstico para criptosporidiose, pois apresenta boa sensibilidade e baixo custo, apesar de suas limitações quanto ao tempo de execução da microscopia quando realizado em grande escala.

Alerta-se para a presença de *Cryptosporidium* spp. em bovinos na região sul do RS, por ser considerada uma zoonose e doença re-emergente, deve-se ter conhecimento e, ainda, diminuir o risco para a saúde pública.

Referências

- ABRAHAMSEN, M.S, TEMPLETON T.J., ENOMOTO S., ABRAHANTE J.E., ZHU G. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v.304, n.5669, p.441- 445, 2004.
- ABREU, V.J.S., CARDOSO, A. L., PENA, H. F. J., GENNARI, S. M., SINHORINI, I. DAMY, S. B. Avaliação da eficácia do colostro bovino hiper imune na infecção experimental de roedores com *C. parvum*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.40, n.3, p. 191-198, 2003.
- AL-BRAIKEN F.A., AMIN A., BEECHING N.J., HOMMEL M., HART C.A. Detection of *Cryptosporidium* amongst diarrhoeic and asymptomatic children in Jeddah, Saudi Arabia. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.97, n. 5, p.505–510, 2003.
- AL MAWLY, J.A., GRINBERG, D., PRATTLE, J., MOFFAT, J., MARSHALL, J., FRENCH, N. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. **Veterinary Journal** ,v. 203, n. 2,p.155–160, 2015.
- ALMEIDA, A.J., OLIVEIRA, F.C.R., TEIXEIRA, C.S. Risco relativo da infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* em bezerros bovinos no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.17, n.1, p.243-248,2008.
- ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 8, p. 1007-1021, 2002.
- AMARANTE, H. M. B. **Ocorrência do *Cryptosporidium* spp. em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes em Curitiba. 122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna)** - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.
- ANDERSON, B.C. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. **American Journal of Public Health**, v. 75, n.12, p. 133-1434, 1985.
- ARROWOOD, M.J. 1997. Diagnosis. In: *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*, Fayer R (ed), CRC Press, New York.
- ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 229-238, 2004.
- BARRINGTON, G. M., GAY, J. M., EVERMANN, J.F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 18, n. 1, p. 7–34, 2002.
- BAXBY D, HART CA, BLUNDELL N. Shedding of oocysts by immunocompetent individuals with cryptosporidiosis. **Journal of Hygiene** , v.95, n.3, p.703–709, 1985.

BAXBY, D., BLUNDELL, N. Sensitive, rapid, simples methods for detectiong *Cryptosporidium* in feces. **Lancet**. v.2, n,1, p. 1149, 1983.

BAXBY, D., BLUNDELL, N., HART, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **The Journal of Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 317–23, 1984.

BLANCHARD P.C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.28, n.1, p.443-464, 2012

BOLFASSA-OUZROUT, S., CHERNETTE, R., MEISSONIER, E. La Cryptosporidiose - une maladie animale et humaine cosmopolita. **International del Epizooties**. v.5, n. 1, p.1- 97,1986.

BROGLIA, A.; RECKINGER, S.; CACCIÓ, S.M.; NÖCKLER, K. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 154, n. 1-2, p. 8-13, 2008.

BROOK, E.; HART, C.A.; FRENCH, N.; CHRISTLEY, R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 1-2, p. 46-52, 2008.

CARDOSO J.M.S., SILVEIRA F.L., ARAÚJO A.J.U.S., CARVALHO J.C.C. & KANAMURA H.Y. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.17, n.1, p.239-242, 2008.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; GONZÁLEZ-WARLETA, A.A.M.; COSTA, J.M.; RUMBO-LORENZO, C.; MEZO, M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants, **Parasitology Research**, v. 101, n.5, p.1443-1448, 2007.

CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.138-146, 2010.

CHERMETTE, R., BOUFASSA-OUZROUT, S. **Criptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man**. 2. ed. Paris : OIE, 1988. 122p.

CUNHA, M. J. R da; ARANTES, V. M.; SILVA, M. B. de O.; CURY, M.C. Comparação da eficácia do Ziehl-Neelsen e da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para o diagnóstico do *Cryptosporidium* spp. em bovinos e suínos provenientes da região de Uberlândia. 2002

DAS, G.; CHANGKIJA, B.; SARKAR, S.; DAS, P. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* isolates in bovine population in Kolkata and characterization of new bovine genotypes. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 246-250, 2011.

DECARLI, G.A. **Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas –Métodos e Técnicas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 313p. 1994.

DUBEY, J.P., SPEER, C.A., FAYER, R. Cryptosporidiosis of man and animals. Boston. **International Journal for Parasitology**, v.25, n. 2, p. 139-195, 1990.

DIAZ-LEE, A, MOLINA, R, DOUGNAC, C., MERCADOB, R.; RETAMALA, P., FREDESA, P. Sensibilidad analítica de técnicas de tinción tradicionales y una técnica molecular para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. aislados de bovinos en muestras de agua: estudio preliminar. **Archive medicine veterinary**, v.47, n1, p.91-96, 2015.

DILLINGHAMAA, R.A., LIMAB, A.A., GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v. 4, n.1, p. 1059-1066, 2002.

ENEMARK, H. L., AHRENS, P., BILLE-HANSEN, V., HEEGAARD, P. M. H., VIGRE, H., THAMSBORG, S. M., LIND, P. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the “porcine” genotype. **Parasitology**, v. 126, n. 5, p. 407-416, 2003.

EDERLI B.B., CARVALHO C.B., SALES L.G. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** , v.13, n.8, p.45-48, 2004.

FALL, A., THOMPSON, R.C.A., HOBBS, R.P., MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 399-402, 2003.

FAUBERT ,G.M., LITVINSKY, Y. Natural transmission of *Cryptosporidium* spp. between dams and calves on dairy farm. **Journal of Parasitology**, v.86, n.1, p.495-500, 2000.

FAYER R., SPEER C.A., DUBEY J.P. 1997. **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. **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. Boca Raton : CRC, 1997. 251p.

FAYER, R., TROUT, J.M., AND JENKINS, M.C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **Journal of Parasitology**. v.84, n.6, p.1165-1169,1998.

FAYER, R., TROUT, J.M., GRACZYK, T.K., LEWIS, E.J. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in postweaned and adult cattle on three Maryland farms. **Veterinary Parasitology**, v.93, n.2, p. 103-112, 2000.

FAYER R, MORGAN U, UPTON SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal of Parasitology**. v.30, n.12-13,p.1305-1322, 2000.

FAYER, R., SANTIN, M., XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp (Apicomplexa: Cryptosporididae) from cattle (*Bos taurus*). **Journal for Parasitology**, v. 91, n. 3, p.624-629, 2005.

FAYER, R., SANTIN, 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, n.2, p.105–112, 2006.

FAYER, R., SANTIN, M. AND TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplex: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology** v.156, n.3-4, p. 191–190, 2008.

FEITOSA, F. L., 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**, v. 34, n.1, p. 189- 193, 2004.

FENG, Y., ORTEGA, Y., HE, G., DAS, P., XU, M., ZHANG, X., FAYER, R., GATEI, W., CAMA, V., XIAO, L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. **Veterinary Parasitology**. v. 144, n.1-2, p.1–9, 2007

FUJINO, T., MATSUI, T., KOBAYASHI, F., HARUKI, K., YOSHINO, Y., KAJIMA, J., TSUJI, M. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, n.1 p.199-200, 2002.

GARCIA, L.S., BRUCKNER, D.A., BREWERT, T.C., SMINITZU, R.Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **Journal Clinical of Microbiology**, v.18, n.1, p.185-190, 1983

GARCIA, A.M., LIMA, A.D. Frequência do *Cryptosporidium* em bezerros lactentes de rebanho leiteiros de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, n.2, p.193-198, 1994.

