

**DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCO DA CRIPTOSPORIDIOSE BOVINA NA
MICRORREGIÃO DE CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ,
E IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium parvum* PELA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR)**

ADRIANA JARDIM DE ALMEIDA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO – 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCO DA CRIPTOSPORIDIOSE BOVINA NA
MICRORREGIÃO DE CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ,
E IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium parvum* PELA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR)**

ADRIANA JARDIM DE ALMEIDA

**Tese apresentada ao Centro de Ciências
e Tecnologias Agropecuárias, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Produção Animal**

ORIENTADOR: PROF. FRANCISCO CARLOS RODRIGUES DE OLIVEIRA

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO – 2006**

**DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCO DA CRIPTOSPORIDIOSE BOVINA NA
MICRORREGIÃO DE CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ,
E IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium parvum* PELA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR)**

ADRIANA JARDIM DE ALMEIDA

**Tese apresentada ao Centro de Ciências
e Tecnologias Agropecuárias, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Produção Animal**

Aprovada em 29 de Agosto de 2006.

Comissão examinadora:

Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes - Ph.D - UFRRJ

Prof. Victor Martin Quintana Flores - Ds.C - UENF

Prof. Claudio Baptista de Carvalho - Ph.D - UENF

Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira - Ds.C - UENF
Orientador

Dedico este trabalho a Deus pela constante presença em todos os momentos de minha vida, e a meus pais, Glória e Nilton, a quem posso ter plena confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus pais por mais esta realização.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela oportunidade do curso de doutorado.

Ao Professor Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira, por quem tenho verdadeira admiração, por ter me orientado e auxiliado em todos os momentos necessários, inclusive durante as saídas a campo com dedicação, confiança e respeito.

Ao Professor Victor Martin Quintana Flores, pela paciência e boa vontade em me ensinar e auxiliar durante os experimentos envolvendo biologia molecular, e por tudo que tem feito em meu favor em diversos momentos deste trabalho.

A Gonçalo Apolinário de Souza Filho, pelo apoio, carinho, compreensão e conselhos durante este último ano.

Aos Professores e amigos, Eulógio C. Q. de Carvalho, Maria Angélica V. Pereira, Cláudio B. de Carvalho, Sílvia Pereira, Carlos Eurico P. Travassos, Marinete P. Carrero, Pedro Paulo Abílio, Frederico Straggioti, Olney Motta, Antônio Albernaz, Leonardo Serafim, pelos conselhos e instruções durante a Graduação, o Mestrado e o Doutorado.

Aos colegas Bianca Ederli, e Lério Sales, pelo auxílio em práticas de campo e laboratoriais.

Às amigas especiais Ligia Chagas, Francimara Mariano, Marcelle Caldeira e Verônica Zavalla, por serem mais do que amigas, não medindo esforços para que este trabalho fosse cumprido.

A todos os colegas do Laboratório de Sanidade Animal e do Núcleo de Análise Genômica, que durante estes anos me incentivaram e me prestaram suas amizades. A Alan Branco, Alessa Siqueira, Ana Bárbara Rodrigues, Ana Paula da Costa, Beatriz Ferreira, Carla Chicarino, César Siqueira, Dirlei Donatele, Flávia Dias, Leandro Mattos, Luciana Lemos, Marcos Vinícius, Valéria Marques, Verônica Lima, em especial a Gina Teixeira e Fabíola Rangel, que sempre tiveram à disposição para me aconselhar em inúmeros momentos de minha vida profissional e pessoal.

A todos os amigos, que de maneira indireta, me ajudaram durante estes anos. A Alexandre Ferreira, Carina Haddad, Carlos Haddad, Dionéia Souza, Eduardo Duarte, Enrico Jardim, Erica Maciel, Fernanda Garret, Jackeline Ribeiro, Lara Fraga, Laura Mayerhoffer, Rômulo Joviano, Sady Nagib, Lucíola Lanes, Millena Nogueira, Vitor Correia e a todos os que não foram citados, mas que conviveram comigo e passaram em minha vida de maneira especial.

BIOGRAFIA

Adriana Jardim de Almeida, nascida na Cidade do Rio de Janeiro, no dia 16 de fevereiro de 1977, filha de Glória Maria Jardim de Almeida e Nilton Soares de Almeida. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) no ano de 2000, foi bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Sanidade Animal (CCTA / UENF) de 1996 a 2000, sob a orientação dos professores José Renato Junqueira Borges e Cláudio Baptista de Carvalho. Neste ano, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Produção Animal, Mestrado, Sanidade Animal / UENF, em Campos dos Goytacazes – RJ, submetendo-se à defesa de dissertação para conclusão do curso em fevereiro de 2002, sob a orientação da professora Friederike Luise Mayen.

Em agosto de 2002, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Produção Animal, Doutorado, Sanidade Animal, da UENF, em Campos dos Goytacazes – RJ, submetendo-se à defesa de tese para conclusão do curso em agosto de 2006.

CONTEÚDO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico.....	3
2.2. O gênero <i>Cryptosporidium</i>	3
2.2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i>	4
2.3. Ciclo biológico.....	5
2.4. Transmissão.....	5
2.5. Patogenia.....	6
2.6. Características genéticas.....	7
2.6.1. Genoma reduzido e compacto.....	7
2.6.2. Análise do genoma.....	9
2.7. Criptosporidiose.....	10
2.7.1. Em bovinos.....	10
2.7.2. Em outros animais domésticos.....	11
2.7.3. Em humanos.....	11
2.8. Perdas econômicas.....	12
2.9. Diagnóstico.....	13
2.9.1. Observação direta e concentração.....	13
2.9.2. Técnicas de coloração.....	13
2.9.3. Biologia molecular.....	13
2.9.4. Outras técnicas.....	14
2.10. Epidemiologia.....	14
2.11 Tratamento, controle e profilaxia.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Locais de execução.....	17
3.1.1. Para coleta do material fecal.....	17
3.1.2. Propriedades.....	20
3.2. Questionário.....	20
3.3. Coleta de fezes.....	20
3.4. Técnica de Ziehl-Neelsen modificada.....	21

3.5. Isolamento de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> nas fezes.....	22
3.6. Diagnóstico molecular.....	22
3.6.1. Extração do DNA.....	23
3.6.2. Reação em Cadeia da Polimerase da subunidade 18S ribossomal.....	24
3.6.2.1. Amplificação.....	24
3.6.2.2. Procedimento utilizado no termociclador.....	25
3.7. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Diagnóstico.....	26
4.2.1. Morfometria.....	29
4.2. Frequência de <i>Cryptosporidium</i> spp.	31
4.2.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>C parvum</i> de acordo com diferentes faixas etárias	33
4.2.2. <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>C parvum</i> de acordo com o sexo.....	34
4.3. Fatores de risco relacionados ao ambiente.....	34
4.3.1. Tamanho das propriedades.....	35
4.3.2. Fonte de água.....	36
4.3.3. Estábulo.....	37
4.4. Fatores de risco relacionados ao manejo.....	39
4.4.1. Sistema de criação.....	39
4.4.2. Sistemas de produção.....	41
4.4.3. Ordenha.....	42
4.4.4. Resfriamento de leite.....	43
4.4.5. Presença de veterinário responsável pela propriedade.....	44
4.4.6. Produtividade.....	45
4.4.7. Contato com outras espécies de animais.....	47
4.5. Fatores de risco relacionados ao manejo dos animais.....	48
4.5.1. Tratamento.....	48
4.5.2. Bebedouros.....	49
4.5.3. Higiene.....	50
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
7. APÊNDICE.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos resultados das técnicas empregadas para o diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. em bezerros bovinos.....	29
Tabela 2 - Medidas de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos observados em microscópio óptico de contraste de fase.....	30
Tabela 3 - Diagnóstico de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em fezes de bezerros bovinos analisadas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada em animais criados no município de Campos dos Goytacazes-RJ.....	31
Tabela 4 - Diagnóstico de <i>Cryptosporidium parvum</i> pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em fezes de bezerros bovinos criados no município de Campos dos Goytacazes-RJ.....	32
Tabela 5 - Comparação dos resultados das Técnicas de coloração e Molecular no diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. em bezerros bovinos.....	33
Tabela 6 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação ao tamanho das propriedades visitadas.	35
Tabela 7 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao tamanho das propriedades visitadas.	35
Tabela 8 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação à fonte de água.....	36

Tabela 9 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à fonte de água.....	37
Tabela 10 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação ao tipo de construção do estábulo.....	38
Tabela 11 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao tipo de construção do estábulo.....	38
Tabela 12 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de criação.....	39
Tabela 13 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de criação.....	40
Tabela 14 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de produção.....	41
Tabela 15 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de produção.....	41
Tabela 16 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de ordenha.....	43
Tabela 17 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de ordenha.....	43
Tabela 18 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação à prática de resfriamento de leite.	44
Tabela 19 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à prática de resfriamento de leite.....	44
Tabela 20 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação à assistência veterinária.....	45
Tabela 21 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à assistência veterinária.....	45
Tabela 22 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação à média de produção leiteira por animal.	46
Tabela 23 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à média de produção leiteira por animal.....	46
Tabela 24 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação ao tratamento dos animais.....	48

Tabela 25 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao tratamento dos animais.....	48
Tabela 26 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação à presença de reservatório de água.....	49
Tabela 27 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à presença de reservatório de água..	50
Tabela 28 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium parvum</i> em fezes de bezerros bovinos em relação às condições sanitárias.....	51
Tabela 29 - Risco relativo da presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bezerros bovinos em relação às condições sanitárias.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização aproximada das 13 Propriedades da Microrregião de Campos dos Goytacazes - RJ utilizadas para a colheita do material fecal e entrevistas.....	18
Figura 2 - Propriedades de criação bovina no Município de Campos dos Goytacazes - RJ.....	19
Figura 3 - Oocistos do gênero <i>Cryptosporidium</i> observados em fezes de bezerros bovinos.....	27
Figura 4 - Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 2%.....	28
Figura 5 - Presença de diferentes espécies de animais convivendo nos locais de criação de bovinos.....	47

RESUMO

ALMEIDA, Adriana Jardim de, D.S. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Agosto de 2006. Diagnóstico e fatores de risco da criptosporidiose bovina na microrregião de Campos dos Goytacazes-RJ, e identificação de *Cryptosporidium parvum* através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitas do epitélio gastrointestinal de uma ampla variedade de vertebrados, e são capazes de causar perdas econômicas consideráveis na criação de bovinos. *Cryptosporidium parvum* é um dos agentes causais da criptosporidiose em humanos e em animais domésticos, incluindo bovinos. O objetivo deste trabalho foi documentar a presença de *C. parvum* em bovinos no Município de Campos dos Goytacazes, RJ e analisar os fatores de risco para a infecção. Foram coletadas 100 amostras frescas de fezes de bezerros bovinos, criados em 13 propriedades, e os esfregaços obtidos das amostras foram corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada e observados nas objetivas de 400x e 1000x. Após a concentração dos oocistos através de centrífugo-flutuação em sacarose e extração do DNA, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada, utilizando-se os seguintes iniciadores: CryptoF: 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' e CryptoR: 5' CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA 3' ; AL1598: 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' e AL3032: 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' para a primeira e segunda ampliações, respectivamente. Das 100 amostras analisadas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, 61 foram positivas para a presença do protozoário. Todavia, os fragmentos específicos para *C.*

parvum foram amplificados em apenas 45 amostras, o que demonstra a existência de outras espécies de *Cryptosporidium* infectando os animais. A análise estatística dos fatores de risco tais como as características gerais das propriedades e condições de alojamento dos bezerros revelaram que três fatores influenciaram a infecção dos bezerros: animais criados em propriedades com sistemas tecnificados que utilizam ordenha mecânica, resfriamento de leite e bezerros criados em locais que possuem reservatórios de água, apresentaram risco de infecção verificado através de ambas as técnicas de diagnóstico utilizadas.

Palavras-chave: Criptosporidiose, *Cryptosporidium parvum*, coccídio, bovino.

ABSTRACT

ALMEIDA, Adriana Jardim de, D.S. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August 2006. Diagnosis and risk factors of bovine cryptosporidiosis in Campos dos Goytacazes-RJ, and identification of *Cryptosporidium parvum* through polymerase chain reaction (PCR).

Supervisor: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Cryptosporidium is a protozoan parasite that infects the gastrointestinal epithelium of a wide range of vertebrate species, and may cause considerable economic losses in calves. *Cryptosporidium parvum* is one of the causative agents of cryptosporidiosis in humans and domesticated mammals, including calves. The purpose of the study reported was to document the presence of *Cryptosporidium* sp. and *C. parvum* in dairy cattle herds in Municipal District of Campos dos Goytacazes, RJ, and to analyze the risk factors for the infection. Fresh fecal samples were collected from 100 calves on 13 dairy farms, and the smears prepared from the samples were stained by the modified Ziehl-Neelsen technique and examined by direct microscopy at 400x and 1000x magnifications. After oocysts concentration by sucrose flotation and the DNA extraction, the polymerase chain reaction (PCR) was performed with the primers CryptoF: 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' and CryptoR: 5' CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA 3' ; AL1598: 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' and AL3032: 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' for the first and second amplifications, respectively. Of the 100 samples, 61 were positive to *Cryptosporidium* sp. when the modified Ziehl-Neelsen technique

was used. However, the specific DNA fragments for *C. parvum* were amplified only in 45 samples, demonstrating that there are another species of *Cryptosporidium* infecting the animals. Statistical analysis of the risk factors such as general characteristics of the farm and housing conditions of the calves revealed that only three of the factors were demonstrated to have a statistically significant influence for infection. Animals bred under technical systems like the use of milking equipments, milking cooler and calves raised in places that have water recipients were more likely to be infected when both methods of diagnosis were used.

Keywords: Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium parvum*, coccidian, cattle.

