

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
***Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS LEITEIROS DA**
REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

Fernando Paes de Oliveira
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Cryptosporidium spp. EM BEZERROS LEITEIROS DA
REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Fernando Paes de Oliveira

Orientador: Prof. Ass. Dr. Luiz Claudio Nogueira Mendes

Co-orientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – UNESP, Curso de Medicina Veterinária, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2010

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48o Oliveira, Fernando Paes de.
Ocorrência e Caracterização Molecular de *Cryptosporidium* spp.
em Bezerros Leiteiros da Região Noroeste do Estado de São Paulo /
Fernando Paes de Oliveira. - Araçatuba : [s.n.], 2010
68 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010
Orientador: Prof. Luiz Claudio Nogueira Mendes
Coorientador: Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles

1. Reação em Cadeia da Polimerase 2. Criptosporidiose
3. Diarréia 4. Análise de Frequência com Série de Oligonucleotídeos

CDD 636.0896

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDO PAES DE OLIVEIRA – Murutinga do Sul – SP, 04 de março de 1980. Graduação em Medicina Veterinária, 2005, Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, Fundação Educacional de Andradina FEA, Andradina, SP. Professor Assistente da Disciplina de Prática Hospitalar e Supervisor do Setor de Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Tuberculose e Parasitologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina – Fundação Educacional de Andradina FEA, Andradina/SP. Aluno do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA – Curso de Medicina Veterinária – Campus de Araçatuba, São Paulo.

EPÍGRAFE

“...A oportunidade se antecipa para as pessoas que se esforçam em conhecer, e aprendem a gostar do que realmente precisam...”

(Padre Fábio de Melo)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho como oferta de amor e sacrifício a Deus, Pai todo Poderoso, porque tudo o que tenho e sou a Ele pertence. Aos meus pais, José Paes de Oliveira Filho e Leila Figueiredo Giuntini de Oliveira, faróis que me guiam nas noites traiçoeiras.

AGRADECIMENTOS

A todos os meus familiares, em especial minha mãe Leila.

Ao meu orientador, Prof. Luiz Claudio, pelo apoio e sempre me atendeu de braços abertos incentivando-me nesta etapa final e compreendendo minhas razões.

Ao meu co-orientador, Prof. Marcelo, pela paciência, ajuda, confiança, perdão e compreensão em minhas inúmeras fraquezas e sublime orientação.

Ao professor Ricardo Velludo, pelas sábias orientações e aconselhamentos.

Ao professor Joji Ariki, pelos incentivos.

A minha amiga e colega de turma de pós-graduação, Deuvânia, que nunca mediu esforços na colaboração para realização desse projeto.

Aos professores e colaboradores deste projeto pelos valiosos ensinamentos.

Ao amigo Jose Francisco Fonzar, que nunca mediu esforços, estando sempre pronto a qualquer apelo meu.

Aos amigos de trabalho, Valdir, Sr. Gilberto, Frank e todos os demais.

Aos meus amigos, Willian e Weslen, pelo companheirismo, e conselhos valiosos durante esta etapa.

Ao meu amigo, Sérgio, de São João da Boa Vista – SP, pela sua humildade e alegrias compartilhadas juntos.

Aos meus amigos Becaria e Zézão da Farmácia que muito colaboraram para a conclusão das disciplinas.

Aos pecuaristas, pelo prazer e ajuda com muita satisfação nas colheitas das amostras.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

A UNESP por proporcionar a oportunidade de bem aprender.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal por dar oportunidade a profissionais.

Ao Diego e Valéria, secretários da Pós-Graduação, que sempre nos atende com muita paciência, atenção e carinho.

A professora Dra. Sílvia Helena Venturolli Perri, por ajudar na realização das análises estatísticas, por meio de coloração e sugestões.

A Isabel Pereira Matos, Biblioteca do Campus do Curso de Medicina Veterinária, por toda colaboração, paciência e dedicação.

A coordenadora do curso de Pós-Graduação professora Dra. Juliana Regina Peiró, por acreditar em meus ideais.

- Quaisquer enganos e juízos errôneos são meus.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	10
1 Considerações Gerais	10
1.1 Pecuária Leiteira na Região Noroeste do Estado de São Paulo	10
1.2 Agente Etiológico	11
1.3 Ciclo Biológico	11
1.4 Criptosporidiose em bovinos	12
1.5 <i>C. parvum</i> e diarreia neonatal bovina	15
1.6 Papel do bezerro na criptosporidiose humana	16
1.7 Diagnóstico	17
1.8 Visualização de Oocistos e Outros Estágios Evolutivos por Métodos de Concentração e/ou Coloração	18
1.9 Métodos Imunológicos e Moleculares	18
1.10 Objetivo	20
Referências	21
CAPÍTULO 2	35
Artigo Científico	35
Normas para publicação	52

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS LEITEIROS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO – Um total de 196 amostras fecais de bezerros leiteiros mestiços, de 7 a 30 dias de idade de ambos os sexos foram colhidas em 31 propriedades com o objetivo de determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* na região Noroeste do Estado de São Paulo, assim como caracterizar molecularmente as espécies envolvidas nesta parasitose. Realizou-se a análise microscópica pela técnica de coloração negativa com verde malaquita em todas as amostras de fezes. Para identificação molecular de *Cryptosporidium*, utilizou-se a reação de *nested* PCR, utilizando *primers* específicos para amplificação de fragmentos do gene codificador da subunidade 18S do RNA ribossômico e do gene da glicoproteína GP 60, submetendo o produto da PCR a sequenciamento e análise filogenética. Por meio de exame de fezes, foi observada positividade de 2% (4/196), por meio de microscopia, e de 10,7% (21/196) pela *nested* PCR. Como resultado do sequenciamento, foram identificadas quatro espécies de *Cryptosporidium*: *C. parvum* (subtipo Ila15G2R1) *C. ryanae*, *C. bovis* e *C. andersoni*. Esta descoberta de *C. parvum* subtipo IlaA15G2R1 na região estudada ilustra a utilidade da subtipagem. Embora estes resultados iniciais baseados em subtipos com GP60 sejam úteis para compreender a dinâmica de transmissão das espécies de *Cryptosporidium*, o número de amostras analisadas é relativamente pequeno e muito mais ainda pode ser pesquisado. É interessante notar que as informações de tipagem molecular com o gene 18S rRNA e a subtipagem com o gene GP60, permitem que os epidemiologistas possam rastrear as fontes de surtos das diferentes espécies de *Cryptosporidium*.

Palavras-Chave: Reação em cadeia da polimerase, diarreia, criptosporidiose, análise de frequência com série de oligonucleotídeos, bezerros leiteiros.

**OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
Cryptosporidium spp. IN DAIRY CALVES IN THE REGION NORTHWEST,
STATE OF SÃO PAULO**

SUMMARY – A total of 196 fecal samples from crossbred calves, 7-30 days old of both sexes were collected in 31 properties with the objective of determining the prevalence of *Cryptosporidium* in the northwestern region of São Paulo, as well as characterizing the molecular species involved in this parasite. We performed microscopic analysis by the technique of negative staining with malachite green in all stool samples. For molecular identification of *Cryptosporidium*, we used the reaction of nested PCR using specific primers for amplification of gene fragments coding for the 18S subunit ribosomal RNA gene and the glycoprotein GP 60 by subjecting the PCR product sequencing and phylogenetic analysis. By stool examination, positivity was observed 2% (4 / 196) by means of microscopy, and 10.7% (21/196) by nested PCR. As a result of sequencing, we identified four species of *Cryptosporidium*: *C. parvum* (subtype IIa15G2R1) *C. Ryanair*, *C. bovis* and *C. andersoni*. This discovery of *C. IIaA15G2R1 parvum* subtype in the studied region illustrates the usefulness of subtyping. Although based on these initial results with GP60 subtypes are useful for understanding the transmission dynamics of the species of *Cryptosporidium*, the number of samples is relatively small and much more can still be searched. It is interesting to note that the information of molecular typing with 18S rRNA gene and subtyping with the GP60 gene, allow epidemiologists can track sources of outbreaks of different species of *Cryptosporidium*.