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 of Journal Parasitology**. v. 29, n.1,p.1269-1287, 1999.

GRACZYK, T. K.; MAJEWSKA, A. C.; SCHWAB, K. J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 2, p. 55-59, 2008.

HENDERSON, H.J., SPAULDING, E.H. & GAULT, E.S. Demonstration of globi and leprosy bacilli by fluorescence microscopy. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.50, n.1, p.91-92, 1942.

HUNTER, P.R., HUGHES, S., WOODHOUSE, S., SYED, Q., VERLANDER, N.Q., CHALMERS, R.M., MORGAN, K., NICHOLS, G., BEECHING, N., OSBORN, K. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. **Emerging Infectious Diseases**. v.10, n.7, p. 1241–1249, 2004.

IGNATIUS, R., EISENBLÄTTER, M., REGNATH, T., MANSMANN, U., FUTH, U., HAHN, H., WAGNER, J. Efficacy of different methods for detection of low

Cryptosporidium parvum oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimens- Eur. **Journal Clinical Microbiology Infections Diseases**, v.16, n.10, p.732-6, 1997.

IRWIN P.J. Companion Animal Parasitology: A clinical perspective. **International Journal for Parasitology**, v.32, n.5, p.581-593, 2002.

ISAACS, D, HUNT, G.H, PHILLIPS, A.D, PRICE, E.H, RAAFAT, F, WALKER-SMITH, J.A. Cryptosporidiosis in immunocompetent children. **Journal Clinical Pathology**, v.38, n.1, p. 76-81,1985.

JACOBSEN,G. *et al.* *Cryptosporidium* sp em intestinos, bursa de Fabricius e traquéia de frangos (*Gallusgallus* sp). **Ciência Rural, Santa Maria**,v.36, n.2, p 682-684,2006.

KANJO, Y., KIMATA, I., MIYANAGA, S., OKADA, H., BANNO, C., MATSUMOTO, M., SHIMADA, Y. Inactivation of *Cryptosporidium* spp oocysts with ozone and ultravioleta irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. **Water Science and Technology**, v.41, n.7, p.119-125,2000.

KHAN, S.M.; DEBNATH, C.; PRAMANIK, A.K.; XIAO, L.; NOZAKI, T.; GANGULY, S. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.171, n. 1-2, p. 41-47, 2010.

KHEL, K. S. C.; CICIRELLO, H.; HAVENS, P. L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 416-418, 1995.

KOINARI, M.; KARL, S.; NG-HUBLIN, J.; LYMBERY, A. J.; RYAN, U. M. Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in fish from Papua New Guinea. **Veterinary parasitology**, v. 198, n. 1, p. 1-9, 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, n.3-4, p. 202-209,2006.

LALLO, M. A. Criptosporidiose canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 1, n. 2, p.20 - 22,1996.

LAKE, I. R., NICHOLS, G., BENTHAM, G., HARRISON, F.C.D., HUNTER, P. R., KOVATS, R. S. Cryptosporidiosis decline after regulation, England and Wales, 1989–2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 623-625, 2007.

LEVINE, N.D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Protozoology**, v. 31, n.1 p. 94-98, 1984.

LIMA, R.C.A, AQUINO, M.C.C, INÁCIO, S.V, VIOL, M.A, ZUCATTO, A.S, SILVEIRA NETO, L., OLIVEIRA, B.C.M, VASCONCELOS, E.M, BRESCIANI, K.D, OLIVEIRA, G.P, COSTA, A.J. Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em bezerros (*Bos taurus* e *Bos indicus*) no município de Formiga, Minas Gerais – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.6, supl.2, p.3747-3754, 2013.

LINDSAY D.S., UPTON S.J., OWENS D.S., MORGAN U.M., MEAD J.R., BLAGBURN BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.47, n.1, p. 91-95, 2000.

LORENZO, M.J., BEN, B., MENDEZ F., VILLACORTA L., ARES-MAZAR, M.E. *Cryptosporidium* spp. oocyst antigens recognized by sera from infected asymptomatic adult cattle. **Veterinary Parasitology**, v.60, n.1, p.17-25, 1995.

MALDONADO-CAMARGO, S., ATWILL, E.R., SALTIJERAL-OAXACA, J.A., HERRERA-ALONSO, L.C. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. **Prev Vet Med.** v.36, n.2, p. 95-107, 1998.

MARTINEZ, I., BELDA NETO, F.M. Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, n.2, p.79-82, 2001.

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

MEINHARDT, P. L., CASEMORE, D. P, MILLER, K. B. Epidemiologic Aspects of Human Cryptosporidiosis and the Role of Waterborne Transmission. **Epidemiologic Reviews**, v. 18, n. 2, p. 118-136, 1996.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.19, n.4, p.197-204, 2010.

MEIRELES, M. V., DE 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, 2011.

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

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, 1998.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and Giardia-zoonoses: fact or fiction? **Infections Genetic Envolv.**, v. 3, n. 4, p. 233-244, 2003.

MORGAN, U.M., THOMPSON, R.C.A. PCR detection of *Cryptosporidium*, the way forward? **Parasitology Today**, v.14, n.6, p. 241-245, 1998.

MORGAN, U.M, CONSTANTINE, C.C, FORBES, D.A, THOMPSON, R.C.A. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using r DNA sequencing and direct PCR analysis. **Journal of Parasitology**; v.83, n. 5 , p. 825-30,1997.

MORGAN, U. M., XIAO, L., FAYER, R., LAL, A. A., THOMPSON, R. C. A. Variation in *Cryptosporidium*: Towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 11, p. 1733-1751, 1999

MORGAN, U. M., XIAO, L., MONIS, P., FALL, A., IRWIN, P.J, FAYER, R., DENHOLM, K.M., LIMOR, J., LAL, A., THOMPSON, R.C. *Cryptosporidium* spp. in Domestic Dogs: the "Dog" Genotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2220-2223, 2000.

MOURA, H., OLIVEIRA, L. M. *Cryptosporidium*: parasito de imunocomprometidos. **Revista Brasileira Patologia Clinica**, v.21, n.6, p.198-201, 1985.

MUNDIM, M.J.S.; SOUZA, L. M. de; MUNDIM, A.V.; MORAIS, R.N. Frequência de oocistos de *Cryptosporidium* sp em fezes de bezerros criados sob condições naturais no município de Uberlândia, analisadas por quatro métodos laboratoriais. **Veterinária Notícias**, v.1, n.1, p. 33-36, 1995.

MULLER, H.M., RANUCCI, L., POZIO, E., CRISANTI, A.A. Method for collecting large quantities of *Cryptosporidium* parasites. **Parasitology Today**. v.9, n. 7, p.261-6,1993.

MUNOZ P, F FREDES, A DIAZ-LEE, R MERCADO, L OZAKI. Deteccion de *Cryptosporidium* spp. em terneras de lecherias de la Region Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografia y ensayo molecular. **Archive Medicine Veterinary** ,v.43, n.2, p. 111-116, 2011.

NAKAMURA, A. A.; SIMOES, D. C.; ANTUNES, R. G.; DA SILVA, D. C.; MEIRELES, M. V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 47-51, 2009.

NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E.; HAGHIGHI, A.; TAGHIPOUR, N.; KESHAVARZ, A.; MOHEBI, S.R.; ZALI, M.R.; XIAO, L. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 179, n. 1-3 ,p. 250-252, 2011.

NETA, E. S. M., SAMPAIO, D. C., GALVÃO, G S., MUNHOZ, A. D. Oocistos de *Cryptosporidium* (Apicomplexa: cryptosporidiidae) em bovinos leiteiros de uma área endêmica na Microrregião de Ilhéus-Itabuna, Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.32, n.2, p.75-78, 2010.