1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Cryptosporidium* são coccídios oportunistas, intracelulares obrigatórios, e têm sido, recentemente indicados como agentes responsáveis por problemas de má absorção intestinal em animais domésticos, silvestres e no homem, ocorrendo com maior gravidade em indivíduos neonatos e em imunocomprometidos. Este protozoário infecta os tratos respiratório e gastrointestinal da maioria dos animais, incluindo o homem. A diarreia é o principal sinal clínico observado nos animais acometidos, culminando em perda de peso, de produtividade e podendo levar a morte. Neste caso, observa-se parasitismo nas bordas das microvilosidades dos intestinos delgado e grosso, causando elevado prejuízo econômico. São descritas pelo menos 10 espécies válidas para o gênero., sendo *C. parvum* comumente diagnosticado em bezerros, e no homem, sendo considerado como a espécie mais patogênica, tendo assim, elevada importância em saúde pública. Parasitas deste gênero não são espécie-específicos, podendo haver transmissão para humanos diretamente através da via fecal-oral. Devido ao reduzido tamanho e ausência de diferenças morfológicas, não é possível a detecção do *C. parvum* especificamente, ou de qualquer outra espécie, através da morfologia e da morfometria dos oocistos. Para contornar estas limitações, métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido utilizados como alternativa para a segura identificação das espécies do gênero *Cryptosporidium*. O intenso contato de humanos com bovinos em áreas rurais é um fator importante na manutenção de fontes de infecção de *C. parvum*, o que justifica a realização de um estudo que determine a prevalência da infecção entre os bovinos criados no

Município de Campos dos Goytacazes – RJ, bem como, determine os fatores de risco para a infecção dos bezerros.

Esta pesquisa objetivou detectar a presença de protozoários do gênero *Cryptosporidium*, bem como a espécie *C. parvum* em fezes de bovinos no Município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, verificando os possíveis fatores de risco associados à infecção nestes animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

O primeiro relato de infecção por *Cryptosporidium* é atribuído a Ernest Edward Tyzzer, no ano de 1907, onde descreve o parasitismo afetando o epitélio gástrico de ratos de laboratório, sendo então denominado *C. muris*. Em 1971, o primeiro caso de criptosporidiose em bovinos foi descrito, com relato de diarreia severa (STERLING e ARROWOOD, 1992). Os primeiros casos de criptosporidiose humana foram diagnosticados através de biópsia intestinal e retal (MEISEL et al., 1976).

2.2. O gênero *Cryptosporidium*

Parasitas do gênero *Cryptosporidium* são protozoários cujos oocistos possuem quatro esporozoítas, diferentemente de outros coccídios que contêm esporozoítas dentro de esporocistos (STERLING e ARROWOOD, 1992). Estes possuem grande capacidade de reprodução e disseminação, sendo várias espécies conhecidas por infectar diferentes espécies de animais (GRAAF et al., 1999). Diferenças na forma ou na estrutura interna podem ser observadas com o auxílio de um microscópio de alta resolução. Embora a análise morfométrica seja uma boa forma de diagnóstico, a dificuldade em identificar oocistos surge quando o tamanho, forma ou estruturas internas de umas espécies não pode ser distinguido de outras, como é o caso das espécies do gênero (FAYER et al., 2000). Apesar de existirem mais de 20 espécies descritas em diferentes hospedeiros (O'DONOGHUE, 1995),

existem controvérsias com relação à validade da maioria delas, já que estudos envolvendo transmissão cruzada indicam que alguns isolados de oocistos do gênero *Cryptosporidium* são infectantes para diferentes espécies de hospedeiros (O'DONOGHUE et al., 1987).

Existem divergências quanto à classificação de algumas das espécies, onde de um lado, autores como WIDMER et al. (1998), citam a existência de diferentes genótipos, como o genótipo H (ou genótipo humano), que seria encontrado somente em humanos, e o genótipo C (ou genótipo bovino), que seria capaz de infectar tanto animais quanto humanos. Em contrapartida, autores como PARK et al. (2006), não só classificam ambos os genótipos citados por WIDMER et al. (1998) como sendo duas diferentes espécies (*C. hominis* e *C. parvum*), como também relatam a infecção de bovinos e de ovinos por *C. hominis*. Segundo TANRIVERDI e WIDMER (2006), as espécies *C. parvum* e *C. hominis* são idênticas morfológicamente e possuem 97% de semelhança genômica.

2.2.1. *Cryptosporidium parvum*

Esta é uma espécie considerada de grande importância como agente etiológico na diarreia neonatal em bezerros bovinos, apesar de ter capacidade infectante em outras espécies de animais, de diferentes idades (GRAAF et al., 1999). As infecções clínicas de quadro mais severo em humanos têm sido associadas a pacientes imunologicamente comprometidos, incluindo pessoas portadoras do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), pessoas subnutridas, mulheres grávidas e indivíduos que utilizam medicamentos imunossupressores. A criptosporidiose causada pelo *C. parvum* tem sido documentada em humanos e em animais em 95 países (FAYER et al., 1990, UNGAR, 1990 citados por FAYER et al., 1998).

Este parasito tem sido amplamente reconhecido como o responsável por surtos de diarreia em pessoas freqüentadoras de piscinas comunitárias nos EUA (EUA), indicando um grave problema em saúde pública (CAUSER et al., 2005).

2.3. Ciclo biológico

O ciclo biológico do gênero *Cryptosporidium* é considerado como monoxeno, e segue um padrão descrito para outros coccídios entéricos, o qual inclui uma fase assexuada e outra fase sexuada (FAYER et al., 1990).

O oocisto do *Cryptosporidium* é o estágio infectante, responsável pela transmissão e pela manutenção do parasito no ambiente (ENTRALA et al., 2001). Após a ingestão, os oocistos liberam quatro esporozoítos infectantes no lúmen intestinal. Estes penetram nas células intestinais, onde amadurecem assexuadamente no interior de vacúolos, formando os merontes de tipo 1, os quais liberam merozoítas que também invadem os enterócitos, dando origem aos merontes de tipo 2. Alguns merontes de tipo 2 se diferenciam em macrogametócitos e em microgametócitos. Estes últimos fertilizam os macrogametócitos, o que irá dar origem ao zigoto. O zigoto se transforma em oocisto. Milhões de oocistos maduros são liberados nas fezes, contaminando o meio ambiente, e permanecendo viáveis durante vários meses (FAYER e UNGAR, 1986).

Ao contrário do que ocorre com a maioria dos coccídios, os oocistos de *Cryptosporidium* são capazes de esporular no lúmen intestinal, e de liberar os esporozoítos, iniciando uma reinfecção. O ciclo biológico se completa em cerca de uma semana (DUBEY e FAYER, 1982).

2.4. Transmissão

A transmissão pode ocorrer diretamente entre animais, entre humanos, de animais para humanos, ou indiretamente através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos viáveis (FAYER et al., 2000). A transmissão ocorre via fecal-oral, onde oocistos de tamanho reduzido (4 a 6 μ m) são eliminados nas fezes. Alguns animais podem eliminar milhões de oocistos esporulados em um grama de fezes, contaminando o ambiente. A infecção se inicia através da ingestão destes oocistos (DUBEY e FAYER, 1982). Oocistos eliminados por humanos têm capacidade de infectar bovinos, ovinos, caprinos, felinos e caninos (MAKUCH, 1996). Este mesmo autor cita que oocistos eliminados de felinos, bezerros e suínos aparentam ser infecciosos para humanos. Oocistos de *C. parvum* podem alcançar a superfície das águas, atingindo os suprimentos hídricos estando infectantes. Bovinos de corte e leiteiros, em particular bezerros, são considerados

importantes reservatórios de oocistos, devido ao grande número de animais, distribuição, incidência de infecção e ao elevado número de oocistos por eles excretados (WIDMER et al., 1998; KUCZYNSKA e SHELTON, 1999).

2.5. Patogenia

Após o rompimento do oocisto, devido a sua exposição às enzimas e à bile e liberação dos esporozoítos no intestino, estes se aderem aos enterócitos do hospedeiro (este processo também é descrito para as células da conjuntiva, do trato respiratório e da árvore biliar). Após esta adesão, há uma invaginação da membrana celular, que envolve o esporozoíto formando um vacúolo extracelular (STERLING e ARROWOOD, 1992). Este vacúolo irá determinar a atrofia das microvilosidades, o que poderá ser uma porta de entrada para outras infecções entéricas (MODOLO et al., 1988). Todo o processo de invasão de células hospedeiras e desenvolvimento do parasita culminam em branda à moderada fusão das vilosidades, mudanças na superfície do epitélio (GRAAF et al., 1999), como metaplasia ou degeneração (ENEMARK et al., 2002), podendo haver aumento dos linfonodos e eosinofilia da lâmina própria (ENEMARK et al., 2003) e até mesmo espessamento e ulceração das vilosidades (MODOLO et al., 1988). A infecção se concentra principalmente na parte distal do intestino delgado, mas lesões podem ser encontradas também no ceco, cólon e duodeno (GRAAF et al., 1999). As lesões entéricas causadas pelo *Cryptosporidium* diminuem as atividades enzimáticas intracelulares da mucosa intestinal e alteram o metabolismo corpóreo (MODOLO et al., 1988).

A invasão das células das microvilosidades intestinais por este parasita é descrita como intracelular e extracitoplasmática, já que ele se situa na superfície do epitélio intestinal, porém abaixo da membrana da célula hospedeira. Isto permite que o protozoário se proteja do sistema imunológico, e ao mesmo tempo, se beneficie do transporte de solutos através da membrana da célula parasitada (ABRAHAMSEN et al., 2004).

2.6. Características genéticas

A dificuldade em se obter amostras purificadas de diferentes estágios de desenvolvimento dos protozoários do gênero *Cryptosporidium* limita o entendimento

de mecanismos bioquímicos importantes para o desenvolvimento dos mesmos e para a interação parasita-hospedeiro. Entretanto, o pequeno tamanho e a organização simples de seu genoma (10,4Mb), o qual é composto por oito cromossomos dispostos entre 1.04 a 1.5Mb, compensa estas desvantagens (BLUNT et al., 1997). Considerando a dependência absoluta do desenvolvimento do *C. parvum* nas células dos hospedeiros, diversas rotas bioquímicas e mecanismos moleculares envolvidos na interação parasita-hospedeiro são dificilmente identificados (LIU et al., 1999).

2.6.1. Genoma reduzido e compacto

O genoma de protozoários desta espécie é compacto e rico em proteínas (BANKIER et al., 2003), e sua análise revela eficientes rotas metabólicas e dependência do hospedeiro para obtenção de nutrientes (ABRAHAMSEN et al., 2004). As razões básicas da redução e compactação do genoma do *C. parvum* são as seguintes:

a) Degeneração de mitocôndria

A perda massiva de genes mitocondriais é evidente, o que revela uma característica anaeróbica de seu metabolismo, incomum entre os parasitas do filo Apicomplexa (SLAPETA e KEITHLY, 2004) e, o complemento de enzimas mitocondriais-alvo encontradas no genoma é bastante reduzido, indicando que a organela adotou uma quantidade restrita de funções (FOTH e McFADDEN, 2003);

b) Ausência de Apicoplasto (plastídio)

Plastídios são organelas fotossintéticas de plantas e algas, e a descoberta de plastídios não fotossintéticos em parasitas Apicomplexos despertou interesse na pesquisa da utilização destas organelas como potenciais alvos para drogas (FOTH e McFADDEN, 2003). Nos seres Apicomplexos, os plastídios são denominados apicoplastos. Estudos propuseram a ausência de apicoplasto em parasitas do gênero *Cryptosporidium* (PUTIGNANI et al., 2004). Esta organela é indispensável para alguns organismos, e suas funções ainda não estão bem definidas. Sabe-se que, curiosamente, os parasitas não conseguem invadir células hospedeiras quando

privados de seus apicoplastos (HE et al., 2001) e que esta organela está envolvida na biossíntese de ácidos graxos (RALPH et al., 2004). Diferentemente da maioria dos seres do filo Apicomplexa, o *C. parvum* parece não possuir um genoma de apicoplasto, o que torna inviável que este seja utilizado como alvo de uma provável droga que combata o parasita (ZHU et al., 2000). Segundo KEELING (2004), a ausência de apicoplasto nestes protozoários pode ocorrer devido a uma das seguintes hipóteses: a organela foi perdida completamente, ou foi originada somente nos outros Apicomplexa, e o *Cryptosporidium* nunca teve apicoplasto. Para perder completamente a organela em questão, o gênero *Cryptosporidium* teve que modificar sua bioquímica de modo que todas as proteínas associadas ao apicoplasto se tornassem desnecessárias ou redundantes, permitindo a eliminação dos genes que as codificaram e que codificaram a organela em si. Estas proteínas poderiam representar mais de um terço dos genes eliminados do genoma dos coccídios deste gênero. Outra hipótese seria que as espécies de *Cryptosporidium* nunca tiveram apicoplasto, o que teria implicações na evolução destas organelas dos Apicomplexos (KEELING, 2004).

c) Outras razões para a redução do genoma

Para o gênero *Cryptosporidium*, a redução do genoma ocorreu predominantemente através da redução de regiões inter-gênicas, a perda e a redução dos íntrons e uma redução do comprimento médio dos próprios genes. Ou seja, o protozoário eliminou grande parte do conteúdo do genoma, e o compactou de forma eficiente, ao contrário de genomas de outros parasitas, como os microsporidia (KATINKA et al., 2001).

2.6.2. Análise do genoma

O estudo do genoma completo do *C. parvum* apresenta novos aspectos da biologia e da evolução dos parasitas Apicomplexos (KEELING, 2004). A análise filogenética da pequena subunidade ribossomal do RNA (SSU RNA) permite verificar diferenças entre as espécies de *Cryptosporidium*. Análises da seqüência de DNA revelam repetições sucessivas de mono-, di- e trinucleotídeos de A, AT e AAT, refletindo a grande quantidade de nucleotídeos AT no genoma de parasitos desta espécie (FENG et al., 2000).

A análise da seqüência completa do genótipo 2 do *C. parvum* revela 9,1 Mb de seqüência total de DNA, com oito cromossomos. Revela também um número estimado de 3807 proteínas codificadoras de genes. O genoma não codifica nenhuma enzima participante do ciclo de Krebs, e nenhum dos componentes constituintes dos complexos mitocondriais I ao IV; estes achados indicam que o parasita não conta com uma oxidação completa e nem com cadeias respiratórias para síntese de adenosina trifosfato (ABRAHAMSEN et al., 2004).