Keywords: Polymerase chain reaction, diarrhea, cryptosporidiosis, oligonucleotide array sequence analysis, dairy calves.

CAPÍTULO 1

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Pecuária Leiteira na Região Noroeste do Estado de São Paulo

A região Noroeste do Estado de São Paulo, próximo à divisa com o Estado do Mato Grosso do Sul, possui um considerável número de assentamentos, vivendo e produzindo em imóvel rural desapropriado ou adquirido com apoio do governo, com o objetivo de cumprir a legislação relativa à reforma agrária (ALBUQUERQUE et al., 2004). No período de 1979 a 2007 foram criados 224 assentamentos no Estado de São Paulo, que significou moradia à 15.338 famílias num total de 408.226 hectares (DATA LUTA, 2008).

O sistema de produção predominante é a pecuária de leite, associada à horticultura e culturas de autoconsumo, como o milho, o feijão, o quiabo e a mandioca, cuja produção, em pequena escala, além de garantir fonte de alimento próprio, é comercializada e garante a sustentabilidade econômica destas propriedades. O leite produzido é comercializado pela venda direta a laticínios ou pelas cooperativas, além da sua utilização para autoconsumo. Mais da metade (50,9%) dos produtores destina alguns produtos de origem animal e vegetal para o autoconsumo (SANT'ANA et al., 2007).

Um dos principais fatores que interferem nos índices produtivos e reprodutivos de um rebanho é a sanidade, principalmente relacionada às infecções que afetam direta ou indiretamente os animais. Dentre essas doenças, a cryptosporidiose é uma importante infecção, responsável por inúmeras perdas produtivas e econômicas, causando sérios prejuízos. Além da importância na área de saúde animal, a cryptosporidiose assume papel relevante do ponto de vista de Saúde Pública, uma vez que o contato com animais infectados é uma forma de transmissão para o homem.

1.2 Agente Etiológico

O gênero *Cryptosporidium* é classificado como um eucarionte pertencente ao Filo Apicomplexa (LEVINE, 1984). Este protozoário foi encontrado pela primeira vez em 1907, em glândulas gástricas de camundongos, sendo denominado *Cryptosporidium muris* e posteriormente, em 1912, no intestino desta mesma espécie, sendo identificado como *C. parvum* (TYZZER, 1912). Porém, somente após o primeiro surto acometendo aves domésticas em 1950 (SALVIN, 1955) e, sobretudo após os primeiros relatos em humanos (MEISEL et al., 1976) foi que este agente passou a ser pesquisado de maneira mais efetiva.

As espécies de *Cryptosporidium* são parasitas entéricos e desenvolvem-se no epitélio da mucosa intestinal ou gástrica de diversos vertebrados, diferindo morfologicamente de todos os outros gêneros da subordem *Eimeriina*, pois são esféricos ou ovóides, medindo de 3 a 8 mm de diâmetro e possuem internamente quatro esporozoítos (XIAO et al., 1998).

1.3 Ciclo Biológico

De acordo com as constatações nos diferentes hospedeiros acometidos por *Cryptosporidium* spp., o ciclo de vida é do tipo monoxeno, com seis estágios de desenvolvimento no organismo hospedeiro: excistação, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede do oocisto e esporogonia (DONNELLY; STENTIFORD, 1997; GELLIN; SOAVE, 1992; SMITH; ROSE, 1998).

No transcorrer destes estágios, dois tipos de oocistos são formados, sendo um destes de parede espessa, eliminados na forma infectante por meio das fezes e resistentes às condições ambientais, sendo responsável pela transmissão do parasito para outros animais; e aqueles de parede delgada, os quais se rompem no hospedeiro e liberam esporozoítos que invadem células epiteliais não infectadas (O'DONOGHUE, 1995; SMITH, 1993; XIAO et al., 2004).

A liberação de oocistos presentes nas fezes dos hospedeiros infectados pode acarretar na contaminação de águas superficiais ou reservatórios (MACHADO et al., 2006; MULLER, 1999; SMITH, 1993), os quais têm sido

reconhecidos como maiores veiculadores do patógeno pela possibilidade de atingir um imenso contingente de hospedeiros (LABERGE et al., 1996).

1.4 Criptosporidiose em Bovinos

O primeiro relato da criptosporidiose bovina ocorreu em 1971 e descreveu as fases do parasita em cortes de tecido do jejuno de uma bezerra de oito meses de idade com diarreia crônica (PANCIERA et al., 1971).

Os bovinos podem ser infectados com pelo menos quatro espécies de *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium ryanae* (FAYER et al., 2006; XIAO et al., 2004).

Estudos epidemiológicos indicam que a infecção por *C. parvum* geralmente ocorre em bezerros recém nascidos que ainda não apresentam imunidade totalmente formada (O'HANDLEY et al., 1999; XIAO; HERD, 1994) Um estudo recente mostrou que esses oocistos de *Cryptosporidium* spp. em bovinos estão relacionados com a idade (SANTIN et al., 2004). *C. parvum*, a única espécie zoonótica predominante nos animais, é responsável por cerca de 85% das infecções por *Cryptosporidium* em bezerros antes da desmama, mas apenas 1% das infecções por *Cryptosporidium* em bezerros ocorre após a desmama. Bezerros pós-desmamados e vacas são mais infectados com *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae* (SANTIN et al., 2004; FAYER et al., 2006).

Feitosa et al. (2008) avaliou a prevalência de oocistos de *C. parvum* em amostras de fezes de 459 bezerros com até 30 dias de 33 propriedades leiteiras na região de Araçatuba Estado de São Paulo. A maior porcentagem de excreção de oocistos foi verificada em bezerros com faixa etária variando entre oito e 14 dias de idade (14,5%) sendo, a menor taxa (6,4%), detectada no grupo de animais mais velhos (22 a 30 dias de vida).

Estes resultados demonstram claramente que só os bezerros são uma importante fonte de criptosporidiose zoonótica em humanos. Bezerros também são o grupo etário de gado mais afetado por criptosporidiose em termos de prevalência da infecção e da morbidade e mortalidade (FAYER et al., 1997).

Em estudos realizados em rebanhos bovinos, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* foram encontrados com mais frequência (FAYER et al., 2006;

FENG et al., 2007; GEURDEN et al., 2006; LANGKJAER et al., 2007; SANTIN et al., 2004; XIAO et al., 2004).

C. andersoni coloniza as glândulas gástricas do abomaso, (SANTIN et al., 2004). As infecções acontecem principalmente em bezerros com idade superior a 4 semanas de idade, podendo acometer também animais imunodeprimidos no período pós-desmame e bovinos leiteiros adultos. Geralmente não produzem diarreia ou sinais clínicos visíveis. As infecções são mais crônicas (às vezes durando mais de um ano) e a produção de oocistos é inferior à de *C. parvum*. (KVÁC et al., 2008).

C. bovis é mais encontrado em animais de três meses a dois anos de idade (FAYER et al., 2006). Porém, a prevalência de *C. bovis* diminui quando o animal completa dois anos de idade, devido a um aumento correspondente da prevalência de *C. andersoni* (FAYER et al., 2007).