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, n. 4, p. 592-598, 1976.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

ONGERTH, J.F., STIBBS, H. H. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in dairy calves in Western Washington. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.7, p.1069-1070,1989.

OVERGAAUW, P. A. M., VAN ZUTPHEN, L., HOEK, D., YAYA, F.O., ROELFSEMA, J., PINELLI, E., VAN KNAPEN, F., KORTBEEK, L.M. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1, p. 115–122, 2009.

PANCIERA, R.J., THOMASSEN, R.W., GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v.8, n.1, p. 479-484,1971.

PARK, J. H., GUK, S. M., HAN, E. T., SHIN, E. H., KIM, J. L., CHAI, J. Y. Genotype analysis of *Cryptosporidium* prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. **Korean Journal of Parasitology**. v. 44, n.1, p. 27–33, 2006.

PEREIRA, J.T. **Métodos de desinfecção em água contendo *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) e sua detecção por técnica de biologia molecular**. 2007. 104f. Dissertação (Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PÉREZ-CORDÓN, G., ROSALES-LOMBARDO, M.J., SÁNCHEZ-MORENO, M. Procesamiento de muestras fecales en el estudio de *Cryptosporidium* sp. mediante PCR. **Revista Peruana de Biología**, v.12, n.1,p. 158-160, 2005.

PIENIAZEK, N.J., BORNAY-LLINARES, F.J., SLEMENDA, S.B., DA SILVA, A.J., MOURA, I.N.S, ARROWOOD, M.J., DITRICH, O., ADDISS, D.G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV- infected persons. **Emerging Infectious Diseases**., v.5, n, p. 444-449, 1999.

PITLIK, S.D., FAINSTEIN, V., GARZA, D., GUARDA, L., BOLIVAR, R., RIOS, A., HOPFER, R.L., MANSELL, P.A. Human cryptosporidiosis: spectrum of disease. **Archives of Internal Medicine**. v.143, n.12, p.2269-75, 1983.

PULESTON, R. L.; MALLAGHAN, C. M.; MODHA, D. E.; HUNTER, P. R.; NGUYENVAN- TAM, J. S.; REGAN, C. M.; NICHOLS, G. L.; CHALMERS, R. M. The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium cuniculus* (formerly rabbit genotype), following a water quality incident. **Journal of water and health**, v. 12, n. 1, p. 41-50, 2014.

QUADROS, R. M. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. (Tyzzer,1907) detectado pelo método de imunofluorescência através da técnica de coloração de auramina em propriedades rurais no município de Lages (SC), Brasil. Porto Alegre-RS**. 66 f. 2002. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

QUADROS, R. M. D.; MARQUES, S. M. T.; AMENDOEIRA, C. R. ; SOUZA, L. A. de; AMENDOEIRA, P. R.; COMPARIN, C. C. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl-Neelsen staining methods. **Parasitologia Latinoamericana**, v.61, n.3-4, p.117-120, 2006.

RALSTON, B. J. Prevalence and infection patter of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and ther dams. **Veterinary Parasitology**, v.114, n.2, p. 113-122, 2003.

REY, L. **Parasitologia**. 2ªed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.1991.

RIBEIRO M.G., LANGONI H., JEREZ J.A., LEITE D.S., FERREIRA F. & GENNARI S.M. Identification of enteropathogens from buffalo calves with and without diarrhoea in the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.2, p.34-39, 2000.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the United States Army Medical Department**. v.8, n.4, p.326, 1948.

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.

ROBERTSON, L. J.; CHALMERS, R. M. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? **Trends in parasitology**, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2013.

RODRIGUES, R. D.; GOMES, L. R.; SOUZA, R. R de; BARBOSA, F. C. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS COLORAÇÕES DE ZIEHLNEELSEN MODIFICADO E SAFRANINA MODIFICADA NA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. (EUCOCCIDIORIDA, CRYPTOSPORIDIIDAE) A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS DE 0 A 3 MESES. **Ciências Animais Brasileira**, v.17, n.1, p. 119-125, 2016.

RUSH, B.A., CHAPMAN, P.A., INESON, R.W. A probable waterborne outbrack of cryptosporidiosis in the Sheffield area. **Journal of Medicine Microbiology**. v.32, n.4, p.239-42,1990.

SANFORD, S.E., JOSEPHSON, G.K.A. Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. **Canadian Veterinary Journal**. v.23, n.12, p. 343-347,1982.

SANTIN, 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.1/2, p.15-23, 2008.

SCHNYDER, M., KOHLER, L., HEMPHILL, A., DEPLAZES, P. Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in

experimentally challenged neonatal calves. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n.1, p. 149-154, 2009.

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**. v.31, n 8., p. 690-696, 2011.

SILVERLAS, C., EMANUELSON, U., VERDIER, K., BJORKMAN, C. Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 90, n.3, p.242-253, 2009.

SOUZA, J.C.P, LOPES, C.W.G. Criptosporidiose em bezerros de rebanhos da bacia leiteira Sul-Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, n.1, p.33-36, 1995.

SMITH, H. V., NICHOLS, R. A., MALLON, M., MACLEOD, A., TAIT, A., REILLY, W. J., BROWNING, L. M., GRAY, D., REID, S. W., WASTLING, J. M. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. **Veterinary Record**. v. 156, n.22, p. 710–711, 2005.

SMITH, H. V., CACCIÒ, S. M., TAIT, A., MCLAUCHLIN, J., THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n.4, p. 161-167, 2006.

TAYLOR, M.A.; WEBSTER, K.A. Recent advances in the diagnosis in livestock of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Giardia* and other protozoa of veterinary importance. **Research and Veterinaria Science**, v.65, n.,p.183-193, 1998.

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

TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v.5, n.1, p.12–13,1907.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbiology Infections**., v.4, n.10, p.1047-1058, 2002.

VENTURINI, L., BACIGALUPE, D., BASSO, W., UNZAGA, J.M., VENTURINI, M.C., MORÉ, G. *Cryptosporidium parvum* em animais domésticos y em monos de um zoológico. **Parasitologia Latinoamericana**.,v. 61, n.1-2, p. 90-93, 2006.

XIAO L, HERD RP. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Veterinary Parasitology**, v.55, n.3, p.257-62, 1994.

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

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, 2004.

XIAO, L., MORGAN, U.M., FAYER, R., THOMPSON, R.C.A, LAL, A.A. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. **Parasitology Today**. v.15, n.1,p.287–292, 2000.

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

YODER, J. S.; WALLACE, R. M.; COLLIER, S. A.; BEACH, M. J.; HLAVSA, M. C.; CENTERS FOR DISEASE, C.; PREVENTION. Cryptosporidiosis surveillance United States, 2009–2010. **The Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries**, v. 61, n. 5, p. 1-12, 2012.

YOUNG, K. H., BULLOCK, S. L., MELVIN, D. M., SPRUILL, C. L. Ethyl Acetat as a substitute for Diethyl e Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Tecnique. **Journal Clinical Microbiology.**, v.10, n.1,p. 852-853,1979.

WATANABE, Y.; YANG, C.H.; OOI, H.K. *Cryptosporidium* infection in livestock and first identification of *Cryptosporidium parvum* genotype in cattle feces in Taiwan, **Parasitology Research**, v. 7, n.3, p. 238-241, 2005.

Anexos

Anexo A – Normas para submissão: Revista Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

Instruções aos Autores

Brazilian Journal of Veterinary Parasitology
Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Apresentação

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e Rickettsias bem como assuntos correlatos. A revista tem periodicidade trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.

Política Editorial

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral.