Estudos caracterizaram uma organela semelhante à mitocôndria através de descrição ultra-estrutural e morfológica, localização de anticorpos mitocondriais, análise filogenética de genes que codificam transporte de proteínas mitocondriais e identificação e análise de seqüências de genes associados à mitocôndria (PUTIGNANI et al., 2004). Também está presente uma membrana semelhante à membrana mitocondrial, que está envolvida na catalisação da redução de oxigênio molecular para produzir H₂O, e não H₂O₂. A degeneração da mitocôndria e de suas habilidades metabólicas sugere que o parasita recorre a glicólise para a produção de energia, sendo capaz de utilizar e catabolizar mono-açúcares (como a glicose e a frutose), assim como armazenar e catabolizar polissacarídeos como a amilopectina. Como muitos organismos anaeróbicos, os parasitas do gênero *Cryptosporidium* economizam ATP através da utilização de pirofosfato fosfofrutoquinase-dependente. Enzimas para o metabolismo de lipídios complexos como o glicerolípido e o inositol fosfato foram identificadas. Já os ácidos graxos aparentemente não são fontes de energia, visto que as enzimas necessárias para a degradação dos mesmos são ausentes (ABRAHAMSEN et al., 2004).

O metabolismo de purinas é simplificado, conservando apenas a adenosinoquinase e enzimas catalisadoras da conversão de adenosina 5'-monofosfato (AMP) para inosina, xantossina e guanossina 5'-monofosfato (IMP, XMP e GMP) (ABRAHAMSEN et al., 2004).

2.7. Criptosporidiose

A criptosporidiose é capaz de causar depressão leve a moderada, febre, diarreia aquosa e desidratação (ANDERSON e BULGIN, 1981). Os sinais clínicos mais severos têm sido associados a pessoas e animais comprometidos imunologicamente, incluindo indivíduos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ou portadores de outras viroses, mal nutridos, consumidores de

medicamentos imunossupressores e provavelmente fêmeas prenhes (UNGAR et al. citados por FAYER et al., 1998).

2.7.1. Em bovinos

Problemas gastrintestinais são freqüentes em criações de bovinos, sendo a diarréia a enfermidade gastrintestinal mais comum neste tipo de criação (NAVARRE et al., 2000). Coccídios do gênero *Cryptosporidium* são associados com diarréia em bovinos, e a extensão da doença clínica e a sua relação com outros microorganismos enteropatogênicos não são bem entendidas, assim como existe pouca informação a respeito de diferenças na virulência, padrões de excreção e imunogenicidade apresentados por diferentes espécies de *Cryptosporidium* (DUBEY e FAYER, 1982; FAYER et al., 1998). Em bovinos, são descritas as seguintes espécies de *Cryptosporidium*: *C. parvum* (MORGAN et al., 1998), *C. felis* (PIENIAZEK et al., 1999) e *C. muris*, posteriormente renomeado *C. andersoni* (UPTON e CURRENT, 1985; ENEMARK et al., 2002).

Em animais jovens, a criptosporidiose é capaz de causar severa enterite, resultando em morbidade significativa e em importantes perdas econômicas para animais de produção (XIAO et al., 1998).

2.7.2. Em outros animais domésticos

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são capazes de infectar uma grande variedade de vertebrados, inclusive répteis, aves, animais silvestres e mamíferos domésticos (O'DONOGHUE, 1995). Existem relatos de 152 espécies de mamíferos capazes de serem infectadas por *C. parvum* ou por organismos semelhantes a esta espécie, mas poucos oocistos têm sido estudados utilizando-se a morfometria, técnicas moleculares e especificidade pelo hospedeiro. Técnicas estas que fornecem confiança na identificação de espécies (FAYER et al., 2000). Estes mesmos autores citam que dentre os animais susceptíveis, pode-se citar os gatos domésticos, os ratos, os cobaios, as aves domésticas, peixes e lagartos. Estudos moleculares indicam que os cães podem transmitir o genótipo bovino de *Cryptosporidium*, o qual é patogênico para a espécie humana (ABE et al., 2002).

2.7.3. Em humanos

Parasitas deste gênero podem infectar humanos, e numerosos casos têm sido descritos em todo o mundo, ocorrendo inclusive em formas de surtos. Humanos de todas as idades podem ser afetados, apesar da doença ser mais comum em crianças. Os oocistos são resistentes a vários desinfetantes, inclusive ao hipoclorito de sódio a 10%, bem como à secagem e ao congelamento (QUIGLEY, 2001), sendo importante salientar que a cloração é o método utilizado na desinfecção da água nos reservatórios públicos, os quais são contaminados eventualmente por fezes de animais domésticos que se encontram próximos às fontes de água (FERREIRA e BORGES, 2002). Devido ao seu tamanho reduzido, o oocisto é capaz de passar através de filtros (como os filtros de sistemas de tratamento de água), atingindo as residências (QUIGLEY, 2001).

Sete espécies de *Cryptosporidium* já foram diagnosticadas em humanos (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris*), mas as infecções por *C. parvum* e *C. hominis* são as mais freqüentemente detectadas (XIAO et al., 2004, CACCIÒ et al., 2005).

A infecção por parasitas deste gênero em indivíduos imunocompetentes, geralmente é auto-limitante e de curso benigno. No entanto, nos indivíduos portadores do vírus HIV, ela se manifesta com quadros altamente espoliativos, podendo levar à desidratação, à perda de peso e evoluir para a síndrome de má-absorção intestinal (CAPUANO et al., 2001). A doença também é capaz de causar diarreia persistente, febre, dor abdominal, com possível envolvimento da traquéia e brônquios, sendo um problema severo nos países em desenvolvimento (RIBEIRO et al., 2004) e tendo um mau prognóstico (BRAZ et al., 1996).

2.8. Perdas econômicas

As perdas econômicas causadas por criptosporidiose em bezerros neonatos se devem à diarreia: desidratação, retardamento do crescimento e mortalidade. A diarreia exige alguns cuidados especiais como reposição eletrolítica, fluido terapia, administração de medicamentos, entre outros, os quais são dispendiosos e trabalhosos (SANFORD et al., 1982), citados por GRAAF et al. (1999). Em se tratando de perdas econômicas, *C. parvum* é a espécie considerada como a mais importante do gênero (ENEMARK et al., 2002). Estima-se que 100 milhões de

dólares são gastos anualmente com a criptosporidiose pelos criadores de bovinos (HARP et al., 1998).

2.9. Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico mais utilizados para a detecção de parasitos do gênero *Cryptosporidium* estão descritos a seguir.

2.9.1. Observação direta e concentração

O método de observação direta é realizado pela visualização microscópica dos oocistos entre lâmina e lamínula a fresco (diretamente das fezes diarréicas ou após diluição das fezes pastosas em solução salina a 0,85%), sendo observados em microscópio óptico com objetiva de imersão (DeCARLI, 1994).

Inúmeras técnicas de concentração podem ser usadas com os objetivos de aumentar a sensibilidade do exame e de diminuir os artefatos fecais (DeCARLI, 1994). Dentre elas este mesmo pesquisador cita a técnica de centrífugo-flotação em solução de sacarose (técnica de Sheather) e o método de centrífugo-sedimentação pelo formaldeído-éter (técnica de Richie modificada).

2.9.2. Técnicas de coloração

As técnicas colorimétricas para detecção de *Cryptosporidium* incluem a coloração de Giemsa em esfregaços de fezes misturados à solução salina, colorações de Ziehl-Neelsen e de Heine, os quais podem ser feitos após a fixação de esfregaços de fezes frescas ou preservadas (DeCARLI, 1994). A técnica de safranina-azul de metileno é considerada rápida, simples e eficaz para a detecção de oocistos (BAXBY et al., 1984).

2.9.3. Biologia molecular

A identificação de espécies deste gênero baseada em técnicas morfométricas são pouco confiáveis (PÉREZ-CORDON et al., 2005). Devido à dificuldade de diagnóstico pelas outras metodologias, a técnica de PCR mostra ser altamente sensível e específica e capaz de fazer o diagnóstico em amostras contendo apenas um oocisto. No entanto, a utilidade desta técnica pode variar

dependendo de vários fatores, onde o iniciador é o fator principal. Apesar de vários iniciadores de PCR serem utilizados para detectar o *Cryptosporidium*, a sensibilidade e a especificidade parece variar entre os diferentes iniciadores (MORGAN e THOMPSON, 1998). Várias publicações descrevem diversos tipos de iniciadores. Dentre eles, inclui-se SB50, LAX469 F/ LAX869R, AWA995 F/ AWA1206R, Cry44/Cry39, Cp. E/Cp.Z e 012F/CP-CR (MORGAN et al., 1997).

2.9.4. Outras técnicas

A técnica de imunofluorescência indireta é utilizada com o objetivo de demonstrar a presença de imunoglobulinas específicas (contidas no soro em teste) contra oocistos de *Cryptosporidium*. Oocistos purificados são usados como antígenos nos ensaios (BRAZ et al., 1996). O Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA) investiga a resposta imunológica do organismo à infecção através do reconhecimento de imunoglobulinas específicas contidas no soro (QUÍLEZ et al., 2002). O método de “Western blotting” tem sido desenvolvido para a detecção de anticorpos antígenos-específicos para este parasito (ARES-MAZÁS et al., 1999). Técnicas que envolvem detecção de anticorpos são questionáveis, pois, apesar de a parede dos oocistos conter antígenos capazes de estimular a resposta imunológica, e podendo-se detectar estes anticorpos, muitos antígenos da parede dos oocistos são os mesmos em várias espécies. Conseqüentemente, não existem anticorpos que diferenciem espécies de *Cryptosporidium* de uma forma confiável (FAYER et al., 2000). A utilização de anticorpos monoclonais específicos e dirigidos contra epitopos de parede dos oocistos de *Cryptosporidium* constitui técnicas rápidas de detecção de oocistos baseadas em citometria de fluxo e separação imunomagnética (VESEY et al., 1993, VESEY et al., 1997).

2.10. Epidemiologia

A criptosporidiose tem distribuição cosmopolita, com maior prevalência em países menos desenvolvidos, principalmente localizados na América Latina e na África. Estudos de soroprevalência demonstram positividade de cerca de 30% na América do Norte e Europa, e 60% em países Latino-Americanos (FERREIRA e BORGES, 2002). Contudo, no Canadá, foi demonstrada baixa prevalência deste parasito tanto em bovinos adultos (1,1%) quanto em bezerros (3,1%), em uma

pesquisa onde as amostras foram analisadas utilizando-se teste de anticorpos fluorescentes após concentração de oocistos por gradiente de sacarose (GOW e WALDNER, 2006).

Em Botucatu-SP, foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* em 26% dos bezerros com diarreia e em 23% dos animais sem comprometimento intestinal, em citação feita por MODOLO et al. (1988).

A prevalência do gênero *Cryptosporidium* foi determinada em bezerros bovinos lactentes da bacia leiteira de Pará de Minas-MG, onde 19,15% foram positivos para a presença de oocistos (GARCIA e LIMA, 1994).

Um trabalho realizado com 122 bezerros na bacia leiteira Sul-Fluminense no Estado do Rio de Janeiro demonstrou que dos 59 animais com idade inferior a 30 dias, 36 (61,02%) estavam infectados por *Cryptosporidium*, e dos 63 com idade superior a 30 dias, 52 (82,54%) mostraram-se positivos para este protozoário (SOUZA e LOPES, 1995). Já na Cidade de São Paulo, em estudo conduzido por GENNARI et al. (1999), foi detectado que 2,83% das 353 amostras fecais de cães examinadas encontravam-se positivas para a presença de *Cryptosporidium* spp, e das 187 análises fecais de gatos, 14,44% foram positivas para a presença de oocistos deste parasito.

Um trabalho realizado na microrregião de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro demonstrou que 96% das 27 propriedades analisadas foram positivas, sendo que das 211 amostras coletadas de bezerros, 43,6% foram positivas para *Cryptosporidium* spp. (EDERLI, 2003).

2.11. Tratamento, controle e profilaxia

Diversas drogas têm sido testadas para o tratamento da criptosporidiose, mas nenhuma delas se mostrou satisfatória, havendo apenas eficácia parcial, sem erradicação do parasita na maioria dos indivíduos tratados (SOAVE et al., 1990) citados por FERREIRA e BORGES (2002).

Estudos demonstraram a eficácia da azitromicina em pacientes portadores do vírus HIV que apresentavam sintomas clínicos de criptosporidiose (febre e diarreia). No quinto dia de tratamento, os indivíduos apresentaram melhora dos sintomas, e a ausência destes foi observada no sétimo dia, apesar de ainda estarem eliminando oocistos do protozoário e após 14 dias, 53,84% dos pacientes testados não eliminavam mais o protozoário. Apesar de bem tolerada em todos os pacientes e

de ter sido 100% eficaz contra os sintomas clínicos, a droga se mostrou incapaz de erradicar o parasita do organismo infectado (KADAPPU et al., 2002). Não existe portanto, nenhuma quimio ou imunoterapia disponível totalmente eficaz contra a criptosporidiose (HEIGES et al., 2006).

Devido à limitada disponibilidade de drogas e à pouca eficácia destas contra a criptosporidiose, medidas higiênico-sanitárias e um manejo adequado são as melhores formas de combate à doença (GRAAF et al., 1999).

Ainda não se sabe se a proteção vacinal contra a criptosporidiose seria eficaz (GRAAF et al., 1999), podendo não ser viável, já que a doença afeta primariamente indivíduos imuno-comprometidos ou com o sistema imune parcialmente desenvolvido (JENKINS, 2001).