Foi descrita uma nova espécie de *Cryptosporidium* de bovino, denominada previamente de *Cryptosporidium* genótipo deer-like e em seguida nomeado de *Cryptosporidium ryanae*. Essa espécie é morfologicamente muito semelhante a *C. parvum* e *C. bovis*, diferenciando-se apenas no tamanho dos oocistos que são menores (FAYER, 2008).

C. ryanae foi identificado em cinco bezerros pós-desmamados na Geórgia, E.U.A., um bezerro pré-desmamado na China (FENG et al., 2007), dois bezerros com 14 dias de idade no Kenia (SZONYI et al., 2008) e três bezerros com idade entre um a seis meses de vida na Malásia (HALIM et al., 2008).

C. hominis foi encontrado em algumas cabeças de gado, na Escócia, Índia e Coréia (FENG et al., 2007; PARK et al., 2006; SMITH et al., 2005), *C. suis* foi encontrado em um bezerro no E.U.A. (Estados Unidos da América) e outro na Zâmbia (FAYER et al., 2006; GEURDEN et al., 2006), *Cryptosporidium* genótipo de suínos II, foram encontradas em três bovinos e uma vaca na Dinamarca, respectivamente (LANGKJAER et al., 2007), *C. felis* foi encontrado em uma vaca na Polônia (BORNAY-LLINARES et al., 1999), e *C. canis* em bezerros experimentalmente infectados, mas não foi detectado em infecção natural (FAYER et al., 2001).

Apesar da importância clínica e de saúde pública de *C. parvum*, pouco é conhecido sobre sua dinâmica de transmissão em bovinos. Recentemente, os pesquisadores utilizam técnicas altamente específicas de subtipagem para

estudar a transmissão de infecções por *C. parvum* em bovinos de uma determinada área geográfica (MALLON et al., 2003; TANRIVERDI et al., 2006; TANRIVERDI; WIDMER, 2006). Estas ferramentas são muito úteis no monitoramento de fontes de infecção e para analisar a dinâmica de transmissão deste parasita. A ferramenta mais comumente utilizada para determinar os subtipos é baseada na análise de seqüência do gene da glicoproteína de 60 kDa (GP60), que permite a identificação de muitas das famílias do subtipo de *C. parvum* e *Cryptosporidium hominis* e vários subtipos dentro de cada subtipo da família (ABE et al., 2006; ALVES et al., 2003, 2006; CHALMERS et al., 2005; GLABERMAN et al.; PENG et al., 2001, 2003; STRONG et al., 2000; STURBAUM et al., 2003; SULAIMAN et al., 2001, 2002, 2005; WU et al., 2003; ZHOU et al., 2003). Das duas principais famílias do subtipo de *C. parvum*, o subtipo IIa, considerado zoonótico, foi encontrado em humanos e bovinos, e o subtipo IIc, acatado como antroponótico, só é encontrado em humanos (ALVES et al., 2003; XIAO; RYAN, 2004).

Em bezerros recém nascidos, a criptosporidiose é caracterizada por diarreia severa com duração média de duas semanas, o que pode ocasionar desidratação e até a morte do animal (FAYER et al., 1990)

Esta diarreia geralmente tem início no terceiro ou quarto dia após a ingestão dos oocistos infectantes, sendo o pico de eliminação entre o quinto e oitavo dia (CURRENT, 1990).

Em um estudo realizado por Martins-Vieira et al. (2009), durante o pico de eliminação que ocorreu no quinto dia pós inoculação, o bezerro apresentou uma eliminação de $9,0 \times 10^5$ oocistos/mL/fezes.

Segundo Naciri et al. (1999), a prevalência de *C. parvum* pode ser elevada tanto em criações de corte como em criações leiteiras. Sendo a prevalência em bezerros leiteiros maior quando criados em mesmas condições de manejo (KVAC et al., 2006). Esta informação pode ser explicada devido a maior produção de imunoglobulinas existente no colostro produzido por vacas de corte (GUY et al., 1994).

1.5 *C. parvum* e Diarréia Neonatal Bovina

Em muitos casos de diarréia neonatal em bezerros pode ser identificado *C. parvum* como agente etiológico (NACIRI et al., 1999; O'HANDLEY et al., 1999).

A diarréia neonatal bovina pode ser definida como uma doença multifatorial, que tem como causas além da exposição a patógenos, condições ambientais e fatores nutricionais (BARRINGTON et al., 2002). Geralmente os patógenos identificados como causadores desta enfermidade, além do *C. parvum*, são outros enteropatógenos, como rotavírus, coronavírus, *E. coli*, *Salmonella* e *Eimeria* (O'HANDLEY, 2007).

Alguns autores citam *C. parvum* como um dos principais causadores de diarréia em bezerros, resultando em perdas econômicas aos produtores de gado (DE GRAAF et al., 1999). Outros autores relatam que somente a presença de *C. parvum* em um rebanho não é suficiente para causar surtos da doença clínica, pelo fato de alguns animais saudáveis, ou seja, sem a presença de diarréia, apresentarem eliminação de oocistos de *C. parvum* em suas fezes (BENDALI et al., 1999; JAGER et al., 2005; O'HANDLEY et al., 1999).

O diagnóstico desta doença pode ser complicado, devido ao fato da ocorrência de frequentes infecções mistas provocados por diversos tipos de patógenos (BENDALI et al., 1999; DE LA FUENTE et al., 1999; O'HANDLEY et al., 1999).

Segundo Barrington et al. (2002), a adoção de medidas de prevenção, como a utilização de cama limpa e seca, garantia da transferência de imunidade passiva aos bezerros, redução a exposição aos patógenos por meio do isolamento de animais doentes, a redução densidade de animais e uma boa higiene geral, podem reduzir a incidência e gravidade da diarréia neonatal.

Alguns surtos graves de criptosporidiose em bezerros foram associados com a presença de áreas com pequenos acúmulos de água em piquetes maternidades, e da introdução de bezerros infectados no rebanho (ANDERSON, 1998; OLSON et al., 2004).

1.6 Papel do Bezerro na Criptosporidiose Humana

O manejo inadequado do rebanho influencia no aumento da incidência da criptosporidiose em bezerros. Este fator pode potencializar o risco da infecção em humanos que estejam em contato direto com o rebanho infectado (HUNTER et al., 2004).

Alguns estudos relatam que pessoas que lidam frequentemente com gado infectado, como trabalhadores de granjas leiteiras, apresentam maior taxa de infecção por *C. parvum* do que aqueles que não têm contato com o gado (LENGERICH et al., 1993; SIWILA et al., 2007).

Em todo o mundo há relatos de criptosporidiose em humanos provocada por água contaminada com oocistos de *Cryptosporidium*. Em estudo realizado na América do Norte, *C. hominis* tem sido responsável por surtos de criptosporidiose em humanos, não sendo encontrado *C. parvum* nas amostras analisadas (FAYER et al., 2000). Este achado pode sugerir que o gado pode estar, em algumas ocasiões, sendo injustamente envolvido em surtos de criptosporidiose em seres humanos.

Atualmente, existem duas principais espécies responsáveis pela infecção em humanos: *C. hominis* (específica para seres humanos), e *C. parvum* (espécie parasita de mamíferos incluindo o gado). Quanto à morfologia, não existe diferença entre estas espécies, não podendo ser diferenciadas antes do desenvolvimento de técnicas moleculares. O uso da biologia molecular veio a desmistificar em muitas ocasiões que o gado seria responsável pela infecção em humanos. Por exemplo, no surto de Milwaukee de criptosporidiose em humanos em 1993, o gado foi tido como fonte potencial de infecção (MACKENZIE et al., 1994). No entanto, mais tarde, análise com técnicas de biologia molecular das amostras provindas do surto revelou que *C. hominis* foi mais uma vez o agente infeccioso responsável pela infecção, descartando assim a participação dos bovinos (ZHOU et al., 2003).