O(s) autor(es) deverá(ão) anexar uma carta, previamente assinada, responsabilizando-se pela originalidade do artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos à publicação em outros periódicos. Trabalhos com mais de uma autoria deverão seguir com uma declaração de concórdia de todos os autores, referente à publicação. Trabalhos com número excessivo de autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita. Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver agradecimento ao pesquisador que forneceu auxílio técnico, correção ou sugestão na escrita, ou ao chefe de departamento que proporcionou infraestrutura para elaboração do trabalho. O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Nesse processo, o editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 3 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes. A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária atribui a seus artigos as categorias de: Artigos Completos, Notas de Pesquisa e Artigos de Revisão, sendo este último escrito por especialistas e condicionado a solicitação por convite do editor-chefe. Revisões não solicitadas não serão aceitas, mas o tópico da revisão pode ser sugerido, previamente, ao editor-chefe ou editores científicos assistentes.

Submissão de trabalhos:

O artigo a ser submetido deve passar por revisão do inglês, pelos revisores credenciados pela RBPV (http://cbpv.org.br/rbpv/revisoes_traducoes.php). Junto ao trabalho submetido anexar o certificado de revisão de inglês. Os pesquisadores deverão assumir os custos da revisão.

Taxa de publicação:

Após o aceite do artigo, será cobrada as seguintes taxas de publicação:

R\$ 250,00 (associados do CBPV em dia com as anuidades);
R\$ 500,00 (não-associados do CBPV).

Dados bancários para depósito:

Nome: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária/ Revista Banco do Brasil (001)
Agência: 0269-0
Conta Corrente: 28848-9

Para autores estrangeiros:

SWIFT BRASBRJRP0
IBAN 00102690000288489

Endereço: Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zona Rural. CEP: 14884-900. Jaboticabal – SP, Brasil.

Processo de avaliação pelos pares

O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 3 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes.

O relator deverá preencher o formulário de avaliação da RBPV, disponível no sistema on-line de submissão (<http://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>). Tendo recebido a avaliação de pelo menos 2 dos revisores selecionados, o(s) autor(es) receberá (ão) os formulários de avaliação e possíveis correções feitas diretamente no texto. O avaliador poderá corrigir novamente o artigo, se necessário.

O artigo a ser submetido deve passar por revisão do inglês, pelos revisores credenciados pela RBPV (http://cbpv.org.br/rbpv/revisoes_traducoes.php). Junto ao trabalho submetido anexar o certificado de revisão de inglês. Os pesquisadores deverão assumir os custos da revisão. Lembramos aos autores, que a RBPV não repassa aos mesmos, os custos de publicação por página dos trabalhos. Não seguindo as exigências do processo de submissão, o trabalho não entrará no processo de avaliação.

Após diagramação e editoração, os editores científicos assistentes e a editora-chefe da revista, fazem as correções finais.

Transferência de direitos autorais:

Ao ser submetido, o artigo deve vir acompanhado de um ofício, assinado por todos os autores, concordando com a submissão e, caso aprovado, a publicação do artigo apenas na RBPV.

Ética

Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e Bem-Estar Animal.

Apresentação dos Manuscritos

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os trabalhos deverão ser apresentados em fonte "Times New Roman", tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre

linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Para a categoria Artigo Completo, o trabalho não deverá exceder 15 páginas, quando da diagramação final. Para a categoria Notas de Pesquisa, o trabalho não deverá exceder 5 páginas, quando da diagramação final. As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. Ao submeter o artigo, anexar o comprovante de depósito, via endereço eletrônico: <http://www.scielo.br/rbpv>. Os trabalhos aceitos deverão ser revisados por um dos revisores de língua inglesa credenciados pela RBPV, de escolha e sob responsabilidade dos autores. Os Artigos Completos devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: **Título Original, Título Traduzido, Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords), Resumo (Palavras-chave), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinação destes três últimos), **Agradecimentos** (facultativo) e **Referências Bibliográficas**. As Notas de Pesquisa obedecem à sequência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido. Para essa categoria, o artigo submetido deve possuir alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de importância evidente.

Características dos elementos de um trabalho científico

Título Original

O título "cheio" e o subtítulo (se houver) não devem exceder 15 palavras. Não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com: Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de citação em nomes científicos.

Autor(es)/Filiação

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os autores (sem abreviação). A Filiação Institucional deve informar os nomes próprios de todas as instituições e não suas traduções: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do autor para correspondência: Endereço completo, telefone e e-mail atualizado, nessa ordem.

Referências bibliográficas

As referências bibliográficas só serão admitidas desde que sejam de fácil consulta aos leitores. Não serão aceitas referências de trabalhos publicados em anais de congressos e as teses devem estar disponíveis para consulta em sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto devem ser cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e datas, exatamente como aparecem nas referências.

"Abstract" e Resumo

Devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O abstract redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos seguidos por keywords e palavras-chave, respectivamente.

Keywords e Palavras-chave

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis).

Introdução

Explicação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

Resultados

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo; sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações autoexplicativas.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente aos resultados e conclusão. Enfatizar a importância de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final; e devem ser enviadas em formato editável (desejável excel). A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados.

Figuras

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema, devem ser enviadas em formato .tif, .gif ou .jpg, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

Conclusões

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Nesse caso, esse item não será necessário.

Agradecimentos

Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências bibliográficas

A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética e, posteriormente, ordenadas em ordem cronológica, se necessário. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras "a", "b", "c", etc, inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>.

Livros

Levine JD. *Veterinary protozoology*. Ames: ISU Press; 1985.

Capítulo de livro

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

Artigo de periódico

Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(1): 13-16.

Tese e Dissertação

Araújo MM. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de Patos, Paraíba - Brasil* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Documento eletrônico

Centers for Disease Control and Prevention. *Epi Info* [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Obs. Nas referências, apresentar os nomes dos seis primeiros autores; para referências com mais de seis autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.

Citações

As citações devem seguir o sistema autor-data:

Um autor: nome do autor e ano de publicação

Levine (1985) ou (LEVINE, 1985)

Dois autores: os nomes dos autores e ano da publicação

Paim e Souza (2011) ou (PAIM & SOUZA, 2011)

Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de "et al." e o ano de publicação

Araújo et al. (2002) ou (ARAÚJO et al., 2002)

Prova Gráfica

O trabalho diagramado em formato pdf., será enviado por e-mail ao autor correspondente. Alterações no artigo, quando aceitas para publicação, devem ser realizadas nesse estágio, com permissão do editor-chefe. Portanto, o trabalho deve ser cuidadosamente corrigido antes de responder ao editor, pois inclusões de correções subsequentes (indicação de novo autor, mudança de parágrafos inteiros ou tabelas) não podem ser garantidas.

Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná¹

Arnildo Korb^{2*}, Eleusis R. de Nazareno³, Libera D. Costa², Silva Keite N. da Silva⁴, Paulo R. Dalsenter⁵,
Felipe F.B. Tuon⁴ e Maria C. Pomba⁶

ABSTRACT. Korb A., Nazareno E.R., Costa L.D., Silva K.N.S., Dalsenter P.R., Tuon F.F.B. & Pomba M.C. 2000. [Molecular typing and antimicrobial resistance in isolates of *Escherichia coli* from poultry and farmers in the Metropolitan Region of Curitiba, Paraná.] Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Enfermagem, Universidade do Estado de Santa Catarina, Rua Sete de Setembro 91D, Centro, Chapecó, SC 89801-140, Brazil. E-mail: arnildo.korb@udesc.br