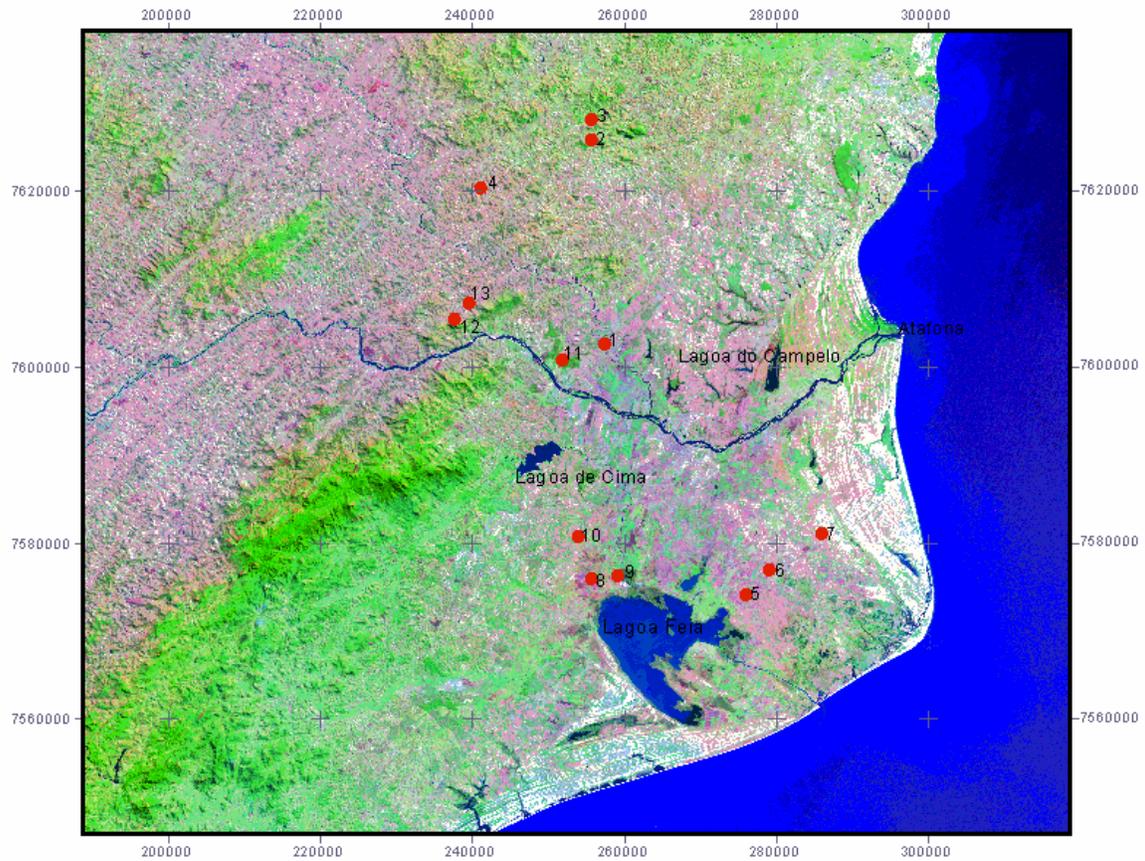
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de execução

Os locais de execução utilizados para as colheitas e para as análises laboratoriais foram os seguintes:

3.1.1. Para colheita do material fecal

Foram selecionadas por conveniência, 13 propriedades de bovinos de corte e leiteiros do Município de Campos dos Goytacazes localizadas na Região Norte Fluminense (Figura 1).



10000 0 10000 20000 Kilometers

Projeção UTM
Datum SAD69
Fuso 24
Satélite LANDSAT 7
Composição colorida R7G4B1



Figura 1: Localização aproximada das 13 propriedades da Microrregião de Campos dos Goytacazes - RJ utilizadas para a colheita do material fecal e entrevistas.



Figura 2: Propriedades de criação bovina no Município de Campos dos Goytacazes - RJ. Em A e B, propriedades familiares, e em C e D, pré-empresariais, segundo ASTUDILLO et al., (1990).

3.1.2. Propriedades

As propriedades selecionadas foram classificadas de acordo com o tipo de manejo e produção (Figura 2) em Familiar ou Pré-empresarial, de acordo com ASTUDILLO et al. (1990).

3.2. Questionário

Os proprietários e/ou responsáveis pelas propriedades foram entrevistados, através de questionários (Apêndice), com intuito de se avaliar o tipo de produção e criação, a taxa de natalidade, a mortalidade, o período de desmame, a produção leiteira, a ocorrência de diarreia, o nascimento de bezerros fracos ou doentes e a presença de enfermidades.

3.3. Colheita de fezes e processamento

Foram colhidas por conveniência, 100 amostras de fezes, utilizando-se sacos plásticos, diretamente da ampola retal de bezerros de até 12 meses de idade independente de sexo, idade ou raça, de propriedades rurais localizadas no Município de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro (Figura 1), no mês de outubro de 2005. As amostras foram identificadas individualmente e encaminhadas ao Setor de Doenças Parasitárias do Laboratório de Sanidade Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias para o isolamento dos oocistos e ao Núcleo de Análise Genômica para a extração do DNA e execução da PCR.

O material coletado foi processado no Setor de Doenças Parasitárias do Laboratório de Sanidade Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias e no Núcleo de Análise Genômica, pertencentes à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

3.4. Técnica de Ziehl-Neelsen modificada

1. Separou-se cerca de 1g de cada amostra para fixação em solução de formol a 10% em tubos cônicos de polipropileno de 15mL individualmente identificados para posterior fixação e coloração;
2. As amostras foram filtradas em camada dupla de gaze;
3. Cerca de 7 a 8mL de cada solução foi transferida para novos tubos cônicos de 15 mL;
4. Foram adicionados 4mL de éter etílico e esta solução foi homogeneizada em agitador de tubos;
5. Os tubos foram centrifugados a 500g por 10 minutos;
6. Todo o sobrenadante foi descartado;
7. Os esfregaços em lâminas foram feitos a partir dos sedimentos restantes, com o auxílio da parte romba de palitos de madeira, executando-se movimentos circulares;
8. As lâminas foram secas em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas;
9. Estas foram fixadas com metanol absoluto por cinco minutos, e deixadas secar, inclinadas, por 15 minutos em temperatura ambiente;
10. Foi colocada por sobre todas as lâminas, solução de fucsina, por cinco minutos;
11. As lâminas foram lavadas com álcool etílico a 50% e depois em água corrente;
12. Estas foram submersas em álcool ácido a 3% por algumas vezes e posteriormente, lavadas em água corrente;
13. Foi colocada solução de verde malaquita por sobre as lâminas por três minutos, estas foram novamente lavadas em água corrente, e secas à temperatura ambiente;
14. As lâminas coradas e secas foram montadas com cerca de duas gotas de bálsamo e lamínula;
15. Após secagem completa, as lâminas foram observadas em microscópio óptico, em objetiva de 100X (imersão).

3.5. Isolamento de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes

Para isolamento dos oocistos, as amostras foram processadas individualmente, como descrito a seguir:

1. Foram diluídos 15g de fezes em 50mL de água deionizada;
2. Esta solução foi filtrada em camada dupla de gaze e posteriormente em tamis com 325 malhas de aço por polegada;
3. O filtrado foi centrifugado em tubos cônicos de 50mL a 2500g por 10 minutos;
4. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspenso em água deionizada até alcançar um volume de 25mL;
5. Foram adicionados 25mL de solução de sacarose (1,1g/mL) e após agitação, esta solução foi centrifugada a 250g por 20 minutos;
6. Foram aspirados 4mL do sobrenadante e pipetados em tubos cônicos para centrífuga e adicionada água deionizada para que fosse obtido o volume final de 15mL;
7. Esta solução foi centrifugada a 2500g por 10 minutos e o sobrenadante, descartado;
8. O sedimento foi ressuspenso em 500 μ L de água destilada;
9. Uma gota foi examinada entre lâmina e lamínula, em microscopia para a análise morfométrica dos oocistos utilizando-se o microscópio óptico binocular com contraste de fase, marca "TIME-IN", modelo "TIM 108" e ocular micrométrica "K-15X-PZO" em objetiva de 100x.
10. O restante do material foi congelado para a extração do DNA.

3.6. Diagnóstico molecular para identificação de *Cryptosporidium parvum*

O método de diagnóstico molecular está descrito a seguir:

3.6.1. Extração do DNA

Para a realização da PCR, o DNA genômico dos oocistos foi extraído como a seguir:

1. Para a extração do DNA foram colocados 50µL da amostra concentrada em tubos de 1,5mL para microcentrífuga contendo 0,5mL de tampão. Foi adicionada 17µL de Proteinase K (100mg/mL) e adicionados aproximadamente 190µL de SDS a 10% (175 µL);
2. As amostras foram incubadas a 55⁰C por 12 horas sob agitação;
3. Foram adicionados 700µL de SEVAG (Fenol clorofórmio, álcool isoamílico) saturado em cada tubo, e então esta solução foi colocada em agitador por 10 minutos em temperatura ambiente;
4. As amostras foram centrifugadas a 12000g em microcentrífuga por 10 minutos;
5. O sobrenadante foi coletado e depositado em outro tubo de microcentrífuga. O restante do material foi descartado;
6. O sobrenadante foi então extraído com clorofórmio. Para isso foram adicionados 500µL de clorofórmio a cada amostra e esta solução foi homogeneizada;
7. Foram adicionados 100µL de acetato de sódio 3M, e posteriormente, 500µL de isopropanol;
8. As amostras foram armazenadas em gelo por 10-15 minutos e então centrifugadas a 12000g em microcentrífuga refrigerada por 20 minutos;
9. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1mL de etanol a 70% refrigerado;
10. As amostras foram centrifugadas a 12000g por 5 minutos;
11. O etanol a 70% foi descartado e o tubo, invertido por alguns segundos em papel absorvente;
12. Após a secagem completa das amostras em estufa, foram adicionados 50µL de água ultra pura.

3.6.2. Reação em cadeia da polimerase da subunidade 18S ribossomal

a) Foram utilizadas as seguintes seqüências de iniciadores para amplificação primária:

- 1 **CryptoF**: 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3'
- 2 **CryptoR**: 5' CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA 3'

b) Foram utilizadas as seguintes seqüências de iniciadores para amplificação secundária:

- 1 **AL1598**: 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3'
- 2 **AL3032**: 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3'

3.6.2.1. Amplificação:

O procedimento de amplificação foi realizado como a seguir:

a) Amplificação primária:

- 1 Tampão da polimerase (tampão PCR 10x);
- 2 MgCl₂ (3mM);
- 3 dNTP (0,2 mM);
- 4 Taq (1,5 U);
- 5 Iniciadores (50 pmol – volume final de 20 μ L).

b) Amplificação secundária:

- 1 Tampão da polimerase (tampão PCR 10x);
- 2 MgCl₂ (1,5mM);
- 3 dNTP (0,2 mM);
- 4 Taq (1,5 U);
- 5 Iniciadores (50 pmol – volume final de 20 μ L).

3.6.2.2. Programa utilizado no Termociclador (Marca MJ, modelo PTC 100):

a) Amplificação primária:

- 1 1 ciclo (94 °C por 3 minutos);
- 2 35 ciclos (94 °C, 45 segundos, 59 °C, 45 segundos, 72 °C, 1 minuto);
- 3 1 ciclo (72 °C por 7 minutos).

b) Amplificação secundária:

- 1 1 ciclo (94 °C por 1 minuto);
- 2 40 ciclos (94 °C, 30 segundos, 58 °C, 90 segundos, 72 °C, 2 minutos);
- 3 1 ciclo (72 °C por 7 minutos).

3.7. Análise Estatística

As medidas médias e os índices morfométricos dos oocistos foram submetidos à análise descritiva e as médias comparadas em relação à idade dos bezerros bovinos através do teste de Tukey e para verificar a associação entre as variáveis e os fatores de risco foram utilizados o teste estatístico do Qui-quadrado (χ^2) e o Teste de Fisher (Fisher Exact Test), com correção de Yates e intervalo de confiança de 95% utilizando-se o programa SAS (1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Diagnóstico

Foram identificados oocistos do gênero *Cryptosporidium* nas fezes de 61% dos bezerros bovinos examinados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Figura 3). Para as mesmas amostras no diagnóstico pela PCR (Figura 4), a prevalência foi para *C. parvum* de 45%.

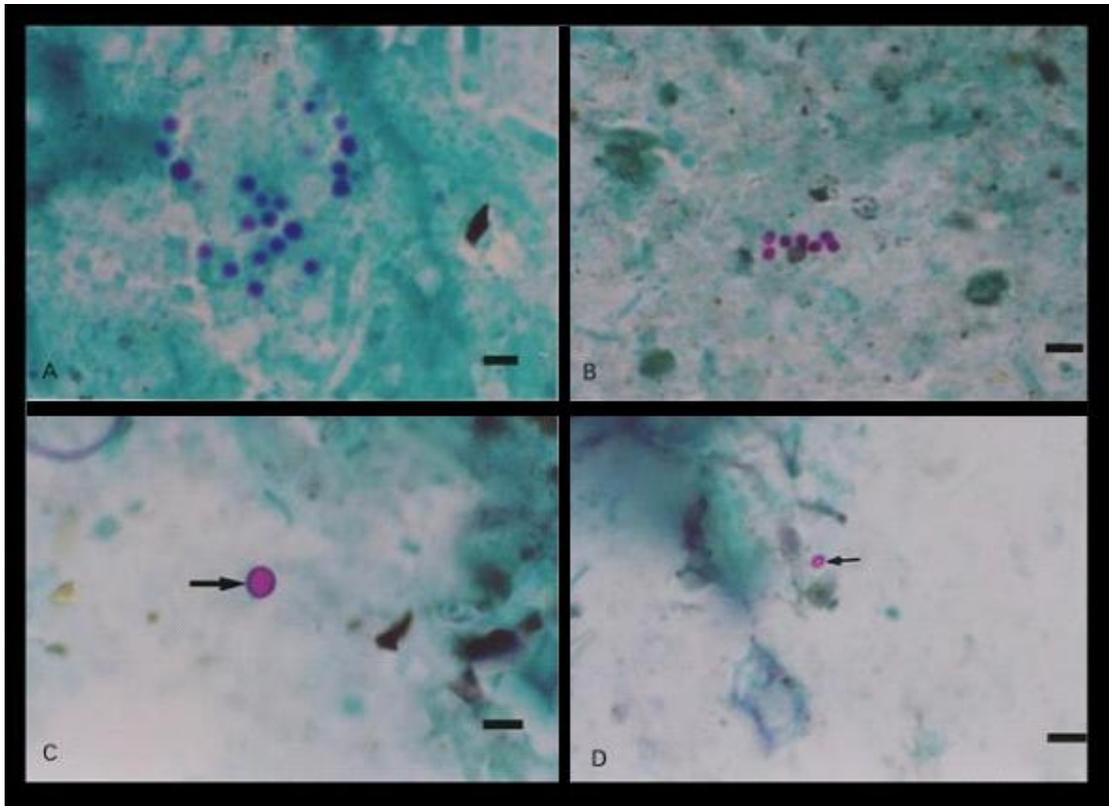


Figura 3: Oocistos do gênero *Cryptosporidium* observados em fezes de bezerros bovinos. Em A, bezerro com sintomas clínicos de diarreia, desidratação e apatia. Observar infecção mista caracterizada por oocistos de diferentes tamanhos. Em B, pequenos oocistos em fezes de bezerro em bom estado de saúde e sem sinais clínicos de criptosporidiose. Em C e D detalhe da parede dos oocistos. Técnica de Ziehl-Neelsen modificada (— = 5 μ m).