Os seres humanos, quando infectados, podem ser uma potencial fonte de infecção. Portanto, a criptosporidiose pode ter uma gama de fontes potenciais desde gado até outros animais domésticos ou selvagens infectados com o parasita. (O'HANDLEY, 2007)

Os bezerros confinados geralmente em criações leiteiras podem ser fonte de disseminação de oocistos de *C. parvum* no ambiente (O'HANDLEY, 2007), embora Sisco et al. (2000) comprovaram que explorações leiteiras não apresentaram um papel importante na contaminação de águas para o consumo. No entanto, bezerros leiteiros ou de corte, quando criados em altas taxas de lotação, podem aumentar o risco de surtos de criptosporidiose no rebanho e a contaminação ambiental (O'HANDLEY, 2007).

1.7 Diagnóstico

É necessária experiência para o diagnóstico de criptosporidiose, já que os oocistos e outros estágios evolutivos do gênero *Cryptosporidium* são menores que os de outros coccídios e, ainda, são muito semelhantes às leveduras, o que pode resultar em diagnóstico falso-positivo (FAYER et al., 2000; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004).

De acordo com Egyed et al. (2002), para identificação de *Cryptosporidium* é necessária uma abordagem polifásica, utilizando-se técnicas moleculares, análise morfológica de oocistos e características biológicas, como especificidade por hospedeiro, patogenicidade, períodos pré-patente e patente e intensidade de excreção de oocistos.

Apesar de oocistos de *Cryptosporidium* apresentarem morfologia e morfometria distintas, não é possível a definição da espécie somente pela análise de características morfológicas ou morfométricas. A análise morfológica de oocistos não é definitiva para diagnóstico, pois existem oocistos muito pequenos (4-8 μm), com pequena variação morfológica ou mesmo idênticos entre as diferentes espécies, sem esporocistos e difíceis de serem visualizados (FALL et al., 2003; FAYER et al., 2000). Além disso, os antígenos presentes na parede de oocistos são conservados para todo o gênero, não sendo possível a diferenciação entre espécies, por testes imunológicos (FAYER et al., 2000).

1.8 Visualização de Oocistos e Outros Estágios Evolutivos por Métodos de Concentração e/ou Coloração

O método de centrífugo-flutuação em solução de Sheather é o mais comumente utilizado para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* a partir de amostras fecais, por apresentar custo mais baixo. Os oocistos são visualizados como estruturas brilhantes, contendo grânulos negros, em microscopia de contraste de fase, ou como estruturas translúcidas, com coloração levemente rósea e com grânulos em seu interior, em microscopia óptica de campo claro (SRÉTER; VARGA, 2000).

Há ainda, outras técnicas que podem ser empregadas na detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, como a coloração negativa com verde malaquita, na qual os oocistos são observados como estruturas brilhantes, envoltas por um fundo verde (ELLIOT et al., 1999), e a técnica de Kinyoun (álcool ácido resistente), em que os oocistos refletem coloração rósea a vermelha, contra um fundo verde (MA; SOAVE, 1983).

A visualização de *Cryptosporidium* em tecidos é realizada por meio de esfregaços de mucosas corados com a técnica de coloração de Kinyoun, que permite excelente visualização de estágios evolutivos de *Cryptosporidium* (LATIMER et al., 1988). A técnica mais utilizada para coloração de cortes histológicos é a hematoxilina-eosina (HE), na qual os estágios evolutivos são observados como corpos esféricos basófilos, de 2,0 - 7,5 µm, na superfície das células epiteliais. Em cortes histológicos, são empregadas as colorações à base de prata, ácido periódico de Schiff e microscopia eletrônica, de transmissão ou de varredura, para visualização da morfologia ultra-estrutural desse parasito (PETRY, 2004; VALIGUROVÁ et al., 2008).

1.9 Métodos Imunológicos e Moleculares

Entre os métodos mais utilizados para diagnóstico de criptosporidiose, encontram-se o ensaio imunoenzimático (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008; SILVA et al., 2003) e a reação de imunofluorescência direta (BIALEK et al., 2002; FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008), ambos baseados em princípios imunológicos que têm substituído a análise microscópica em fezes, para pesquisa

de oocistos ou de antígenos solúveis (KHEL et al., 1995). Essas técnicas apresentam melhor sensibilidade e especificidade que as técnicas tradicionais de coloração e reduzem o tempo e trabalho para detecção de oocistos (ARROWOOD; STERLING, 1989; JOHNSTON et al., 2003).

As técnicas moleculares, como a PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), se caracterizam por alta sensibilidade e especificidade (BALATBAT et al., 1996; JEX et al., 2008; MORGAN; THOMPSON, 1998). Porém, seu custo elevado, quando comparado ao custo de outros métodos de detecção de *Cryptosporidium*, em amostras fecais, faz com que a detecção e caracterização molecular não sejam utilizadas rotineiramente em laboratórios de diagnóstico.

Levando em consideração a baixa sensibilidade do diagnóstico coprológico e a impossibilidade de diferenciação entre espécies pelos métodos imunológicos, as técnicas baseadas em técnicas moleculares, como a PCR, e a técnica de poliformismo no comprimento de fragmentos de ácido desoxirribonucléico (DNA), gerados por enzimas de restrição (RFLP) e/ou sequenciamento automático de ácidos nucleicos, são os únicos métodos de diferenciação confiável entre as diferentes espécies de *Cryptosporidium* (JEX et al., 2008; MORGAN et al., 1999a; SARGENT et al., 1998; SRÉTER; VARGA, 2000;).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* geralmente é realizada por meio da PCR e suas variantes, seguida da RFLP ou de sequenciamento dos fragmentos amplificados. O *locus* mais utilizado é o gene da subunidade 18S do RNA ribossômico (18S rRNA). Esse *locus* apresenta cinco cópias por genoma e, pelo fato de caracterizar evolução mais lenta e menor polimorfismo, sendo também, o *locus* de escolha para amostras de animais que possam estar infectados por espécies ou genótipos ainda não classificados (MORGAN et al., 2000a; SPANO et al., 1998; XIAO et al., 1999a; 1999b; 2000b; 2004).

Existem outros *loci* que podem ser utilizados, quando se observa maior polimorfismo, como os genes da actina (SULAIMAN et al., 2002), da proteína do choque térmico-HSP-70 (MORGAN et al., 1999b) e da proteína da parede de oocistos-COWP (XIAO et al., 2000a). Esses *loci* apresentam alto polimorfismo interespecies e, portanto, são muito importantes na análise genética de espécies ou genótipos geneticamente similares, como *C. baileyi* e *Cryptosporidium* sp. de avestruzes (XIAO et al., 2004).

Em relação à PCR, devido às variações do método de extração de DNA, do gene utilizado e do protocolo da reação, e à presença de inibidores da PCR, extraído de amostras fecais (CAREY et al., 2004), há relatos de resultados superiores (MORGAN et al., 1998b), similares (BIALEK, et al., 2002) ou inferiores (MAGI et al., 2006), quando essa técnica é comparada com métodos imunológicos ou de coloração.