This study examined the profile of antimicrobial resistance among isolates of *Escherichia coli* from intensive poultry farming and free-range systems, and from their farmers. For technique of Gel Electrophoresis Pulsed Field (PFGE) examined the similarity between isolates from poultry intensive farming and their farmers. From 60 samples of poultry feces from intensive farming systems, 60 of free-range extensive systems and 20 of farmers of each segment, the *E. coli* was isolated and submitted to the test of susceptibility to 12 antimicrobials. 24 isolates of *E. coli* of poultry from intensive farming systems and eight *E. coli* isolates from farmers poultry intensive farming were analyzed via technique of PFGE. In intensive farming systems poultry, 100% resistance to ampicillin was verified, 43% to cefotaxime, 48% to ceftriaxone, 62% to nalidixic acid, 23% to enrofloxacin, 23% to ciprofloxacin, 83% to tetracycline and 45% to trimetoprim-sulfametoxazol. In the strains of free-range extensive systems, resistance was 20%, 0%, 0%, 5%, 2%, 4%, 33% and 8%, respectively. Resistance to fosfomicin and to nitrofurantoin was found in isolates of poultry from free-range extensive systems. In farmers from intensive farming systems, the resistance to ampicillin was 60%, 25% to ciprofloxacin and 45% to tetracycline, whereas in farmers from free-range extensive systems, it was 20%, 5% and 30%, respectively. In the isolates of *E. coli* poultry from free-range extensive systems, 46.6% (28/60) presented themselves as susceptible to all tested antimicrobials in comparison to intensive farming systems in which 81.6% (49/60) were multiresistant. Seven clusters of isolates from poultry showed similarity above 80%. Out of these, two clusters of isolates of poultry from different aviaries presented superior clonality to 95%. Furthermore three clusters isolates of poultry and farmers showed similarity greater than 80%, but only one cluster isolate of attendant and poultry were from the same aviary.

INDEX TERMS: Intensive livestock farming and free-range poultry, *Escherichia coli*, antimicrobial, molecular typing.

¹ Recebido em

Acelto para publicação em

² Departamento de Enfermagem, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Rua Sete de Setembro 91D, Centro, Chapecó, SC 89801-140, Brasil. Pesquisa de doutorado com apoio CAPES. *Autor para correspondência: arnildo.korb@udesc.br.

³ Departamento de Saúde Comunitária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Padre Camargo 280, 3^a andar, Curitiba, PR 80060-240, Brasil.

⁴ Hospital de Clínicas, UFPR, Rua Gen. Carneiro 181, Alto da Glória, Curitiba, PR 80060-900.

⁵ Departamento de Farmacologia, UFPR, Rua Cel. Francisco H. dos Santos 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Cx. Postal 19031, Curitiba, PR 81531-980.

⁶ Hospital Veterinário, Universidade de Lisboa (ULisboa), Avenida da Universidade Técnica, Polo Universitário da Ajuda, Lisboa, 1300-477, Portugal.

RESUMO. Este estudo verificou o perfil de resistência aos antimicrobianos entre isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte de criação intensiva e de subsistência e dos respectivos tratadores e a similaridade genotípica entre isolados de *E.coli* de frangos de corte de criação intensiva e isolados de *E. coli* de tratadores de frangos de criação intensiva pela técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE). 60 amostras de fezes de frangos de criação intensiva, 60 de frangos de corte de criação de subsistência (caipira) e 20 amostras dos tratadores de frangos de criação intensiva e 20 de tratadores de frangos de criação de subsistência. *E. coli* foram isoladas, identificadas e submetidas ao teste de suscetibilidade a 12 antimicrobianos. Pela PFGE foram analisados 24 isolados de *E. coli* de frangos de corte de criação intensiva e oito de tratadores. Em isolados *E. coli* de frangos de criação intensiva a resistência para a ampicilina foi de 100%, cefotaxima 43%, ceftriaxona 48%, ácido nalidixico

62%, enrofloxacin 23%, ciprofloxacin 23%, tetracycline 83% e 45% para trimetoprim-sulfamethoxazole. Nos isolados de frangos de criação de subsistência foi de 20%, 0%, 0%, 5%, 2%, 4%, 33% e 8%, respectivamente. Resistência à fosfomicina e à nitrofurantoína foi encontrada em isolados de frangos de criação de subsistência. Em isolados de *E. coli* de tratadores de frangos de corte de criação intensiva a resistência para ampicilina foi de 60%, para ciprofloxacin 25% e para tetracycline 45%, enquanto nos tratadores de subsistência foram de 20%, 5% e 30%, respectivamente. Isolados de *E. coli* de frangos em criação de subsistência apresentaram 46,6%(28/60) de suscetibilidade a todos os antimicrobianos testados enquanto que na criação intensiva 81%(49/60) foram multirresistentes. Sete *clusters* de isolados de *E. coli* de frangos de diferentes aviários apresentaram similaridade acima de 80%, e dois destes foram superiores a 95%. Três *clusters* de isolados de frangos e de tratadores apresentaram similaridade superior a 80%. Somente um destes *clusters* foi de isolado de tratador e de frango do mesmo aviário.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Frangos de corte de criação intensiva e de subsistência, *Escherichia coli*, antimicrobianos, tipagem molecular.

INTRODUÇÃO

Na avicultura de criação intensiva *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) causa infecções respiratórias, entéricas, pericardite, perihepatite, septicemia e a dermatite necrótica (Celulite) (Dziva & Stevens 2008). A condenação de carcaças nos abatedouros por conta da celulite provoca elevados prejuízos aos produtores, assim como gastos expressivos na utilização de antimicrobianos para controlá-la (Blanco et al. 1997). Existem evidências de que as resistências aos antimicrobianos em bactérias da microbiota de frangos de corte de criação intensiva possam ser transferidas para o ser humano por ingestão de carnes cruas ou material fecal-oral (Johnson et al 2007).

O "Strategic and Technical Advisory Group" (STAG- AMR) da Organização Mundial da Saúde (WHO 2013) na sua última reunião de setembro de 2013, recomenda o uso prudente dos antimicrobianos na saúde humana e na produção animal. Esta recomendação procede em virtude de registros de mortes humanas por infecções causadas por bactérias multirresistentes e da dificuldade de introdução de novos antibióticos no mercado. A WHO propõe a preservação de categorias de antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana, principalmente os de utilização na produção animal como as cefalosporinas de terceira e quarta geração e as fluorquinolonas (AGISAR 2012). O uso frequente de antimicrobianos na avicultura seleciona resistências em bactérias comensais do sistema digestório, em particular em *E. coli*, as quais podem por contato direto serem transferidas para tratadores por colonização do trato digestório (Van den Bogaard et al. 2001, Ewers et al. 2012, Knöbl et al. 2012, Manges & Johnson 2012). Mundialmente, esta bactéria prevalece em infecções de animais e seres humanos, como no trato urinário, resultando em altos custos aos sistemas de saúde (Gould 2010, Dheilly 2011). No tratamento de infecções urinárias humanas a ciprofloxacin, metabólito da enrofloxacin (Shah 1991) está entre as mais prescritas (Sheerin 2011).

Este estudo objetivou verificar o perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados de *E. coli* de frangos de corte de criação intensiva, frangos de criação de subsistência e dos respectivos tratadores. Além de verificar a similaridade genotípica entre isolados de *E. coli* de frangos de corte de criação intensiva com os isolados de *E. coli* de tratadores de frangos de criação intensiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. A colheita de fezes de frangos ocorreu em 20 aviários de criação intensiva e em 20 propriedades de criação de subsistência, localizadas na região metropolitana de Curitiba. A colheita das amostras foi realizada em frangos de corte com idade mínima de 25 dias. De julho a setembro de 2012, de cada aviário foram coletadas três amostras de fezes frescas por aviário, totalizando 120 amostras. 60 de criação intensiva (CI) e 60 de criação de subsistência (CS).

Na criação intensiva, em município pertencente à região metropolitana de Curitiba, foram colhidas amostras de fezes de tratadores (TI) do sexo masculino (n=16) e do sexo feminino (n=4). Todos os tratadores (20) da criação de subsistência (TS) foram do sexo feminino.