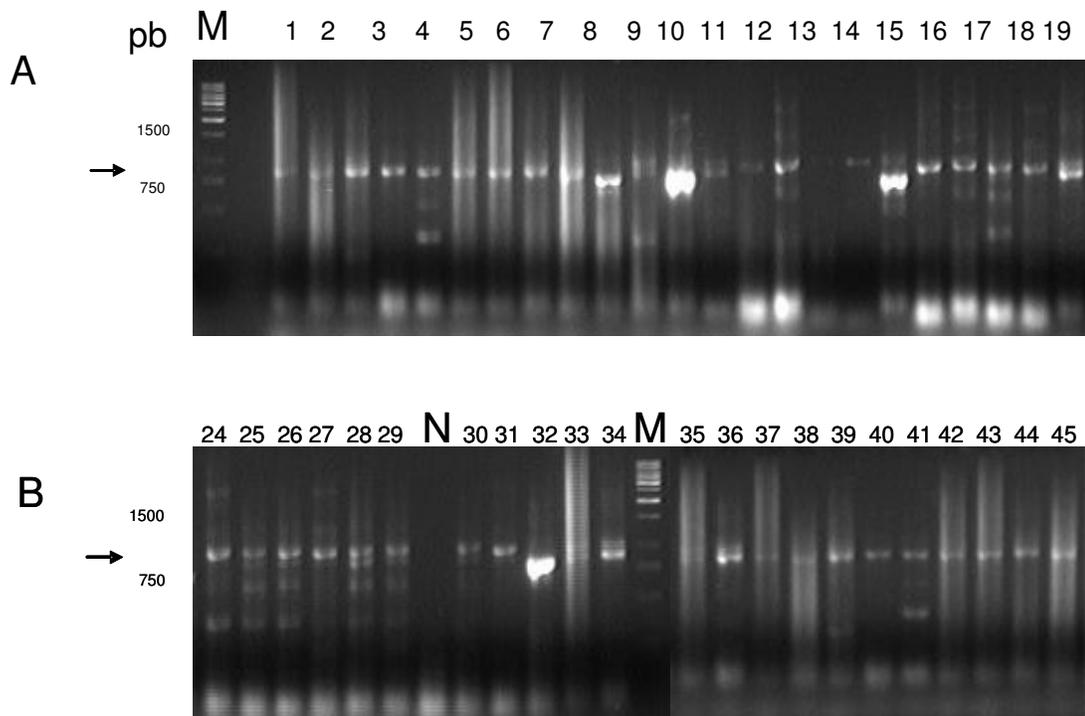


Figura 4: A e B: Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 2%; M: Marcador de peso molecular 1 Kb ladder; N: Controle negativo da reação; De 1 a 45: Amostras positivas para *C. parvum*; As setas indicam a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 850pb, condizente com o produto esperado.

A comparação dos métodos de diagnóstico colorimétrico (Ziehl-Neelsen) e molecular (PCR) utilizados neste trabalho de pesquisa, utilizando-se o teste estatístico do Qui-quadrado está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparação dos resultados das técnicas empregadas para o diagnóstico de *Cryptosporidium* em bezerros bovinos.

Resultado	Método de diagnóstico	
	Ziehl-Neelsen	PCR
Positivo	61	45
Negativo	39	55
Total	100	100

Teste χ^2 (p = 0,0336) Rr = 1,35. CI 95%: 1,03 < Rr < 1,77.

MAGI et al. (2006), na Itália, em uma pesquisa envolvendo as técnicas de microscopia e de PCR, também obtiveram diferença significativa entre ambas as técnicas, sendo os resultados positivos de 62,5% e de 12,5% respectivamente.

Tanto os resultados desta pesquisa, quanto os de MAGI et al. (2006), levam a hipótese da existência de mais de uma espécie do gênero *Cryptosporidium* circulante em bovinos, já que as técnicas que utilizam a microscopia não são capazes de diferenciar espécies deste gênero, acarretando em maior prevalência, ao contrário das técnicas biomoleculares, que são capazes de diagnosticar a presença de uma espécie específica, a partir dos iniciadores utilizados. Nestes casos, animais que não estavam parasitados pelo *C. parvum* foram considerados negativos, diminuindo a prevalência neste trabalho.

4.2.1. Morfometria

Os resultados das medidas do diâmetro maior (DM) e do diâmetro menor (dm) dos oocistos, assim como o índice morfométrico estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Medidas de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos observados em microscópio óptico de contraste de fase.

Medidas (µm)	Idade em meses					
	n	Até três	n	De 4 a 7	n	De 8 a 12
Diâmetro maior	65	4,49±0,69 ^a (6,10-3,20)	30	4,18±0,82 ^{ab} (7,90-3,10)	36	3,81±0,50 ^b (5,30-3,00)
Diâmetro menor	65	3,95±0,64 ^a (5,40-2,30)	30	3,73±0,51 ^a (5,20-3,10)	36	3,38±0,48 ^c (4,70-2,50)
Índice morfométrico	65	1,14±0,15 ^a (1,81-1,00)	30	1,11±0,11 ^a (1,52-1,00)	36	1,13±0,10 ^a (1,43-1,00)

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Valores entre parênteses são as medidas máximas e mínimas observadas.

Segundo PARK et al. (2006), as espécies *C. parvum* e *C. hominis* possuem formato esférico e medidas que variam entre 4 e 6µm. RAMIREZ et al. (2004), citam que parasitos do gênero *Cryptosporidium* apresentam medidas entre 3 e 6 µm de diâmetro. Em um estudo realizado com *C. andersoni*, ENEMARK et al. (2002), relataram que as medidas dos oocistos desta espécie variaram entre 7,3 (6,5-8,0) e 5,7 (5,0-7,0) µm.

O diâmetro maior encontrado teve como valor máximo 7,90µm e como valor mínimo, 3,00µm. Os valores próximos a 3,00µm, aliados ao índice morfométrico próximo de 1,00 são compatíveis com *C. parvum*, devido não somente ao tamanho, mas também ao formato esférico dos oocistos desta espécie. Por outro lado, os valores próximos a 7,00 µm com índices morfométricos distantes de 1,00 indicam a presença de outra espécie, já que estas medidas aliadas ao formato oval do oocisto são incompatíveis à espécie *C. parvum*. As medidas dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. evidenciam tamanhos e formatos variados, o que reforça a existência de mais de uma espécie de *Cryptosporidium* circulante nos bezerros bovinos utilizados neste trabalho.

4.2. Frequência de *Cryptosporidium* spp.

Os resultados do diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. através da técnica de Ziehl-Neelsen modificada em relação aos bezerros examinados e as respectivas propriedades, podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes de bezerros bovinos analisadas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada em animais criados no município de Campos dos Goytacazes-RJ.

Propriedade	Amostras		Total
	Positivo	Negativo	
01	01	06	07
02	01	-	01
03	08	03	11
04	02	05	07
05	03	04	07
06	04	05	09
07	03	03	06
08	06	02	08
09	07	02	09
10	04	03	07
11	06	02	08
12	09	-	09
13	07	04	11
Total	61	39	100

Em uma pesquisa desenvolvida na Austrália, BECHER et al. (2004), também verificaram positividade de 100% das propriedades analisadas para *Cryptosporidium* spp. Em Campos dos Goytacazes, um estudo revelou que em 96% das propriedades, protozoários deste gênero foram observados (EDERLI, 2003). Com relação à porcentagem de bezerros infectados (61% neste trabalho de pesquisa), este valor está de acordo com FERREIRA e BORGES (2002), que citam a existência de 60% de prevalência de infecção por parasitos deste gênero em países Latino-Americanos. Resultados com baixa prevalência em bezerros (19,5% e 19,7%) foram observados por GARCIA e LIMA (1994) em Minas Gerais, no Brasil e por QUÍLEZ et al. (1996) na Espanha. Estes resultados, no entanto, não são compatíveis nem mesmo em diagnósticos biomoleculares, como os deste trabalho de pesquisa, que obteve prevalência de 45% somente para a espécie *C. parvum*.

Prevalência de 82,54% foi observada por SOUZA e LOPES (1995), 82,54%, no Rio de Janeiro, que apesar de mais alta em relação aos 61% observados neste trabalho, parece estar dentro da realidade da região onde se verifica que fatores relacionados às características gerais das propriedades e condições de alojamento dos bezerros podem interferir nos resultados.

Os resultados do diagnóstico de *Cryptosporidium parvum* através da técnica de PCR em relação aos bezerros bovinos examinados e as respectivas propriedades podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Diagnóstico de *Cryptosporidium parvum* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em fezes de bezerros bovinos criados no município de Campos dos Goytacazes-RJ.

Propriedade	Amostras		Total
	Positivo	Negativo	
01	-	07	07
02	01	-	01
03	04	07	11
04	04	03	07
05	-	07	07
06	03	06	09
07	04	02	06
08	07	01	08
09	03	06	09
10	01	06	07
11	04	04	08
12	09	-	09
13	05	06	11
Total	45	55	100

Com relação à técnica de PCR, *C. parvum* foi diagnosticado em 84,61% das propriedades e em 45% dos bezerros bovinos examinados. Estes resultados corroboram com dados de FAYER et al. (2006), cujo índice de positividade foi de 92,85% nas propriedades e de 41% nos animais entre um e dois anos de idade em estudo conduzido nos EUA, bem como com os resultados de PARK et al. (2006), cuja positividade de *C. parvum* foi de 41,2% em bezerros bovinos em trabalho desenvolvido na Coreia.

A comparação dos resultados de ambas as técnicas de diagnóstico utilizadas segundo idade e sexo pode ser visualizada na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação dos resultados das Técnicas de coloração e Molecular no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em bezerros bovinos.

Parâmetros	Percentual de positividade		Valores de p ¹	
	Ziehl- Neelsen	PCR		
Idade	Até 3 meses	17	14	0,6960
	De 4 a 7 meses	20	13	0,2530
	De 8 a 12 meses	24	18	0,3854
Sexo	Macho	28	24	0,6287
	Fêmea	33	21	0,0798

¹Teste χ^2

4.2.1. *Cryptosporidium* spp. e *C. parvum* de acordo com diferentes faixas etárias

Com relação à idade dos bezerros, o índice de animais de até três meses de idade infectados por *Cryptosporidium* spp. (17%) foi semelhante aos resultados apresentados por QUÍLEZ et al. (1996), na Espanha, já que estes mesmos autores, relatam que 14% de bezerros na idade entre um e quatro meses de idade foram positivos para este parasito. Da mesma forma, GARCIA e LIMA (1994), apresentaram o percentual de 18% de infecção para animais desta mesma idade. Todavia, uma pesquisa realizada em São Paulo por ORTOLANI e SOARES (2003), os autores citam que 38% dos bezerros com idade de até três meses de idade analisados eliminaram oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes, estando estes dados muito distantes dos apresentados na tabela anterior e observados nesta pesquisa.

HUETINK et al. (2001), na Holanda, apresentaram dados pouco semelhantes em análise microscópica de oocistos de *Cryptosporidium*, já que citam a positividade de aproximadamente 13% e 10,4% em animais de quatro a sete, e de oito a doze meses de idade, respectivamente. Por outro lado, estes mesmos autores relatam 18% de positividade em animais de até três meses de idade, concordando assim com os dados desta pesquisa.

A taxa de bezerros bovinos infectados por espécies do gênero *Cryptosporidium* aumentou proporcionalmente com a idade dos animais, fato que discorda dos relatos apresentados por MOHAMMED et al. (1999). No entanto, em pesquisa desenvolvida nos EUA, FAYER et al. (2006), citam que 12% de bezerros com idade de 12 meses estavam infectados por *C. parvum*, corroborando com os resultados desta pesquisa.

4.2.2. *Cryptosporidium* spp. e *C. parvum* de acordo com sexo

Não foram encontradas diferenças significativas entre os sexos dos animais e a positividade para *Cryptosporidium* spp. e *C. parvum* em ambas as técnicas utilizadas, demonstrando que nesta pesquisa, o sexo não exerceu influência sobre o índice de infecção por protozoários deste gênero e por *C. parvum*, estando de acordo com MULLER (1999), que cita que a infecção por *Cryptosporidium* ocorre em indivíduos independentemente do sexo. Em um trabalho envolvendo infecção experimental em camundongos, TARAZONA et al. (1998), não encontraram diferença significativa para a infecção por *Cryptosporidium* entre os sexos nesta espécie de mamífero. Em uma pesquisa desenvolvida na Cidade de São Paulo, também não existiu diferença significativa entre sexos de cães naturalmente infectados por *Cryptosporidium* (LALLO e BONDAN, 2006).

4.3. Fatores de risco relacionados ao ambiente

Com base nas respostas do questionário feito aos proprietários e/ou funcionários das propriedades e nas observações realizadas durante as visitas, pode-se verificar os fatores de risco de infecção por *Cryptosporidium* relacionados aos parâmetros descritos a seguir:

4.3.1. Tamanho das propriedades

Os tamanhos das propriedades utilizadas para este trabalho de pesquisa, relacionados à positividade dos bezerros para *Criptosporidium parvum* e para o gênero *Cryptosporidium* podem ser observados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação ao tamanho das propriedades visitadas.

Resultado ¹	Hectares		Total
	Até 100	Acima de 100	
Positivo	21	21	42
Negativo	35	14	49
Total	56	35	91

¹Diagnóstico por PCR

Teste χ^2 ($p = 0,0603$). Rr = 0,70. CI 95%: 0,49 < Rr < 0,99

Tabela 7 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao tamanho das propriedades visitadas.

Resultado ¹	Hectares		Total
	Até 100	Acima de 100	
Positivo	27	27	54
Negativo	29	08	37
Total	56	35	91

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Fisher's Exact Test (p = 0,084) Rr = 0,63. IC 95%: 0,46 > Rr > 0,87.