Estudos filogenéticos vêm sendo realizados por vários grupos de pesquisadores, porém ainda há divergências quanto à taxonomia do *Cryptosporidium*. De acordo com Xiao et al., 2004, 13 espécies e alguns tipos de genótipos foram identificados acometendo aves, répteis, peixes (LEVINE, 1984; ALVAREZ-PELLITERO; SITJA-BOBADILLA, 2002) e aproximadamente 150 hospedeiros mamíferos, incluindo o homem (FAYER et al., 2000; XIAO et al., 2004).

1.10 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e realizar a classificação molecular das espécies encontradas em bovinos leiteiros na microrregião de Andradina estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

ABE, N.; MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. **Parasitology Research**. v. 99, p. 303–305, 2006.

ALBUQUERQUE, F. J. B.; VASCONCELOS, T. C.; COELHO, J. A. P. M. As políticas públicas e os projetos de assentamento. **Estudos de Psicologia**. v.9, p. 81-88, 2004.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJA-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnarii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**. v. 32, p. 1007-1021, 2002.

ALVES, M.; XIAO, L.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. **Parasitology Research**. v. 99, p. 287–292, 2006.

ALVES, M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A. A.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 2744– 2747, 2003.

ANDERSON, B. C. Cryptosporidiosis in bovine and human health. **Journal of Dairy Science**. v. 81, p. 3036–3041, 1998.

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

BALATBAT, A. B.; JORDAN, G. W.; TANG, Y. J.; SILVA JÚNIOR, J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 34, p. 1769-1772, 1996.

BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; EVERMANN, J.F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 18, n. 1, p. 7–34, 2002.

BENDALI, F.; BICHET, H.; SCHELCHER, F.; SANAA, M. Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. **Veterinary Research**. v. 30, p. 61–74, 1999.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v. 43, p. 283-288, 2002.

BORNAY-LLINARES, F. J.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I. N. S.; MYJAK, P.; PIETKIEWICZ, H.; KRUMINIS-LOZOWSKA, W.; GRACZYK, T. K.; PIENIAZEK, N. J. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 1455–1458, 1999.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**. v. 38, p. 818-862, 2004.

CHALMERS, R. M.; FERGUSON, C.; CACCIO, S.; GASSER, R. B.; ABSEL-OSTA, Y. G.; HEIJNEN, L.; XIAO, L.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; SINCLAIR, M.; STEVENS, M. Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. **International Journal for Parasitology**. v. 35, p. 397–410, 2005.

CURRENT, W. L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Eds). **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRS, p. 31-49, 1990.

DATALUTA. Banco de Dados da Luta pela Terra. **Relatório 2007**. NERA - Núcleo de Estudos, Pesquisas e Projetos de Reforma Agrária - FCT/UNESP. Presidente Prudente, São Paulo, 2008. p. 44.

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

DE LA FUENTE, R.; LUZÓN, M.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; GARCÍA, A.; CID, D.; ORDEN, J. A.; GARCÍA, S.; SANZ, R.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. **Veterinary Parasitology**. v. 80, p. 179–185, 1999.

DONNELLY, J. K.; STENTIFORD, E. I. The *Cryptosporidium* problem in water and food supplies. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v. 30, p. 111-120, 1997.

EGYED, Z.; SRÉTER, T.; SZELL, Z.; BESZTERI, B.; DOBOS-KOVACS, M.; MARIALIGETI, K.; CORNELISSEN, W. C. A.; VARGA, I. Polyphasic typing of *Cryptosporidium baileyi*: a suggested model for characterization of cryptosporidia. **Journal of Parasitology**. v. 88, p. 237-243, 2002.

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**. v. 45, p. 139-142, 1999.

FALL, A.; THOMPSON, R. C. A.; HOBBS, R. P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**. v. 59, p. 399-402, 2003.

FAYER, R. General biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 1-42.

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**. v. 156, p. 191-198, 2008.

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

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

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER, R. (ed) **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997. p. 1–41.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M.; GREINER, E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States. **Veterinary Parasitology**. v. 135, p. 105–112, 2006.

FAYER, R.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LAL, A. A.; DUBEY, J. P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **Journal of Parasitology**. v. 87, p. 1415–1422, 2001.

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

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

GELLIN, B. J.; SOAVE, R. Coccidian infections in AIDS. Toxoplasmosis, cryptosporidiosis and isosporiasis. **Medical Clinics of North America**. v. 76, p. 205-234, 1992.

GEURDEN, T.; BERKVEN, D.; GELDHOF, P.; VERCRUYSE, J.; CLAEREBOU, E. A. Bayesian approach for the evaluation of six diagnostic assays and the estimation of *Cryptosporidium* prevalence in dairy calves. **Veterinary Research**. v.37, p. 671–682, 2006.

GLABERMAN, S.; MOORE, J. E.; LOWERY, C. J.; CHALMERS, R. M.; SULAIMAN, I.; ELWIN, K.; ROONEY, P. J.; MILLAR, B. C.; DOOLEY, J. S.; LAL, A. A.; XIAO, L. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, p. 631–633, 2002.

GUY MA, M. C.; FADDEN, T. B.; COCKRELL, D. C.; BESSER, T. E. Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 77, p. 3002–3007, 1994.

HALIM, N. A.; PLUTZER, J.; BAKHEIT, M. A.; KARANIS, P. First report of *Cryptosporidium* deer-like genotype in Malaysian cattle. **Veterinary Parasitology**. v. 152, p. 325–329, 2008.

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

JÄGER, M.; GAULY, M.; BAUER, C.; FAILING, K.; ERHARDT, G.; ZAHNER, H. Endoparasites in calves of beef cattle herds: management systems dependent and genetic influences. **Veterinary Research**. v. 131, p. 173-191, 2005.

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

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

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

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

KVÁC, M.; SAK, B.; KVETONOVÁ, D.; DITRICH, O.; HOFMANNOVÁ, L.; MODRY, D.; VITOVEC, J.; XIAO, L. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. **Veterinary Parasitology**. v. 153, p. 363–367, 2008.

LABERGE, I.; GRIFFITHS, M. W.; GRIFFITHS, M. W. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **International Journal of Food Microbiology**. v. 31, p. 1-26, 1996.

LANGKJAER, R. B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H. L.; MADDOX-HYTTEL, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. **Parasitology**. v. 134, p. 339–350, 2007.

LATIMER, K. S.; GOODWIN, M. A.; DAVIS, M. K. Rapid cytologic diagnosis of respiratory cryptosporidiosis in chickens. **Avian Diseases**. v. 32, p. 826-830, 1988.

LENGERICH, E. J.; ADDISS, D. G.; MARX, J. M.; UNGAR, L. P. B.; JURANEK, D. D. Increased exposure to cryptosporidia among dairy farmers in Wisconsin. **Journal of Infectious Diseases**. v. 167, p. 1252–1255, 1993.

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

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**. v. 147, p. 824-828, 1983.

MACHADO, E. C. L.; STAMFORD, T. L. M.; ALVES, L. C.; MELO, R. G.; Shinohara, N. K. S. Effectiveness of *Cryptosporidium* spp. oocysts detection and enumeration methods in water and milk samples. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, p.432-439, 2006.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; KIM R. FOX, K. R.; JOAN B.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**. v. 331, p. 161–167, 1994.

MAGI, B.; CANOCCHI, V.; TORDINI, G.; CELLSEI, C.; BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**. v. 98, p. 150-152, 2006.

MALLON, M.; MACLEOD, A.; WASTLING, J.; SMITH, H.; REILLY, B.; TAIT, A. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonótica pathogen

Cryptosporidium parvum. **Journal of Molecular Evolution**. v. 56, p. 407–417, 2003.