Isolamento e identificação de *E. coli*. No controle do teste de suscetibilidade foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 35218. As amostras foram semeadas em ágar em MacConkey ágar (BD Difco) e incubadas a 37°C, em aerobiose durante 18 a 24 horas. Uma colônia com características morfológicas de *E. coli* foi transferida de cada placa para meio ágar sangue (Oxoid) e incubada nas condições anteriores. A identificação da espécie foi realizada com os testes bioquímicos em Citrato de Simmons, TSI, SIM, VM e VP (Dufour-Zavala 2008). Os isolados de *E. coli* com características positivas foram identificados fenotipicamente como *E. coli*.

Teste de suscetibilidade. O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado pela técnica de disco-difusão (Bauer et al. 1966) usando o meio de Muller-Hinton (Oxoid) e os discos de antibióticos (Laborclin e BioRAD): ampicilina (10µg), cefepime (30µg), cefotaxima (30µg), ceftriaxona (30µg), ceftazidima (30µg), ácido nalidixico (10µg), enrofloxacin (5µg), ciprofloxacin (5µg), fosfomicina (200µg), tetracycline(30µg), sulfamethoxazol + Trimetoprim (23,75+1,25 µg), nitrofurantoína (300µg).

A inoculação ocorreu por suspensão bacteriana. As placas contendo ágar Muller-Hinton e semeadas com a suspensão bacteriana e com discos de antimicrobianos foram incubadas a 37°C durante 18 horas. A leitura e interpretação dos diâmetros dos halos foram efetuadas segundo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2008, CLSI 2011). Foram considerados isolados multirresistentes os que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (Magiorakos et al. 2011).

Cálculo estatístico (significância $p < 0,05$). Entre isolados de *E. coli* provenientes de frangos e de tratadores considerados como suscetíveis, resistentes para uma classe, resistentes para duas classes, multirresistentes, com resistência e análise estratificada para três categorias de resistências foi adotado o programa Epi Info 6.04.

Tipagem molecular. Vinte e quatro isolados de *E. coli* de frangos de criação intensiva e oito de tratadores de criação intensiva, escolhidos por sorteio, e pertencentes aos mesmos estabelecimentos produtivos foram subcultivadas em ágar sangue para a obtenção de colônias puras e submetidas a técnica de PFGE.

O preparo dos blocos foi realizado de acordo com Silva et al. (2011). O DNA bacteriano dos isolados de *E. coli* foi submetido à enzima de restrição SpeI (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, USA - 10U por amostra), por 12 a 18 horas a uma temperatura de 37°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) e os padrões de variação da corrente elétrica (*swiTIh time*) foram de 5 segundos (inicial) e final de 90 segundos. A eletroforese foi realizada por um período de 24 horas, em solução 0,5x TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA, 0,002 M) à temperatura de 13°C e utilizando uma corrente elétrica de 200 volts (6V/cm). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,08µg/mL) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e fotografados sob luz ultravioleta (Silva et al. 2011).

Os perfis migratórios obtidos após a fotografia do gel foram analisados visualmente seguindo os critérios de Tenover et al. (1995). Para efeito de representação foram utilizadas letras e números, uma letra maiúscula representa um clone; e para cada perfil relacionado a este clone, ou seja, um subtipo é utilizado à mesma letra maiúscula seguida de um número arábico.

A similaridade foi avaliada conforme o protocolo da Pulsenet. Os padrões de macrorestrição com XbaI foram analisados com o software BioNumerics (Applied Maths, A., USA) utilizando método UPGMA ("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean") e o coeficiente de Dice interpretados conforme Tenover et al. (1995). Na comparação da similaridade entre *clusters* aplicou-se 1,5% na tolerância de corte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resistência por classe antimicrobiana

Todos os isolados de frangos de criação intensiva foram resistentes à ampicilina, enquanto nos isolados de frangos de criação de subsistência o perfil foi de 20% (Quadro 1).

A resistência de *E. coli* às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração nos isolados de *E. coli* provenientes de frangos de corte de criação intensiva foi elevada enquanto todos os isolados de *E. coli* de frangos em criação de subsistência foram suscetíveis. A resistência às quinolonas nos isolados de criação intensiva foi de 62% para o ácido nalidíxico e de 23% para a enrofloxacin, enquanto nos isolados de subsistência foi de 5% e 2%, respectivamente. A resistência à tetraciclina e ao trimetoprim-sulfametoxazol foi superior nos isolados de criação intensiva (83% e 45%, respectivamente) do que nas de subsistência (33% e 8%, respectivamente). Os isolados de *E. coli* de frangos em criação de subsistência apresentaram resistência superior à fosfomicina e à nitrofurantoína, antimicrobianos utilizados frequentemente na terapêutica da infecção do trato urinário humano.

Em tratadores de frangos de criação intensiva, o percentual de resistência para a ampicilina foi superior à apresentada pelos isolados de *E. coli* dos tratadores de frangos de subsistência (60% de 20%) (Quadro 2).

A frequência de resistência à tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol foi semelhante nos isolados de tratadores de criação intensiva e nos de subsistência. A resistência às cefalosporinas de 3ª geração, quinolonas, fosfomicina e nitrofurantoína nos isolados dos tratadores foi baixa nos dois sistemas. Porém, a resistência de 25% para a ciprofloxacina nos tratadores de criação intensiva em relação aos 5% dos tratadores de subsistência merece ser considerada. Para o cefepime (cefalosporina de 4ª geração) não foram verificadas resistências nos isolados de *E. coli* dos tratadores.

Na análise da resistência por classe de antimicrobiano em *E. coli* de frangos de criação intensiva estas apresentaram 60 (100%) resistência para β-lactâmicos, 40 (66%) para quinolonas, 50 (83%) para tetraciclina, 27 (45%) para sulfonamidas. Os isolados de *E. coli* de tratadores de frangos de corte de criação intensiva apresentaram 12 (60%) para β-lactâmicos e oito (40%) para quinolonas. As resistências nos isolados de frangos de criação de subsistência foram maiores do que isolados de frangos de criação de intensiva apenas para fosfomicina e nitrofuranos. Apenas em sulfonamidas que os isolados de tratadores de subsistência excederam aos isolados de tratadores de criação intensiva e de isolados de frangos de criação de subsistência (Fig.1).

Perfil de resistência e multirresistência

Elevado número de isolados de *E. coli* de frangos em criação de subsistência (28 de 60, 46,6%) apresentaram-se suscetíveis a todos os antimicrobianos testados em contraste com os isolados de criação intensiva que foram principalmente multirresistentes (49 de 60; 81,6%).

Os isolados de *E. coli* de tratadores de criação de subsistência e intensiva apresentaram perfil concordante de 8/20 (40%) e 7/20 (35%) para suscetibilidade a multirresistência a todos os antimicrobianos testados, respectivamente.

A análise estatística (significância $p < 0,05$) entre as amostras de *E. coli* de frangos e de tratadores para suscetível, resistente para uma classe, resistentes para duas classes, multirresistentes, com resistência e análise estratificada para três categorias de resistências apontou os resultados que constam no quadro 3.

Resistências simultâneas às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e às fluorquinolonas

Doze (19,35%) isolados de *E. coli* de frangos de criação intensiva apresentaram frequência de resistência simultânea às cefalosporinas de 3ª geração e às fluorquinolonas, enquanto em frangos de criação de subsistência e em tratadores não ocorreu esta co-resistência.

Este estudo demonstrou elevada resistência para a ampicilina (100%), cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, quinolonas, tetraciclina e ao sulfametoxazol-trimetoprim nos isolados de *E. coli* de frangos de criação intensiva comparativamente aos isolados de *E. coli* de frangos de criação de subsistência, o que pode indicar a pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos na produção intensiva avícola. No Brasil, não existem dados sobre as classes e volume de antimicrobianos consumidos na produção animal. No entanto, na Europa, em 2011, as vendas totalizaram 55.872 toneladas de antimicrobianos para animais de produção e corresponderam a 37% de tetraciclina, 23% de penicilinas, 11% de sulfonamidas e 7% de polimixinas (Esvac 2013).