Com relação ao tamanho das propriedades, não houve diferença estatística significativa entre a positividade pela técnica da PCR, demonstrando que a espécie *C. parvum* esteve presente nos animais independente do tamanho das propriedades. Por outro lado, quando a técnica de Ziehl-Neelsen foi analisada estatisticamente em relação ao tamanho das fazendas, a diferença significativa esteve presente, onde propriedades com mais de 100 hectares apresentaram maior índice de positividade para o gênero *Cryptosporidium*, o que está de acordo com CAUSAPÉ et al. (2002), que relatam que houve maior risco de infecção por *Cryptosporidium* spp. em fazendas de maior tamanho. Os dados do presente trabalho concordam parcialmente com ALBUQUERQUE (2004), que associando o tamanho de propriedades soropositivas para IgG anti-*Toxoplasma gondii*, relatou que propriedades pequenas (menores que 50 hectares) também apresentaram menor soroprevalência. Todavia, as propriedades intermediárias (entre 50 e 100) hectares foram as que apresentaram mais animais positivos. Porém, o resultado esperado seria maior positividade em propriedades menores pelo fato da aglomeração aumentar a chance de se infectarem com oocistos. A contaminação ambiental por oocistos pode explicar estes resultados, principalmente para o gênero *Cryptosporidium*, que não é hospedeiro específico. Uma análise mais detalhada desta contaminação, principalmente levando-se em consideração as fontes de água será discutida a seguir.

4.3.2. Fonte de água

O risco relativo de infecção comparado às diferentes fontes de água utilizadas para os animais é descrito nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação à fonte de água.

Resultado ¹	Fonte de água		Total
	Água corrente	Água parada	
Positivo	37	05	42
Negativo	38	11	49
Total	56	35	91

¹Diagnóstico por PCR

Fisher's Exact Test (p = 0,2703) Rr = 1,13. IC 95%: 0,94 > Rr < 1,37.

Tabela 9 - Risco relativo da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à fonte de água.

Resultado ¹	Fonte de água		Total
	Água corrente	Água parada	
Positivo	46	08	54
Negativo	29	08	37
Total	75	16	91

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Fisher's Exact Test (p = 0,4160) Rr = 1,08. CI 95%: 0,88 < Rr < 1,33.

Oocistos de *Cryptosporidium* podem permanecer viáveis na água por mais de 140 dias. Nos EUA, existem relatos de contaminação por oocistos em cerca de 90% das águas superficiais, como rios e lagos (SIMMONS III et al., 2001; LUNA et al., 2002), assim como existem diversos relatos de presença de oocistos do gênero *Cryptosporidium* em águas de rio e nascentes no Japão (TSUSHIMA et al., 2001 e HU, 2002 citados por WATANABE et al., 2005), Taiwan (WATANABE et al., 2005), Brasil (FARIAS et al., 2002), entre outros.

Através da análise das Tabelas 8 e 9, pode-se observar que não houve diferenças significativas entre positividade para *Cryptosporidium* sp e *C. parvum* e as diferentes fontes de água (corrente e parada) existentes nas fazendas. Este dado leva a hipótese de haver contaminação em ambos os tipos de fontes de água por este parasito. Em pesquisa desenvolvida no Canadá, bezerros cuja principal fonte de água provém de poço estão associados com menores concentrações de oocistos eliminados nas fezes, ao contrário de animais com acesso a fontes de água parada como água de lagoas (HEITMAN et al., 2002).

4.3.3. Estábulos

A comparação entre diferentes materiais utilizados para a construção dos alojamentos dos bezerros e o risco de infecção por *Cryptosporidium parvum* e por *Cryptosporidium* spp. estão evidenciados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação ao tipo de construção do estábulo.

Resultado ¹	Material		Total
	Alvenaria	Madeira	
Positivo	33	12	45
Negativo	33	22	55
Total	66	34	100

¹Diagnóstico por PCR

Teste χ^2 ($p = 0,2348$) Rr = 1,22. CI 95%: 0,92 < Rr < 1,61.

Tabela 11 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao tipo de construção do estábulo.

Resultado ¹	Material		Total
	Alvenaria	Madeira	
Positivo	43	18	61
Negativo	23	16	39
Total	66	34	100

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Teste χ^2 ($p = 0,3323$) Rr = 1,19. CI 95%: 0,87 < Rr < 1,62.

Em ambas as técnicas não houve diferença significativa entre a utilização de madeira ou alvenaria para a construção dos alojamentos dos animais, corroborando com os achados de SANTÍN et al. (2004), que citam que o tipo de construção utilizada para abrigar bezerros não exerceu influência para a prevalência de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* sp. nestes animais. Entretanto, MOHAMMED et al. (1999), relatam que bezerros recém-nascidos criados em alojamentos de concreto possuíram três vezes menos chances de estarem infectados, em comparação aos animais alojados em locais construídos com outros tipos de material. Apesar da

discordância entre os resultados dos diferentes trabalhos, é importante salientar que não houve análise de material proveniente de animais neonatos nesta pesquisa, ao contrário do trabalho de MOHAMMED et al. (1999). Portanto, pode-se sugerir que a utilização de madeira ou alvenaria nas baias pode ser um fator de risco para a criptosporidiose em animais neonatos, mas o mesmo parece não ocorrer em bezerros bovinos com mais de um mês de idade.

4.4. Fatores de risco relacionados ao manejo

Os fatores de risco para a infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* e espécie *C. parvum* relacionados ao manejo recebido pelos animais estão descritos a seguir.

4.4.1. Sistema de criação

O risco relativo da infecção por *Cryptosporidium* relacionado aos diferentes sistemas de criação está evidenciados nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de criação.

Resultado ¹	Criação		Total
	Extensiva	Semi-intensiva	
Positivo	28	14	42
Negativo	34	15	49
Total	62	29	91

¹Diagnóstico por PCR

Teste χ^2 ($p = 0.9585$) Rr = 0,96. CI 95%: 0,72 < Rr < 1,27.

Tabela 13 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de criação.

Resultado ¹	Sistema de criação		Total
	Extensiva	Semi-intensiva	
Positivo	35	19	54
Negativo	27	10	37
Total	62	29	91

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Fisher's Exact Test (p = 0,4950) Rr = 0,88. CI 95%: 0,67 < Rr < 1,17.

Em estudo conduzido nos EUA, MOHAMMED et al. (1999) relatam que bezerros criados no exterior possuíram cinco vezes menos chances de infecção por *Cryptosporidium* do que aqueles criados em confinamento. Em contrapartida, CASTRO-HERMIDA et al. (2002), não encontraram efeitos significativos para a infecção por *C. parvum* em animais criados em regime intensivo e semi-intensivo. Através dos dados apresentados nas tabelas 12 e 13, pode-se observar que não houve diferença significativa entre os sistemas de criações extensivo e semi-intensivo, não havendo propriedade que utilizasse o sistema intensivo para a criação dos animais no presente estudo. GARCIA e LIMA (1994), também relatam que não houve efeito significativo entre diferentes sistemas de criação e positividade para *Cryptosporidium* spp. em estudo conduzido em Minas Gerais. Portanto, o trabalho de MOHAMMED et al. (1999), demonstrou que os locais de confinamento podem ser uma fonte importante de manutenção do parasito, uma vez que a ventilação e os raios solares geralmente são restritos nestes casos. Este fato não pôde ser analisado neste trabalho devido à ausência de confinamento nas propriedades visitadas.

4.4.2. Sistema de produção

Com relação aos diferentes sistemas de produção, os fatores de risco para a contaminação dos bezerros por *Cryptosporidium* spp. e *C. parvum* estão descritos nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de produção.

Resultado ²	Sistema de produção ¹		Total
	Familiar	Pré-empresarial	
Positivo	15	27	42
Negativo	34	15	49
Total	49	42	91

¹De acordo com ASTUDILLO et al. (1990).

²Diagnóstico por PCR

Teste χ^2 ($p = 0,0027$) Rr = 0,51. CI 95%: 0,32 < Rr < 0,80.

Tabela 15 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de produção.

Resultado ²	Sistema de produção ¹		Total
	Familiar	Pré-empresarial	
Positivo	24	30	54
Negativo	25	12	37
Total	49	42	91

¹De acordo com ASTUDILLO et al. (1990).

²Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Teste χ^2 ($p = 0,0501$) Rr = 0,65. CI 95%: 0,45 < Rr < 0,95.

Através da análise da Tabela 14, constata-se, surpreendentemente, maior positividade por *C. parvum* em bezerros situados em sistema de criação pré-empresarial em relação aos animais criados em sistema de produção familiar. No caso de *Cryptosporidium* spp. (Tabela 15), não houve diferença significativa entre estes parâmetros, apesar de ter existido uma maior tendência em relação à positividade em animais criados em sistema de produção pré-empresarial. Em pesquisa realizada no Estado de São Paulo, FEITOSA et al. (2004), também relatam que animais criados em propriedades com melhores condições de manejo foram mais propícios à infecção por este protozoário do que bezerros criados em condições de manejo precárias. Estes dados podem sugerir que os sistemas classificados como empresarial e pré-empresarial tenham métodos de manejo que exigem demais dos animais, os quais provavelmente chegam ao limite fisiológico de produção, o que corrobora com WOUDA et al. (1999). Este fator pode acarretar estresse metabólico e maior eliminação dos oocistos por animais adultos, e conseqüente contaminação dos bezerros.

4.4.3. Ordenha

Bezerros criados em propriedades com ordenha mecanizada apresentaram maior probabilidade de infecção por *Cryptosporidium* spp. e por *C. parvum* (Tabelas 16 e 17), corroborando com os resultados de MUNHOZ (2004), que trabalhando com diagnóstico de *Neospora caninum* em vacas, obteve maior probabilidade de infecção em animais ordenhados mecanicamente, provavelmente devido ao maior esgotamento fisiológico e estresse sofridos pelas vacas ordenhadas por este método, as quais poderiam estar eliminando maiores quantidades de oocistos por estes motivos e conseqüentemente, se tornando fontes de infecção mais importantes do que aquelas ordenhadas manualmente.

Tabela 16 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de ordenha.

Resultado ¹	Ordenha		Total
	Manual	Mecanizada	
Positivo	16	26	42
Negativo	40	09	49
Total	56	35	91

¹Diagnóstico por PCR

Fisher's Exact Test ($p < 0,0001$) Rr = 0,46. CI 95%: 0,31 < Rr < 0,70.

Tabela 17 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao sistema de ordenha.

Resultado ¹	Ordenha		Total
	Manual	Mecanizada	
Positivo	28	26	54
Negativo	28	09	37
Total	56	35	91

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Fisher's Exact Test ($p = 0,0285$) Rr = 0,68. CI 95%: 0,49 < Rr < 0,93.

4.4.4. Resfriamento de leite

Através da análise das Tabelas 18 e 19, pode-se observar que o índice de bezerros positivos para *Cryptosporidium* spp. e para *C. parvum* foi significativamente maior em propriedades que possuem sistema de refrigeração de leite em comparação àquelas que não possuem tal sistema, de acordo com os achados de FEITOSA et al. (2004). Estes dados acompanham os resultados apresentados nas Tabelas 14, 15, 16 e 17 do presente trabalho, as quais evidenciam que, quanto mais tecnicizadas as propriedades, maior a probabilidade de infecção por este parasito, reforçando a hipótese de queda imunológica devido a maior exigência dos animais em sistemas de criação pré-empresariais em relação ao manejo empregado nas criações familiares.

Tabela 18 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação à prática de resfriamento de leite.

Resultado ¹	Refrigeração		Total
	Sim	Não	
Positivo	25	13	38
Negativo	09	33	42
Total	34	46	80

¹Diagnóstico por PCR

Fisher's Exact Test ($p < 0,001$) Rr = 3,07. CI 95%: 1,16 < Rr < 5,72.

Tabela 19 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à prática de resfriamento de leite.

Resultado ¹	Refrigeração		Total
	Sim	Não	
Positivo	25	21	46
Negativo	09	25	34
Total	34	46	80

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Fisher's Exact Test ($p = 0,0215$). Rr = 2,05. CI 95%: 1,10 < Rr < 3,81.

4.4.5. Presença de veterinário responsável pela propriedade

As Tabelas 20 e 21 demonstram que a assistência médica veterinária às propriedades não exerceu efeito significativo na infecção por *Cryptosporidium* spp. e por *C. parvum*, fato que comprova a resistência e a facilidade que o parasito tem em se manter circulante nos animais mesmo possuindo assistência técnica especializada e com esforços para a manutenção das condições de manejo e tecnificação. Estes resultados corroboram com as citações de MAINAR-JAIME e VÁZQUEZ-BOLAND (1999), quando analisaram a presença de assistência veterinária comparada positividade para o vírus da Doença da Fronteira em ovinos. Entretanto, estes resultados se contrapõem aos de KABAGAMBE et al. (2001), em estudo que analisou a presença de cuidados veterinários à positividade sorológica para *Brucella melitensis* em bovinos.

Tabela 20 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação à assistência veterinária.

Resultado ¹	Assistência veterinária		Total
	Sim	Não	
Positivo	30	05	35
Negativo	39	09	48
Total	69	14	83

¹Diagnóstico por PCR

Fisher's Exact Test (p = 0,7684) Rr = 1,05. CI 95%: 0,87 < Rr < 1,27.

Tabela 21 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à assistência veterinária.

Resultado ¹	Assistência veterinária		Total
	Sim	Não	
Positivo	41	07	48
Negativo	28	07	35
Total	69	14	83

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Fisher's Exact Test (p = 0,5626) Rr = 1,06. CI 95%: 0,87 < Rr < 1,30.

4.4.6. Produtividade

A eficiência da produtividade leiteira das propriedades relacionada à frequência de animais infectados por *Cryptosporidium parvum* e por *Cryptosporidium* spp. está descrita nas Tabelas 22 e 23, respectivamente.

Tabela 22 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação à média de produção leiteira por animal.

Resultado ¹	Produção em kg/dia		Total
	Até 10	Acima de 10	
Positivo	39	06	45
Negativo	49	06	55
Total	88	12	100

¹Diagnóstico por PCR

Fisher's Exact Test (p = 0,7640) Rr = 0,97. CI 95%: 0,83 < Rr < 1,12.

Tabela 23 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à média de produção leiteira por animal.

Resultado ¹	Produção em kg/dia		Total
	Até 10	Acima de 10	
Positivo	53	08	61
Negativo	35	04	39
Total	88	12	100

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Fisher's Exact Test (p = 0,7609) Rr = 0,96. CI 95%: 0,83 < Rr < 1,11.