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

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

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

MORGAN, U. M.; MONIS, P. T.; FAYER, R.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. A. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. **Journal of Parasitology**. v. 85, p. 1126-1133, 1999b.

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

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

MULLER, A. N. B. **Deteção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

NACIRI, M.; LEFAY, M. P.; MANCASSOLA, R.; POIRIER, P.; CHERMETTE, R. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. **Veterinary Parasitology**. v. 85, p. 245–257, 1999.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**. v. 25, p. 135-139, 1995.

O'HANDLEY, R. M. *Cryptosporidium parvum* infection in cattle: are current perceptions accurate? **Trends in Parasitology**. v.23, p.477-480, 2007.

O'HANDLEY, R. M.; COCKWILL, C.; MCALLISTER T. A.; JELINSKI, M.; MORCK D. W.; OLSON M. E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 214, p. 391–396, 1999.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T.A.; THOMPSON, R. C. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**. v. 20, p. 185–191, 2004.

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

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

PENG, M. M.; MATOS, O.; GATEI, W.; DAS, P.; STANTIC-PAVLINIC, M.; BERN, C.; SULAIMAN, I. M.; GLABERMAN, S.; LAL, A. A.; XIAO, L. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 48, p. 28–31, 2001.

PETRY, F. Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Microscopy and Microanalysis**. v. 10, p. 586-601, 2004.

PENG, M. M.; MESHNICK, S. R.; CUNLIFFE, N. A.; THINDWA, B. D.; HART, C. A.; BROADHEAD, R. L.; XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 50, p. 557–559, 2003.

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

SALVIN, D. *Cryptosporidium* spp. meleagridis (sp. nov). **Journal of Comparative Pathology**. v. 65, p. 262-266, 1955.

SANT'ANA, A. L.; TARSITANO, M. A. A.; ARAUJO, C. A. M.; BERNARDES, E. M.; COSTA, S. M. A. L. **Estratégias de Produção e Comercialização dos Assentados da Região de Andradina, Estado de São Paulo**. Informações Econômicas, SP, v.37, p. 29-41, 2007.

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

SARGENT, K. D.; MORGAN, U. M.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A. Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**. v. 77, p. 221-227, 1998.

SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; GONÇALVEZ-PIRES, M. R. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Detection of *Cryptosporidium* - specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 1097-1099, 2003.

SISCHO, W. M.; ATWILL, E. R.; LANYON, L. E.; GEORGE, J. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water

supplies in the northeastern United States. **Preventive Veterinary Medicine.** v. 43, p. 253–267, 2000.

SIWILA, J.; PHIRI, I. G. K.; VERCRUYSSSE, J.; GOMA, F.; GABRIEL, S.; CLAEREBOU, E.; GEURDEN, T. Asymptomatic cryptosporidiosis in Zambian dairy farm workers and their household members. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 101, p. 733–734, 2007.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today.** v. 14, p. 14-22, 1998.

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

SMITH, J. L. *Cryptosporidium* spp. and Giardia as agents of food borne disease. **Journal of Food Protection.** v. 56, p. 451-461, 1993.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; CRISANTI, A.; SALLICANDRO, P.; MORGAN, U. M.; LE BLANCO S. M.; TCHACK, L.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 36, p. 3255-3259, 1998.

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

STRONG, W. B.; GUT, J.; NELSON, R. G. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. **Infection and Immunity.** v. 68, p. 4117–4134, 2000.

STURBAUM, G. D.; JOST, B. H.; STERLING, C. R. Nucleotide changes within three *Cryptosporidium parvum* surface protein encoding genes differentiate genotype I from genotype II isolates. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 128, p. 87–90, 2003.

SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**. v. 88, p. 388–394, 2002.

SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. suppl, p. 245–275, 2001.

SULAIMAN, I. M.; HIRA, P. R.; ZHOU, L.; AL-ALI, F. M.; AL-SHELAHI, F. A.; SHWEIKI, H. M.; IQBAL, J.; KHALID, N.; XIAO, L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 2805–2809, 2005.

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

TANRIVERDI, S.; MARKOVICS, A.; ARSLAN, M. O.; ITIK, A.; SHKAP, V.; WIDMER, G. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, p. 2507–2513, 2006.

TANRIVERDI, S.; WIDMER, G. Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 6, p. 113–122, 2006.

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

VALIGUROVÁ, A.; JIRKŮ, M.; KOUDELA, B.; GELNAR, M.; MODRÝ, D.; SLAPETA, J. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. **International Journal for Parasitology**. v. 38, p. 913-922, 2008.

XIAO, L.; HERD, R. P. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Veterinary Parasitology**. v. 55, p. 257–262, 1994.

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

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

XIAO, L.; BERN, C.; SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis, In: THOMPSON, R. C. A. (ed.). ***Cryptosporidium: from molecules to disease***. Amsterdam: Elsevier, 2004. p. 227–262.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; LAL, A.A. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93, p. 687-692, 1998.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A. A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 5492-5498, 2000b.

XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocysts wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 5499- 5502, 2000a.

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

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C. A.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 3386-3391, 1999b.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; LAL, A.A. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93, n. 5, p. 687-692, 1998.

WU, Z.; NAGANO, I.; BOONMARS, T.; NAKADA, T.; TAKAHASHI, Y. Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 4720–4726, 2003.

ZHOU, L.; SINGH, A.; JIANG, J.; XIAO, L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 5254–5257, 2003.

CAPITULO 2

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS LEITEIROS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cryptosporidium* spp. IN DAIRY CALVES IN THE REGION NORTHWEST, STATE OF SÃO PAULO

Fernando Paes de Oliveira¹, Marcelo Vasconcelos Meireles¹, Weslen Fabrício Pires Teixeira¹, Willian Marinho Dourado Coelho², Luiz Claudio Nogueira Mendes¹

RESUMO

O coccídio *Cryptosporidium* é um parasito do epitélio do trato gastrointestinal e/ou respiratório de mamíferos, aves, peixes, répteis e anfíbios. O papel dos animais na dinâmica de transmissão desse agente ao homem é pouco conhecido e a sua ocorrência é motivo de preocupação para a saúde pública, devido ao seu potencial zoonótico. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros mestiços, com faixa etária de uma a quatro semanas, em propriedades leiteiras da região Noroeste do Estado de São Paulo, foi determinada por meio de análise microscópica e pela reação em cadeia da polimerase (*nested* PCR). Os oocistos foram concentrados a partir de 10 gramas de fezes de cada bezerro e, após purificação, analisou-se a presença de oocistos de *Cryptosporidium* por meio da técnica de coloração com verde malaquita e pela *nested* PCR, utilizando *primers* específicos para amplificação de fragmentos do gene codificador da subunidade 18S do RNA ribossômico e do gene da glicoproteína GP 60, submetendo o produto da PCR a sequenciamento e análise filogenética. Por meio de microscopia foi observada positividade de 2% (4/196), e em 10,7% (21/196) pela *nested* PCR. Com o resultado do sequenciamento, foram identificados quatro espécies de *Cryptosporidium*: *C. parvum* (subtipo Ila15G2R1) *C. ryanae*, *C. bovis* e *C. andersoni*. Com referência à faixa etária dos animais positivos, 38,1% (8/21)

¹Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual, São Paulo, Rua Clóvis Pestana, 793, CEP 16050-680, Bairro Dona Amélia, Araçatuba, SP.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual, São Paulo, Via de acesso professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP.

tinham idade menor ou igual a 10 dias, 23,8% (5/21) entre 11 e 20 dias e 38,1% (8/21) maior que 20 dias.