Em relação aos estudos com isolados patogênicos de *E. coli* causadores de colisepticemia e celulite aviária, a resistência à ampicilina encontrada por Ozawa (2008) no Japão, Yang et al. (2004) na China, Zakeri e Kashefi (2012) no Irã foi de 77%, 79%, 58%, respectivamente. Para as cefalosporinas de 3ª geração, Abreu et al (2010) reportaram 65% de resistência para a ceftazidima em isolados de *E. coli* patogênica de codornas sob inspeção sanitária. Nos demais estudos, estes antimicrobianos não compuseram o padrão dos testes de suscetibilidade utilizado, talvez por se tratarem de antimicrobianos de prescrição humana.

Para a enrofloxacin, Zanatta (2004) em São Paulo, constatou 62% de resistência em colibacilose, enquanto Ozawa (2008), no Japão, encontrou 21% e Yuan et al. (2009) na China, 80%. As elevadas resistências à tetraciclina nos isolados de *E. coli* dos frangos de criação intensiva (83%) refletem os efeitos dos usos frequentes de antimicrobiano na criação intensiva. Resultados semelhantes de resistência à tetraciclina no Brasil foram verificados por Zanatta (2004) que (76%) e Aquino, em Londrina (63%). Zakeri e Kashefi (2012), no Irã, constataram 99% em colibacilose. A falta de informações sobre volume e princípios ativos de antimicrobianos mais consumidos no Brasil, tanto no setor da produção animal, quanto da saúde humana, dificulta uma leitura mais acurada do contexto da seleção de resistências bacterianas.

Quanto aos outros estudos para o sulfametaxazol+trimetoprim em isolados de *E. coli* de aves com quadro de colibacilose, as resistências constatadas por Alcântara (2007) foram de 90%, enquanto Ozawa (2008), no Japão, encontrou 21% e Yuan et al. (2009) na China, constataram 90%.

Neste estudo, as altas resistências para fosfomicina e nitrofurantoína em isolados de *E. coli* de frangos de criação de subsistência, antimicrobianos de utilização exclusivamente humana para tratamento das infecções do trato urinário, poderiam ter ocorrido pelo contato das aves com resíduos de antimicrobianos de prescrição humana descartados no lixo doméstico e ambiente aberto de acesso às aves (Reginato & Leal 2010). Esta prática de descarte é comum em comunidades do interior.

A resistência à ampicilina de 60% (12/20) em isolados de *E. coli* de tratadores de criação intensiva foi superior em relação aos tratadores de criação de subsistência, e em isolados de *E. coli* (44,1%) de pacientes ambulatoriais em Curitiba (Rocha et al. 2012). Estas resistências em tratadores podem ter ocorrido pelo contato direto com as aves ou na manipulação dos antimicrobianos.

Para as resistências à nitrofurantoína, em 5% (1/20) dos tratadores de criação intensiva e 10% em tratadores de criação de subsistência estiveram na média constatada entre pacientes ambulatoriais. Rocha, Tuon & Johnson (2012) em Curitiba diagnosticam 4%; Correia et al. (2007), em Portugal, constataram 1%; e Esparis et al. (2006), no Rio de Janeiro, 0% em pacientes ambulatoriais com infecções do trato urinário causadas por *E. coli*.

As resistências em 30% (6/20) para sulfametaxazol-trimetoprim em isolados de *E. coli* de tratadores de frangos de criação intensiva e 35% (7/20) para isolados de *E. coli* de tratadores de subsistência, aproximaram-se aos 42% de Esparis et al. (2006), no Rio de Janeiro e aos 34,2 % encontrados por Rocha, Tuon e Johnson (2012) em Curitiba. Todos os percentuais resultam de estudos com pacientes ambulatoriais.

Para ciprofloxacina as resistências de 25 % (5/20) em isolados de *E. coli* em tratadores de frangos de corte criação intensiva e 5% (1/20) em isolados de *E. coli* de tratadores de frangos de criação de subsistência refletem a existência de pressão seletiva para este antimicrobiano. Este fenômeno pode ocorrer por resistência cruzada. Em Curitiba, Rocha et al. (2012) encontraram 17,2% de resistência à ciprofloxacina e Levofloxacina. Braios (2009) constatou 14% de resistência à ciprofloxacina em cidade do interior paulista. Os resultados apontaram resistência superior nos isolados de *E. coli* de tratadores de frangos de corte de criação intensiva em relação aos demais estudos sobre resistências de *E. coli* em pacientes ambulatoriais.

Não foram encontrados resultados para a enrofloxacin nos demais estudos em humanos. Chen et al. (2011) na China pesquisaram os efeitos destes antimicrobianos na microbiota fecal humana e concluíram que ela afeta a qualidade, a diversidade de bactérias e aumenta a resistência de toda a microbiota intestinal à ciprofloxacina.

Porém, a discreta diferença entre os 15% (3/20) de resistência para enrofloxacin verificadas em isolados de *E. coli* em tratadores de frangos de corte criação intensiva, em relação aos 10% (2/20) em isolados de *E. coli* de tratadores de frangos de criação de subsistência, refletem a existência de pressão seletiva em ambos, cuja origem pode ter ocorrido por resistência cruzada em função do uso de medicamentos na saúde humana. É importante destacar que todos os tratadores de subsistência são do sexo feminino e o uso de antimicrobianos no tratamento de infecções urinárias pode ter intensificado a seleção destas resistências.

Perfil de similaridade genotípica dos isolados (PFGE)

Dois isolados foram classificados como não tipáveis por PFGE. Sete clusters ("A", "B", "C", "E", "L", "N", "O") de isolados de *E. coli* de frangos apresentaram similaridade genotípica acima de 80%. Os clusters "A" e "C" apresentaram similaridade superior a 95% (Fig.2).

Na análise entre isolados de frangos e de tratadores, três clusters apresentaram similaridade superior a 80%. Dois destes clusters foram de isolados bacterianos de frangos e de tratadores colhidos no mesmo estabelecimento produtivo, a citar, o isolado CI 8.1 do cluster "C" com o isolado TI 8 do cluster "D" e os isolados do cluster "R". No cluster "R" os isolados apresentaram similaridade superior a 90%. Porém os isolados CI 4.2 do cluster "C" e a amostra TI 8 do cluster "D", apresentaram similaridade de 85%, não foram colhidas no mesmo aviário, assim como os isolados do cluster "P" que apresentaram similaridade de 88%.

Foi encontrada similaridade superior a 95% entre dois clusters de isolados de *E. coli* de frangos de dois aviários diferentes e localizados entre si a distâncias superiores a 2 km. No entanto, estes isolados apresentaram diferentes perfis de resistência e a diferentes classes de antimicrobianos.

Os resultados do PFGE apontam para o potencial de disseminação de bactérias no ambiente e por consequência das resistências. Esta forma de disseminação entre isolados de *E. coli* de frangos, e destes com isolados de tratadores, também foi verificada por Van Den Bogaard et al. (2001) em estudo na Holanda ao comparar isolados de *E. coli* de frangos e isolados de *E. coli* de tratadores. Para explicar o fenômeno, os autores argumentaram pela colonização do trato digestório dos tratadores por bactérias comensais de frangos em decorrência do contato direto com as aves.