A produção leiteira não foi influenciada pela positividade para *C. parvum* e para *Cryptosporidium* spp. utilizando-se ambas as técnicas. Neste caso, observa-se um resultado não condizente com os resultados previamente descritos, uma vez que o esperado seria a maior probabilidade de positividade em fazendas tecnificadas, portanto, que possuem maior produtividade leiteira. ESTEBAN e ANDERSON (1995), em pesquisa com *C. muris* e MUNHOZ (2004), com *Neospora caninum*, ambos em vacas, relatam que animais considerados positivos para tais parasitos produziam significativamente menos leite do que os animais que foram negativos em suas pesquisas. Importante salientar que a criptosporidiose em animais adultos

geralmente é subclínica. No caso do presente estudo, não houve correlação entre a positividade dos bezerros bovinos e a capacidade fisiológica de produção de leite dos adultos.

4.4.7. Contato com outras espécies de animais

O contato direto com diferentes espécies de animais não pôde ser analisado estatisticamente pelo fato de 100% das propriedades possuírem outras espécies de animais em contato direto com os bovinos. O mesmo fato ocorreu com CASTRO-HERMIDA et al. (2002). Algumas das propriedades deste trabalho cujo contato com outras espécies de mamíferos foi evidente podem ser visualizadas na Figura 5.



Figura 5- Presença de diferentes espécies de animais convivendo nos locais de criação dos bezerros bovinos. Em A, note-se a proximidade do canino ao balde e aos latões de armazenamento de leite. Em B, note-se a presença da ave em contato direto com os bovinos.

Segundo MOHAMMED et al. (1999), a criação de outras espécies de animais na propriedade se constitui como um fator de risco para a contaminação dos bezerros por *Cryptosporidium*. Essa associação pode ser explicada pelo fato do gênero *Cryptosporidium* ser capaz de infectar uma grande variedade de mamíferos, os quais podem ser transmissores potenciais do parasito aos bezerros bovinos.

4.5. Fatores de risco relacionados ao manejo dos animais

A avaliação dos fatores de risco de contaminação por *Cryptosporidium* spp. e por *C. parvum* relacionados aos diferentes sistemas de manejo praticados pelas propriedades está descrita a seguir.

4.5.1. Tratamento

Os fatores de risco de infecção por *C. parvum* e por *Cryptosporidium* spp. podem ser observados nas Tabelas 24 e 25, respectivamente.

Tabela 24 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação ao tratamento dos animais.

Resultado ¹	Tratamento		Total
	Bom	Ruim	
Positivo	19	23	42
Negativo	14	35	49
Total	33	58	91

¹Diagnóstico por PCR
Teste χ^2 ($p = 0,1527$). Rr = 1,58. CI 95%: 0,90 < Rr < 2,75.

Tabela 25 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação ao tratamento dos animais.

Resultado ¹	Tratamento		Total
	Bom	Ruim	
Positivo	23	31	54
Negativo	10	27	37
Total	33	58	91

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado
Fisher's Exact Test ($p = 0,1829$) Rr = 1,57. CI 95%: 0,85 < Rr < 2,91.

O tratamento dos animais foi avaliado levando-se em consideração as atitudes dos tratadores para com os mesmos, superpopulação de animais, e também o estado de conservação e limpeza dos alojamentos, fatores que podem levar ao

estresse e, por conseqüência, à queda imunológica dos bezerros. SISCHO et al. (2000) relatam que o estresse, as diferentes condições do ambiente em que vivem os animais e a superpopulação podem aumentar a incidência da criptosporidiose em bezerros. Segundo as Tabelas 24 e 25, a diferença do tratamento recebido pelos bezerros não influenciou a infecção dos animais pelo parasito, o que não significa que o tratamento bom ou ruim possa influenciar no desenvolvimento de sintomas clínicos de criptosporidiose, já que neste trabalho não foram avaliados sintomas clínicos.

4.5.2. Bebedouros

Os fatores de risco relacionados à presença ou não de bebedouros disponíveis para os bezerros nas propriedades visitadas e a positividade dos animais podem ser visualizados nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação à presença de reservatório de água.

Resultado ¹	Bebedouro		Total
	Sim	Não	
Positivo	33	09	42
Negativo	19	30	49
Total	52	39	91

¹Diagnóstico por PCR

Fisher's Exact Test ($p = 0,0001$) Rr = 2,02. CI 95%: 1,37 < Rr < 2,98.

Tabela 27 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação à presença de reservatório de água.

Resultado ¹	Bebedouro		Total
	Sim	Não	
Positivo	36	18	54
Negativo	16	21	37
Total	52	39	91

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Teste χ^2 ($p = 0,027$). Rr = 1,54. CI 95%: 1,01 > Rr < 2,33.

Através da análise das Tabelas 26 e 27, observa-se que a presença de reservatório artificial de água disponível para os animais foi um fator de risco significativo para a positividade para *Cryptosporidium* em fezes de bezerros mediante as duas técnicas de diagnóstico utilizadas neste trabalho. MUNHOZ (2004), encontrou a mesma diferença quando associou a presença de bebedouro à infecção por *N. caninum* em bovinos. Uma consideração importante é que o bebedouro pode estar sendo um reservatório de oocistos, que permaneceriam viáveis por um longo período. Os reservatórios de água podem estar recebendo contaminação fecal e inclusive nasal com oocistos deste protozoário.

4.5.3. Higiene

A comparação entre a positividade para parasitos da espécie *C. parvum* e do gênero *Cryptosporidium* e as condições de higiene das propriedades está descrita nas Tabelas 28 e 29.

Tabela 28 - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerros bovinos em relação às condições sanitárias.

Resultado ¹	Higiene		Total
	Boa	Ruim	
Positivo	16	29	45
Negativo	26	29	55
Total	42	58	100

¹Diagnóstico por PCR

Teste χ^2 ($p = 0,3284$). Rr = 0,75. CI 95%: 0,46 < Rr < 1,21.

Tabela 29 - Risco relativo da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos em relação às condições sanitárias.

Resultado ¹	Higiene		Total
	Boa	Ruim	
Positivo	41	20	61
Negativo	19	20	39
Total	60	40	100

¹Diagnóstico por Ziehl-Neelsen modificado

Teste χ^2 ($p = 0,1026$). Rr = 1,38. CI 95%: 0,95 < Rr < 1,99.

Observando-se as Tabelas 28 e 29, pode-se notar que não houve diferenças significativas entre criações com condições de higiene consideradas boas e em outras cujas condições de higiene foram consideradas ruins. Dentre as 13 propriedades visitadas, nenhuma apresentou excelentes condições de higiene. Da mesma maneira, MALDONADO-CAMARGO et al. (1998), no México, não observaram diferenças significativas entre a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e as práticas higiênicas tais como: lavagem, troca das camas e medidas de desinfecção dos alojamentos no momento da troca de bezerras, assim como MADDOX-HYTTEL et al. (2006), não encontraram diferenças significativas entre maternidades de suínos que utilizavam medidas de higiene tais como utilização de jatos de água de alta pressão, desinfetantes e secagem das baias e maternidades que não utilizavam tais práticas. Curiosamente, observa-se, portanto que, provavelmente, a higiene dos alojamentos não tenha exercido influência na infecção de animais por protozoários do gênero *Cryptosporidium* nestes trabalhos.

Por outro lado, no trabalho de MOHAMMED et al. (1999), desenvolvido nos EUA, condições boas de higiene das baias diminuíram o risco de infecção de *Cryptosporidium* spp. em bezerras neonatos. Logo, bovinos recém-nascidos, diferentemente de suínos neonatos, parecem ser mais susceptíveis à infecção estando em ambientes pouco higiênicos do que animais com idades superiores a um mês de vida que são criados em baias pouco higiênicas. Da mesma forma, SOUZA e LOPES (1995), relatam que condições zoonosológicas inadequadas foram relacionadas à presença desta protozoose em bezerras em estudo realizado no Rio de Janeiro, porém, neste último trabalho, não foi avaliada diferença estatística entre animais neonatos positivos para *Cryptosporidium* em relação às condições de higiene das propriedades.

5. CONCLUSÕES

1. Existe uma ampla positividade para protozoários do gênero *Cryptosporidium* e da espécie *C. parvum* em bezerros bovinos criados no Município de Campos dos Goytacazes, RJ;
2. O maior índice de animais positivos para *Cryptosporidium* spp. em relação ao número de animais positivos para a espécie *C. parvum* e os resultados da morfometria dos oocistos indicam a possível existência de mais de uma espécie além de *C. parvum*, entre os bezerros examinados e
3. Bezerros bovinos criados em propriedades tecnificadas que utilizam ordenha mecânica, resfriamento de leite e reservatórios de água apresentaram maior risco de infecção do que aquelas fazendas cujo sistema de produção foi classificado como familiar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, N., SAWANO, Y., YAMADA, K., KIMATA, I., ISEKI, M. (2002) *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, *Japanese Veterinary Parasitology* 108: 185-193.
- ABRAHAMSEN, M.S., TEMPLETON, T.J., ENOMOTO, S., ABRAHANTE, J.E., ZHU, G., LANCTO, C.A., DENG, M., LIU, C., WIDMER, G., TZIPORI, S., BUCK, G.A., XU, P., BANKIER, A.T., DEAR, P.H., KONFORTOV, B.A., SPRIGGS, H.F., LYER, L., ANANTHARAMAN, V., ARAVIND, L., KAPUR, V. (2004) Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 441-445.
- ALBUQUERQUE, G.R. (2004) *Uma análise da toxoplasmose nos rebanhos leiteiros dos Municípios de Resende e Rio Claro, bacia leiteira, Estado do Rio de Janeiro*. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, 76p.
- ANDERSON, B.C., BULGIN, M.S. (1981) Enteritis caused by *Cryptosporidium* in calves. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician*. 865-868.
- ARES-MAZÁS, M.E., PONTE, B.F., VERGARA-CASTIBLANCO, C.A., FREIRE-SANTOS, F., QUÍLEZ-CINCA, J., CAUSAPÉ-VALENZUELA, A.C., SÁNCHEZ-ACEDO, C. (1999) Oocysts, IgG levels and immunoblot patterns determined for *Cryptosporidium parvum* in bovine examined during a visit to a farm (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, 81: 185-193.

- ASTUDILLO, V.; ROSENBERG, F. J.; ZOTTELE, A.; OLASCOAGA, R. C. (1990) Considerações sobre a saúde animal na América Latina. *A Hora Veterinária*, 54: 37-43.
- BANKIER, A.T., SPRIGGS, H.F., FARTMANN, B., KONFORTOV, B.A., MADERA, M., VOGEL, C., TEICHMANN, S.A., IVENS, A., DEAR, P.H. (2003) Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Genome research*, 14: 327.
- BAXBY, D., BLUNDELL, N., HART, C.A. (1984) The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *The journal of hygiene*, 93: 317-323.
- BECHER, K.A., ROBERTSON, I.D., FRASER, D.M., PALMER, D.G., THOMPSON, R.C.A. (2004) Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Veterinary Parasitology*, 123: 1-9.
- BLUNT, D.S., KHRAMTSOV, N.V., UPTON, S.J., MONTELONE, B.A. (1997) Molecular karyotype analysis of *Cryptosporidium parvum*: evidence for eight chromosomes and a low-molecular-size molecule. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 4: 11-13.
- BRAZ, L.M.A., NETO, V.A., FERRARI, C.I.L., PALHARES, M.C.A., AMATO, V.S., SANTOS, M.T.F., MARQUES, H.H.S., VALLADA, M., NAKANISHI, L.S.S., JÚNIOR, H.F.A. (1996) Human cryptosporidiosis: detection of specific antibodies in the serum by an indirect immunofluorescence. *Revista de Saúde Pública*, 30: 395-402.
- CACCIÒ, S.M., THOMPSON, R.C., McLAUCHLIN, J., SMITH, H.V. (2005) Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in parasitology*, 21: 430-437.
- CAPUANO, D.M., OKINO, M.H.T., BETTINI, M.J.C.B. (2001) Frequência de *Cryptosporidium* spp. e *Isospora belli* em pacientes soropositivos para o HIV na Região de Ribeirão Preto, SP/Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 60: 11-15.

- CASTRO-HERMIDA, J.A., GONZÁLEZ-LOSADA, Y.A., ARES-MAZÁS, E. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 106: 1-10.
- CAUSAPÉ, A.C., QUÍLEZ, J., SÁNCHEZ-ACEDO, C., DEL CACHO, E., LÓPEZ-BERNARD, F. (2002) Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeasten Spain), *Veterinary Parasitology*, 104: 287- 298.
- CAUSER, L.M., HANDZEL, T., WELCH, P., CARR, M., CULP, D., LUCHT, R., MUDAHAR, K., ROBINSON, D., NEAVEAR, E., FENTON, S., ROSE, C., CRAIG, L., ARROWOOD, M., WAHLQUIST, S., XIAO, L., LEE, Y.M., MIREL, L., LEVY, D., BEACH, M.J., POQUETTE, G., DWORKIN, M.S. (2005) An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. *Epidemiology and Infection*, 000:1-10.
- DeCARLI, G.A.D. (1994) *Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas – Métodos e Técnicas*. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 313p.
- DUBEY, J.P. e FAYER, R. (1982) Sarcocystosis, Toxoplasmosis and Cryptosporidiosis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2: 293-298.
- EDERLI, B.B. (2003) Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros da Microrregião de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, 1: 271-272.
- ENEMARK, H.L., AHRENS, P., LOWERY, C.J., THAMSBORG, S.M., ENEMARK, J.M.D., BILLE-HANSEN, V., LIND, P. (2002) *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterization. *Veterinary Parasitology*, 107: 37-49.
- ENEMARK, H.L., BILLE-HANSEN, V., LIND, P., HEEGAARD, P.M.H., VIGRE, H., AHRENS, P., THAMSBORG, S.M. (2003) Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum*-evaluation of an animal infection model. *Veterinary Parasitology*, 113: 35-57.