Palavras-chave: Zoonose, *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni*, *C. ryanae*, *C. bovis* Subgenotipagem.

ABSTRACT

The coccidian parasite *Cryptosporidium* is one of the epithelium of the gastrointestinal tract and / or respiratory system of mammals, birds, fish, reptiles and amphibians. The role of animals in the transmission of this agent to humans is unclear and its occurrence is of concern to public health because of its zoonotic potential. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in crossbred calves aged one to four weeks, in dairy farms in the northwest of São Paulo, was determined by microscopic examination and by polymerase chain reaction (PCR). The oocysts were concentrated from 10 grams of feces from each calf and, after purification, we analyzed the presence of *Cryptosporidium* oocysts by staining with malachite green and by nested PCR using specific primers for amplification of fragments of gene coding for the 18S subunit ribosomal RNA gene and the glycoprotein GP 60 by subjecting the PCR product sequencing and phylogenetic analysis. By microscopic positivity was observed in 2% (4 / 196), and 10.7% (21/196) by nested PCR. With the result of sequencing, we identified four species of *Cryptosporidium*: *C. parvum* (subtype Ila15G2R1) *C. ryanae*, *C. bovis* and *C. andersoni*. With reference to the age of positive animals, 38.1% (8 / 21) were aged less than or equal to 10 days, 23.8% (5 / 21) between 11 and 20 days and 38.1% (8 / 21) greater than 20 days.

Keyword: Zoonosis, *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni*, *C. ryanae*, *C. bovis* Subgenotipagem.

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium foi originalmente descrito por Tyzzer (TYZZER, 1907), sendo observado pela primeira vez nas células das glândulas gástricas de camundongo e designado como *C. muris*. Em 1912, este mesmo pesquisador relatou a presença de um coccídio menor nas células do intestino delgado dessa mesma espécie animal, nomeando-o *C. parvum* (TYZZER, 1910, 1912).

Protozoários pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* possuem um tamanho entre quatro a seis micrometros (FAYER et al., 2000; FORTES, 2004) e são agentes etiológicos de infecção gastrointestinal em humanos, animais domésticos e outros vertebrados (EL-KHODERY et al., 2007; GILES et al., 2009; RYAN, 2010; SPÓSITO-FILHA et al., 2009). Embora haja informações sobre a presença deste enteroparasito em mais de 79 espécies de mamíferos, os hospedeiros mais conhecidos, além dos humanos, são os ruminantes (ALVES et al., 2006; SANTÍN et al., 2004).

Este parasito é de grande importância na bovinocultura leiteira, devido à sua comprovada patogenicidade e importância zoonótica (BECHER et al., 2004; CARDOSO et al., 2008; CATRO-HERMIDA et al., 2007). Entre as diversas espécies que podem parasitar os bovinos, podemos citar *C. parvum*, *C. andersoni* e *C. bovis* como os mais frequentes (FAYER et al., 2008).

A enfermidade em bovinos é caracterizada por causar diarreia, principalmente em animais jovens, em associação com outros agentes etiológicos, causando grandes perdas econômicas (O'HANDLEY, 2007). A diarreia causada por *C. parvum* é o resultado da invasão e destruição do epitélio, evoluindo para uma moderada atrofia de microvilosidades (DE GRAAF et al., 1999).

Normalmente, a infecção por *C. parvum* nos bezerros ocorre entre a primeira e a quarta semana de vida, com duração da doença em torno de duas semanas (FAYER et al., 1998; O'HANDLEY et al., 1999). Harp et al. (1990) observaram que bezerros infectados com *C. parvum* eram susceptíveis à infecção até os três meses de idade e ressaltou também que bovinos adultos expostos ao parasito, quando jovens, adquiriram imunidade.

Há evidências circunstanciais de que a criptosporidiose humana, causada por *C. parvum*, esteja associada a fazendas que possuem bovinos jovens

infectados e que, provavelmente, bovino seriam uma fonte de infecção deste parasito para o ser humano por meio da contaminação de adubos de origem animal ou de reservatórios de água (THOMPSON, 2003).

Cryptosporidium andersoni é localizado mais freqüentemente no abomaso do gado de corte, principalmente em animais imunodeprimidos no período pós-desmame e em bovinos leiteiros adultos (ENEMARK et al., 2002). *Cryptosporidium bovis* é encontrado predominantemente em animais com faixa etária entre três meses a dois anos de idade (FAYER et al., 2006). Entretanto, a prevalência de *C. bovis* diminui quando o animal completa dois anos de idade, devido a um aumento correspondente da prevalência de *C. andersoni* (FAYER et al., 2007).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros leiteiros da região Noroeste do Estado de São Paulo, utilizando a técnica de coloração negativa com verde malaquita e análise molecular pela *nested* PCR, bem como realizar a classificação molecular das espécies encontradas nesta população animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo experimental

Foram colhidas 196 amostras de fezes de bezerros de diversas raças, com faixas etárias entre zero a 10, 11 a 20 e 21 a 30 dias de idade, em granjas leiteiras nos municípios de Andradina, Castilho, Ilha Solteira, Itapura, Nova Independência, Murutinga do Sul e Mirandópolis, todos localizados na região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil, durante o período de agosto a janeiro de 2008.

Amostras Fecais

As amostras fecais, correspondentes a aproximadamente 10 gramas, foram avaliadas quanto à consistência e classificadas como sólidas ou semi-sólidas (não diarréicas) e pastosas ou líquidas (diarréicas). Posteriormente, foram armazenadas em potes coletores contendo bicromato de potássio 2,5% (concentração final) e analisadas no laboratório de Ornitopatologia da UNESP-campus de Araçatuba/SP.

As alíquotas foram homogeneizadas, tamizadas e submetidas à lavagem por centrifugação com água deionizada, adicionada de 0,02% de Tween 20, seguindo-se a purificação e concentração dos oocistos pelo método de Meloni e Thompson (1996), descrito a seguir: uma alíquota de oito mililitros (mL) das fezes diluídas em água deionizada/tween 20 foi adicionada a um tubo de 15 mL juntamente com dois mL de éter. O tubo foi agitado vigorosamente em vortex, por 30 segundos, e centrifugado a 2000g por oito minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 15 mL, homogeneizado novamente em vortex e submetido à centrifugação, com posterior descarte do sobrenadante. Os sedimentos obtidos nos dois processos de centrifugação foram lavados duas vezes com água deionizada/tween 20, diluídos em solução salina fosfatada tamponada (PBS) e armazenados a 4° C.

No sedimento resultante do processo de purificação foi pesquisada a presença de oocistos de *Cryptosporidium*, por meio da técnica de coloração com verde malaquita (ELLIOT et al., 1999).

Extração de DNA genômico e *nested* PCR

Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA e amplificação por *nested* PCR. A extração de DNA genômico dos oocistos foi realizada de acordo com o protocolo de Boom *et al.*, 1990, com adaptações no volume final (150 µl), utilizando-se chelex 100® (Bio-rad, Hercules, Califórnia, USA) e polivinilpirrolidona K-90 (PVP) (USB, Cleveland, Ohio, USA), proteinase K, isotiocianato de guanidina (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, USA) e recuperação do DNA com sílica ativada (Sigma®, St. Louis, Missouri, USA). Para amplificação do fragmento do gene da 18S rRNA (~ 830 bp) e da glicoproteína GP 60 (~ 550 bp) foram utilizados os iniciadores descritos respectivamente por Xiao et al. (1999) e Peng et al. (2003).