O fato de não ter sido encontrada clonalidade entre isolados de *E. coli* de tratadores e isolados de *E. coli* de frangos de criação intensiva pode ter ocorrido devido ao número de colônias selecionadas, embora o número de isolados do estudo tivesse significância estatística. Porém, a existência de similaridade genotípica acima de 80% em três clusters entre estes isolados, e ter sido encontrada clonalidade entre isolados de frangos, não descarta a possibilidade de terem existido clones de *E. coli* entre isolados de *E. coli* de frangos de corte de criação intensiva e de isolados de *E. coli* de tratadores de criação intensiva na região de colheita das amostras.

CONCLUSÕES

A alta resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos em *E. coli* comensal de frangos de corte de criação intensiva e nos tratadores destas aves, em comparação com o perfil de resistência em isolados de *Escherichia coli* de frangos de criação de subsistência e dos isolados de *E. coli* de tratadores de frangos de subsistência, é um indicativo da existência de pressão seletiva na microbiota nas aves e nos tratadores em decorrência do uso de antimicrobianos.

É relevante a similaridade genotípica, acima de 80%, encontrada pela técnica de PFGE entre três isolados de *E. coli* de frangos de corte de criação intensiva e três isolados de *E. coli* de tratadores, a considerar que dois destes isolados de *E. coli* de frangos e dois de tratadores foram colhidos em diferentes aviários.

A distância entre os aviários, não superior a 2 km, pode ter contribuído nestes resultados.

A disseminação de bactérias, como *E. coli*, pode ocorrer por meio de animais domésticos e de vida livre, partículas de dejetos dos frangos transportados pelo vento, pelas vestimentas da equipe técnica da agroindústria durante visitação, pelos caminhões que transportam as rações e pelas equipes de trabalho das agroindústrias durante o carregamento dos frangos para o abate.

REFERÊNCIAS

- Abreu D.L.C., Franco R.M., Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Alves F.M.X. & Almeida J.F. 2010. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene *ISS* pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. *Pesq. Vet. Bras.* 30 (5):406-410.
- Alcântara A.C.M. 010. Realização de antibiograma e detecção de genes de resistência pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em cepas de *E. coli* isoladas de celulite aviária coletadas de abatedouros frigoríficos do Distrito Federal, Brasília. Tese de Doutorado. Disponível em <<http://bdm.bce.unb.br/handle/10483/1809>> Acesso em 18 abr. 2012.
- Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
- AGISAR 2012. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 3rd ed. Disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf> Acesso em 6 dez. 2013.

- Blanco J.E., Blanco M., Mora A. & Blanco J. 1997. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 35(8):2184-2185.
- Braios A., Turatti T.F., Meredija L.C.S., Campos T.R.S. & Denadai F.H.M. 2009. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos. *Bras. Patol. Med. Lab.* 45(6):449-456.
- Chen T., Yuan J., Feng X., Wei H. & Hua W. 2011. Effects of enrofloxacin on the human intestinal microbiota in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22(5):567-571.
- CLSI 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: approved standard. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 28(8):2-11.
- CLSI 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty: first information supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 31(1).
- Correia C., Costa E., Peres A., Alves M., Pombo G. & Estevinho L. 2007. Etiologia das infecções do trato urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. *Acta Med. Port.* 20:543-549.
- Dheilly A., Boudier A., Le Devendec L., Hellard G. & Kempf I. 2011. Clinical and microbial efficacy of antimicrobial treatments of experimental avian colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 149(3/4):422-429.
- Dufour-Zavala L. 2008. Laboratory Manual for the Isolation, Identification, and Characterization of Avian Pathogens. 5th ed. American Association of Avian Pathologists, Georgia, Atlanta.
- Dziva F. & Stevens S.M.P. 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37(4):355-366.
- Esparis C.M., Teixeira, L.M., Irino K., Gil P.F., Almeida M.M.T.B., Lopes G.S., Bravo V.L.R., Pacheco R.S. & Reguamangia A.H. 2006. Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na cidade do Rio de Janeiro. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 39(6):573-576.
- Esvac 2013. Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU/EEA countries in 2011. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/10/WC500152311.pdf> Acesso em 10 dez. 2013.
- Ewers C., Bethe A., Semmler T., Guenter S. & Wieler L.H. 2012. Extended-spectrum lactamase-producing and *AmpC*-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 18(7):646-655.
- Gould D. 2010. Causes, prevention and treatment of *Escherichia coli* infection. *Nursing Standard* 24(31):50-56.
- Johnson J.R., Sannes M.R., Croy C., Johnston B., Clabots C., Kuskowski M.A., Bender J., Smith K.E., Winokur P.L. & Belongia E.A. 2007. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerg. Infect. Dis.* 13(6):838-846.
- Knöbl T., Moreno A.M., Paixão R., Gomes T.A., Vieira M.A., Silva L.D., Blanco J.E. & Ferreira A.J. 2012. Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* clone harboring *sfa* gene in Brazil. *Scient. World J.* 2012:1-7.
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A. & Weber J.T. 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18(3):268-281.
- Manges A.R. & Johnson J.R. 2012. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin. Infect. Dis.* 55(5):712-719.
- Ozawa M., Harada K., Kojima A., Asai T. & Sameshima T. 2008. Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Avian Dis.* 52(3):391-398.
- Regitano J.B. & Leal R.M.P. 2010. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revta Bras. Ciênc. Solo* 34:601-616.
- Rocha J.L., Tuon F.F. & Johnson J.R. 2012. Sex, drugs, bugs, and age: rational selection of empirical therapy for outpatient urinary tract infection in an era of extensive Antimicrobial resistance. *Braz. J. Infect. Dis.* 16(2):115-121.
- Shah P.M. 1991. Ciprofloxacin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1(2/3):75-96.
- Sheerin N.S. 2011. Urinary tract infection. *Medicine* 39(7):384-389.
- Silva F.M., Carmo M.S., Silbert S. & Gales A.C. 2011. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. *Microb. Drug Resist.* 17(2):215-220.
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. & Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9):2233-2239.
- WHO 2013. Anti-microbial resistance. Disponível em <<http://www.who.int/trade/glossary/story004/en/>> Acesso em 13 abr. 2013.

- Van den Bogaard A. E., London N., Driessen C. & Stobberingh E.E. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J. Antimicrob. Chemotherapy 47(6):763-771.
- Yang H., Chen S., White D., Zhao S., McDermott P., Walker R. & Meng J. 2004. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia Coli* Isolates from Diseased Chickens and Swine in China. J. Clin. Microbiol. 42(8):3483-3489.
- Yuan L., Liu J.H., Hu G.Z, Pan Y.S, Liu Z.M, Mo J. & Wei Y.J. 2009. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China. J. Med. Microbiol. 58. (11):1449-1453.
- Zakeri A. & Kashefi P. 2012. Antimicrobial susceptibilities of avian *Escherichia coli* isolates in Tabriz, Iran. African J. Biotechnol. 11(19):4467-4470.
- Zanatta G.F., Kanashiro A.M.I., Castro A.G.M., Cardoso A.L.S.P., Tessari E.N.C. & Pulici S.C.P. 2004. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 71(3):283-286.

Legendas das Figuras

Fig.1. Percentagem de isolados resistentes para cada classe de antimicrobiano; CI = Criação intensiva, TI = Tratadores de criação intensiva, TS = Tratadores de criação de subsistência, CS = Criação de subsistência.

Fig.2. Dendograma do PFGE de isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte de criação intensiva e de tratadores de frangos de criação intensiva.

Anexo C – Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 20 de junho de 2016

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Comparação de técnicas para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em bovinos**", registrada com o nº23110.001818/2016-73, sob a responsabilidade de **Eliza Simone Viégas Sallis** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 06/06/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	21/06/2016 a 28/02/2017
Espécie/linhagem/raça	Bovina/Raças leiteiras
Nº de animais	385
Idade	0-1 ano
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária - UFPel

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 1818-2016**).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável: _____

Ciente em: ____/____/2016