- ENTRALA, E., SBIHI, Y., SÁNCHEZ-MORENO, M., MASCARÓ, C. (2001) Antigen incorporation on *Cryptosporidium parvum* oocyst walls. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 233-235.
- ESTEBAN, E.; ANDERSON, B.C. (1995) *Cryptosporidium muris*: Prevalence, persistence and detrimental effect on milk production in drylot dairy. *Journal of Dairy Science*, 78: 1068-1072.
- FARIAS, E.W.C., GAMBA, R.C., PELLIZARI, V.H. (2002) Detection of *Cryptosporidium* in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 41-43.
- 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. *International Journal for Parasitology*, 28: 49-56.
- FAYER, R., MORGAN, U., UPTON, S.J. (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30: 1305-1322.
- FAYER, R., SANTÍN, M., TROUT, J., GREINER, E. (2006) Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, 135: 105-112.
- FAYER, R., SPEER, C.A., DUBEY, J.P. (1990) General biology of *Cryptosporidium*. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boca Raton: CRC Press, 1-29.
- FAYER, R., UNGAR, B.L.P. (1986) *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiology Reviews*, 50: 458-483.
- FEITOSA, F.L.F., SHIMAMURA, G.M., ROBERTO, T., MEIRELES, M.V., NUNES, C.M., CIARLINI, P.C., BORGES, A.S. (2004) Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, 34: 189-193.

- FENG, X., RICH, S.M., AKIYOSHI, D., TUMWINE, J.K., KEKITIINWA, A., NABUKEERA, N., TZIPORI, S., WIDMER, G. (2000) Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. *Applied and environmental microbiology*, 8: 3344-3349.
- FERREIRA, M.S., BORGES, A.S. (2002) Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 443-457.
- FOTH, B.J., MCFADDEN, G.I. (2003) The apicoplast: A plastid in *Plasmodium falciparum* and in other apicomplexan parasites. *International review of cytology*, 224: 57-110.
- GARCIA, A.M., LIMA, J.D. (1994) Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em Rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com práticas de manejo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 3: 23-28.
- GENNARI, S.M., KASAI, N., PENA, H.F.J., CORTEZ, A. (1999) Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da Cidade de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.*, 36. http://www.coopers.com.br/VetNews/52_b.htm em 19/09/2003.
- GOW, S., WALDNER, C. (2006) An examination of the prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves from western Canadian cow-calf herds. *Veterinary Parasitology*, 137: 50-61.
- GRAAF, D.C., VANOPDENBOSCH, E., ORTEGA-MORA, L.M., ABBASSI, H., PEETERS, J.E. (1999) A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 29: 1269-1287.
- HARP, J.A., JARDON, P., ATWILL, E.R., ZYLSTRA, M., CHECEL, S., GOFF, J.P., DE SIMONE, C. (1998) Field testing of prophylactic measures against *Cryptosporidium parvum* infection in calves in a California dairy herd. Agricultural Research service/United States Department of Agriculture. <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000006/68/0000066848.html> em 28/09/2003.

- HE, C.Y., SHAW, M.K., PLETCHER, C.H., STRIEPEN, B., TILNEY, L.G., ROOS, D.S. (2001) A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *European Molecular Biology Organization Journal*, 20: 330-339.
- HEIGES, M., WANG, H., ROBINSON, E., AURRECOECHEA, C., GAO, X., KALUSKAR, N., RHODES, P., WANG, S., HE, C., SU, Y., MILLER, J., KRAEMER, E., KISSINGER, J.C. (2006) CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. *Nucleic Acids Research*, 34: 419-422.
- HEITMAN, T.L., FREDERICK, L.M., VISTE, J.R., GUSELLE, N.J., MORGAN, U.M., THOMPSON, R.C., OLSON, M.E. (2002) Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 48:530-541.
- HUETINK, R.E.C., VAN DER GIESSEN, J.W.B., NOORDHUIZEN, J.P.T.M., PLOEGER, H.W. (2001) Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology*, 102: 53-67.
- JENKINS, M.C. (2001) Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 101: 291-310.
- KABAGAMBE, E.K., ELZER, P.H., GEAGHAN, J.P., OPUDA-ASIBO, J., SCHOLL, D.T., MILLER, J.E. (2001) Risk factors for *Brucella* seropositivity in goats eastern and western Uganda. *Preventive Veterinary medicine*, 52: 91-108
- KADAPPU, K.K., NAGARAJA, M.V., RAO, P.V., SHASTRY, B.A. (2002) Azithromycin as treatment for cryptosporidiosis in human immunodeficiency virus disease. *Journal of Postgraduate Medicine*, 48: 179-181.

- KATINKA, M.D., DUPRAT, S., CORNILLOT, E., MÉTÉNIER, G., THOMARAT, F., PRENSIER, G., BARBE, V., PEYRETAILLADE, E., BROTTIER, P., WINCKER, P., DELBAC, F., EL ALAOUI, H., PEYRET, P., SAURIN, W., GOUY, M., WEISSENBACH, J., VIVARES, C.P. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414: 450-453.
- KEELING, P.J. (2004) Reduction and compaction in the genome of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. *Developmental cell*, 6: 614-616.
- KUCZYNSKA, E., SHELTON, D.R. (1999) Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures and soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2820-2826.
- LALLO, M.A., BONDAN, E.F. (2006) Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, 40: 120-125.
- LIU, C., VIGDOROVICH, V., KAPUR, V., ABRAHAMSEN, M.S. (1999) A random survey of the *Cryptosporidium parvum* genome. *Infection and Immunity*, 67: 3960-3969.
- LUNA, S., LILIANA, R.L., MISAEL, C. (2002) Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas superficiales en Costa Rica. *Parasitología Latinoamericana*, 57: 63-65.
- MADDOX-HYTTEL, C., LANGKJÆR, ENEMARK, H.L., VIGRE, H. (2006) *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs – Occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*, *In press*.
- MAGI, B., CANOCCHI, V., TORDINI, G. (2006) *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitology Research*, 98: 150-152.
- MAINAR-JAIME, R.C., VAZQUEZ-BOLAND, J.A. (1999) Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. *Preventive Veterinary medicine*, 40: 193-205.

- MAKUCH, J.R. (1996) *Cryptosporidium parvum* and cattle: Implications for Public Health and Land Use Restrictions. Medical Ecology & Environmental Animal Health / University of California, Davis. <http://www.nal.usda.gov/wqie/cryptfac.html>. em 01/03/2001.
- 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 México. *Preventive Veterinary Medicine*, 36: 95-107.
- MEISEL, J.L., PERERA, D.R., MELIGRO, C., RUBIN, C.E. (1976) Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70: 1156-1160.
- MODOLO, J.R., GONÇALVES, R.C., KUCHEMUCK, M.R.G., GOTTSCHALK, A.F. (1988) Ocorrência de criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu – SP. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 10: 9-10.
- MOHAMMED, H.O., WADE, S.E., SCHAAF, S. (1999) Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* in dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, 83: 1-13.
- MORGAN, U.M., CONSTANTINE, C.C., FORBES, D.A., THOMPSON, R.C.A. (1997) Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* oocysts using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *Journal of Parasitology*, 83: 825-830.
- MORGAN, U.M., SARGENT, K.D., DEPLAZES, P., FORBES, D.A., SPANO, F., HERTZBERG, H., ELLIOT, A., THOMPSON, R.C.A. (1998) Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology*, 117: 31-37.
- MORGAN, U.M., THOMPSON, R.C.A. (1998) PCR detection of *Cryptosporidium*, the way forward? *Parasitology Today*, 14: 241-245.

- MULLER, A.P.B. (1999) Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas na região metropolitana de São Paulo. Dissertação de mestrado Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. p. 113.
- MUNHOZ, A.D. (2004) *Uma análise descritiva da Neosporose em vacas leiteiras dos Municípios de Rio Claro e Resende, no Estado do Rio de Janeiro*. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, 102p.
- NAVARRE, C.B., BELKNAP, E.B., ROWE, S.E. (2000) Differentiation of Gastrointestinal Diseases of Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16: 37-57.
- O'DONOGHUE, P.J. (1995) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25: 139-195.
- O'DONOGHUE, P.J., THAM, V.L., de SARAM, W.G., PAULL, K.L., McDERMOTT, S. (1987) *Cryptosporidium* infections in birds and mammals and attempted cross-transmission studies. *Veterinary Parasitology*, 26: 1-11.
- ORTOLANI, E.L., SOARES, P.C. (2003) Aspectos epidemiológicos de la cryptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitología Latinoamericana*, 58: 122-127.
- PARK, J., GUK, S., HAN, E., SHIN, E., KIM, J., CHAI, J. (2006) Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. Prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology*, 44: 23-33.
- PÉREZ-CORDÓN, G., ROSALES-LOMBARDO, M.J., SÁNCHEZ-MORENO, M. (2005) Procesamiento de muestras fecales en el estudio de *Cryptosporidium* sp. Mediante PCR. *Revista Peruana de Biología*, 12: 158-160.

- PIENIAZEK, N.J., BORNAY-LLINARES, F.J., SLEMENDA, S.B., DASILVA, A.J., MOURA, I.N.S., ARROWOOD, M.J., DIETRICH, O., ADDISS, D.G. (1999) New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerging Infectious Diseases*, 172: 452-457.
- PUTIGNANI, L., TAIT, A., SMITH, H.V., HORNER, D., TOVAR, D., TETLEY, L., WASTLING, J.M. (2004) Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, 129: 1-18.
- QUIGLEY, J. (2001) *Cryptosporidium* & cryptosporidiosis. American Protein Corporation, Iowa. <http://www.calfnotes.com> em 29/09/2003.
- QUÍLEZ, J., SÁNCHEZ-ACEDO, C., DEL CACHO, E., CLAVEL, A., CAUSAPÉ, A.C. (1996) Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeasten Spain). *Veterinary Parasitology*, 66: 139-146.
- QUÍLEZ, J., VERGARA-CASTIBLANCO, C.A., ARES-MAZÁS, M.E., SÁNCHEZ-ACEDO, C., CACHO, E., FREIRE SANTOS, F. (2002) Serum antibody response and *Cryptosporidium parvum* oocyst antigens recognized by sera from naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 104: 187-197.
- RALPH, S.A., VAN DOOREN, G.G., WALLER, R.F., CRAWFORD, M.J., FRAUNHOLZM M.J., FOTH, B.J., TONKIN, C.J., ROOS, D.S. (2004) Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature reviews*, 2: 203-216.
- RAMIREZ, N.E., WARD, L.A., SREEVATSAN, S. (2004) A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and infection*, 6: 773-785.
- RIBEIRO, P.C., PILE, E., QUEIROZ, M.M.C., NORBERG, A.N., TENÓRIO, J.R.O. (2004) Cryptosporidiosis occurrence in HIV + patients attended in a hospital, Brazil. *Revista Saúde Pública*, 38: 469-470.
- S.A.S (1998) User's Guide Statistics, inst., inc., cary, NC.

- SANTÍN, M., TROUT, J.M., XIAO, L., GREINER, E., FAYER, R. (2004) Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 122: 103-117.
- SIMONS III, O.D., SOBSEY, M.D., HEANEY, C.D., CHAEFER III, F.W., FRANCY, D.S. (2001) Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by Method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. *Applied and Environmental microbiology*, 67 (3): 1123-1127.
- SISCHO, W.M., ATWILL, E.R., LANYON, L.E., GEORGE, J. (2000) Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States, *Preventive Veterinary Medicine*, 43: 253-267.
- SLAPETA, J.; KEITHLY, J.S. (2004). *Cryptosporidium parvum* mitochondrial-type HSP70 targets homologous and heterologous mitochondria. *Eukaryotic Cell*, 3: 483-494.
- 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: 33-36.
- STERLING, C.R., ARROWOOD, M.J. (1992) Cryptosporidia. In: Julius P. Kreier, *Parasitic Protozoa*. Academic press, INC., 159-225.
- TANRIVERDI, S., WIDMER, G. (2006) Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 6: 113-122.
- TARAZONA, R., BLEWETT, D.A., CARMONA, M.D. (1998) *Cryptosporidium parvum* in infection in experimentally infected mice: infection dynamics and effect of immunosuppression. *Folia Parasitologica*, 45: 101-107.
- UPTON, S.J., CURRENT, W.L. (1985) The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) infecting mammals. *Journal of Parasitology*, 71: 625-629.

- VESEY, G., SLADE, J.S., BYRNE, M., SHEPERD, K., DENNIS, P.J., FRICKER, C.R. (1993) Routine monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry. *The Journal of Applied Bacteriology*, 75: 87-90.
- VESEY, G., GRIFFITHS, K.R., GAUCI, M.R., DEERE, M.R., WILLIAMS, K., VEAL, D. (1997) Simple and rapid measurement of *Cryptosporidium* encystation using flow cytometry. *International Journal for Parasitology*, 27:1353-1359.
- WATANABE, Y., KIMURA, K., YANG, C.H., OOI, H.K. (2005) Detection of *Cryptosporidium* sp. oocyst and *Giardia* sp. cyst in faucet water samples from cattle and goat farms in Taiwan. *Parasitology*, 67: 1285-1287.
- WIDMER, G., TCHACK, L., SPANO, F., TZIPORI, S. (1998) A Study of *Cryptosporidium parvum* Genotypes and Population Structure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 685-686.
- WOUDA, W., BARTELS, C.J.M., DE MOEN, A.R. (1999) Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, 52: 233-245.
- XIAO, L., SULAIMAN, I., FAYER, R., LAL, A. (1998) Species and Strain-specific Typing of *Cryptosporidium* Parasites in Clinical and Environmental Samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 687-692.
- XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U, UPTON, S.J. (2004) *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 72-97.
- ZHU, G., MARCHEWKA, M.J., KEITHLY, J.S. (2000) *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology*, 146: 315-321.

7. APÊNDICE

**Questionário epidemiológico a ser aplicado durante as visitas às propriedades
utilizadas para o projeto**

IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE Nº _____

1. Nome: _____

2. Proprietário: _____

Localização em coordenadas: _____

3. PARTE FÍSICA

3.1. Tamanho em hectares: _____

4. MANEJO

4.1. Número total de bovinos: _____

4.2. Número de bezerros com idade inferior a 6 meses: _____

4.3. Sistema de manejo

Extensivo

Semi-intensivo

Intensivo

4.4. Sistema de produção

Familiar

Pré-empresarial

Empresarial

4.5. Origem da água dos bovinos

Rio

Nascente

Açude

Encanada tratada

Outras. Quais? _____

4.6. Condições higiênico-sanitárias

Excelentes

Satisfatórias

Boas

Ruins

4.7. Reservatório próprio para água de beber

Sim

Não

4.8. Utilização de esterco como adubo

Sim

Não

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)