Alinhamento e tradução das seqüências de nucleotídeos e edição final

Os fragmentos resultantes da *nested PCR* foram purificados utilizando-se o Kit de purificação de DNA “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen®) e submetidos a seqüenciamento utilizando-se o “ABI Prism® Dye Terminator Cycling Sequence Kit” (Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento foram realizadas em duplicata e nas direções, utilizando-se os *primers* das reações secundárias.

Após a determinação das sequências de nucleotídeos dos fragmentos amplificados por *nested* PCR, as mesmas foram alinhadas com o auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no GenBank.

Análise Estatística

O teste de Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar a associação entre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e para verificação da igualdade e proporção da ocorrência do parasito, nas diferentes faixas etárias dos animais avaliados. O nível de significância adotado foi de 5,0% e as análises estatísticas foram realizadas empregando-se o programa SAS (SAS Institute, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise parasitológica direta e *nested* PCR

Foi observada, nas amostras fecais dos bezerros, ocorrência de 10,7% (21/196) e 2% (4/196) de amostras positivas, respectivamente por meio do *nested* PCR e microscopia.

A ocorrência de *Cryptosporidium* observada neste estudo foi similar à encontrada no município de Araçatuba por Feitosa et al. (2004), que verificaram 10,3% (43/419) de animais positivos com até 30 dias de idade, pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e de 12,4% (57/459) pela técnica de Sheather. Neste mesmo município, Feitosa et al. (2008), observaram uma maior taxa de excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em bezerros aos sete dias de idade: 14,7% (22/150).

Com referência à faixa etária dos animais positivos, 38,1% (8/21) tinham idade menor ou igual a 10 dias, 23,8% (5/21) entre 11 e 20 dias e 38,1% (8/21) maior que 20 dias. Neste trabalho, a positividade para *Cryptosporidium* foi observada de forma independente da faixa etária, com distribuição praticamente uniforme da infecção, não havendo associação entre as faixas etárias e a ocorrência de *Cryptosporidium* spp.

Diversos pesquisadores realizaram estudos epidemiológicos utilizando métodos moleculares e relataram a presença predominante de *C. parvum* em

bezerros com idade entre zero a dois meses de idade (AZAMI et al., 2007; ENEMARK et al., 2002; NGUYEN et al., 2007; TROTZ-WILLIANS et al., 2005).

Utilizando o método de Ziehl-Neelsen modificado, Garcia e Lima (1994) verificaram que a frequência de infecção em bezerros foi de 10% (2/20) em animais com idade entre 2 a 7 dias, 19,1% (8/42) com 8 e 15 dias, 24,0% (18/75) com 16 a 30 dias e 18,4% (23/125) com 31 a 60 dias de idade. Em um trabalho similar utilizando animais com idade superior a 30 dias, foi encontrada 82,5% (52/63) de ocorrência deste coccídio (SOUZA et al., 1995).

Em relação aos municípios da região estudada, utilizando a *nested* PCR, observou-se um percentual de positividade de 14,7% (10/68) em Andradina, 10,7% (8/75) em Castilho, 14,3% (1/7) em Mirandópolis e 10% (2/20) em Murutinga do Sul. No entanto, nas cidades de Guaraçaí, Ilha Solteira, Itapura e Nova Independência não foram encontradas amostras positivas.

Assim, é de extrema relevância a obtenção de dados de ocorrência e distribuição do parasito por região, para que se possa realizar o planejamento e estabelecimento de medidas de controle. Além do que, se faz necessário o esclarecimento sobre as espécies existentes em bezerros, sobre os parâmetros de previsibilidade e ocorrência sazonal do parasito, para avaliação do risco de infecção.

Seqüenciamento e análise filogenética

Seqüências 18S rRNA e GP 60

Os produtos da PCR foram submetidos a seqüenciamento de DNA, utilizando os primers 18S rRNA e GP 60, em ambas as direções, com posterior análise filogenética e as seqüências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas com as referências do GenBank.

Os isolados de *Cryptosporidium* obtidos nas análises foram identificadas como *C. parvum* (7), *C. andersoni* (1), *C. ryanae* (2) e *C. bovis* (1) (Tabela 3). A análise das seqüências do gene da glicoproteína GP 60 permitiu a identificação de *C. parvum* subtipo Ila15G2R1, utilizando a nomenclatura proposta por Sulaiman et al. (2005).

Diversos pesquisadores tem relatado a ocorrência predominante em bovinos de *C. parvum*, subfamília Ila, com a utilização do gene da glicoproteína

GP 60 (ALVES et al., 2003; PENG et al., 2003; PLUTZER et al., 2007; SOBA et al., 2008; TROTZ-WILLIAMS et al., 2006).

Em estudo realizado nos Estados Unidos por Xiao et al. (2006) em 175 bezerros neonatos, utilizando o GP 60, seis subtipos Ila foram encontrados sendo, o Ila15G2R1 o mais prevalente. O mesmo fato foi observado por Alves et al. (2006) em Portugal, que amplificaram o fragmento deste mesmo gene num total de 62 parasitos onde, nos bovinos, 61 apresentaram este mesmo subtipo.

Utilizando a técnica de centrífugo-flutuação em solução de sacarose e morfometria, Cardoso et al. (2008) verificaram a presença de *C. parvum* e *C. andersoni*, sendo os bezerros mais jovens predominantemente infectados por *C. parvum* (CARDOSO et al., 2008; MALDONADO et al., 1998; NACIRI et al., 1999; FAUBERT-LITVINSK, 2000; CASTRO-HERMIDA et al., 2002; QUILEZ et al., 1996).

Prevalências de 0 a 6,6% em bovinos adultos foram observados em Galícia na França, Minas Gerais no Brasil e em Nova York nos Estados Unidos (VILLACORTA et al., 1991; MAIA et al., 1995; WADE et al., 2000). Prevalência, entre 17,8 a 70,2% de animais infectados também foram constatados na Escócia e no Canadá (SCOTT et al., 1994; MACALLISTER et al., 2005)

C. andersoni tem sido constatado em rebanhos de animais adultos com até 30,7% de prevalência em alguns estudos (ANDERSON, 1990, 1991; LORENZO-LORENZO et al., 1993; DE PENA et al., 1997; SAKAI et al., 2003; ESTEBAN et al., 1995).

Este é o primeiro relato de infecção por *C. ryanae* em bovinos, no Brasil. *C. bovis* já foi identificado por Thomaz et al. (2007) em bovinos no estado de São Paulo. Ambas as espécies aparentemente causam infecção subclínica em bovinos (Fayer et al., 2005; Fayer et al., 2008).

Frente à possibilidade de transmissão cruzada de *C. parvum* entre animais e humanos, pesquisadores têm relatado no Brasil a detecção deste parasito em humanos HIV - positivos (CIMMERMAN et al., 1999; CIMMERMAN et al., 2002; ROSSIT et al., 2007) onde *C. parvum* é considerado como o principal causador de surtos de criptosporidiose em humanos e bovinos, evidenciando o seu potencial zoonótico (FELTUS et al., 2006).

Diferentes métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de bovinos, cada qual com suas

vantagens e desvantagens, porém ainda não há um método universalmente aceito (SMITH, 1998). O percentual superior de positividade encontrado com a *nested* PCR, em relação à microscopia, demonstra a importância do emprego dessa metodologia no monitoramento da infecção. Conforme Kaucner e Stinear (1998) as principais vantagens da PCR, quando comparada com as demais técnicas, são a rapidez, sensibilidade e especificidade, tornando-se um método de diagnóstico seguro, uma vez que se baseia na amplificação e subsequente detecção de seqüências específicas do DNA do parasito.

CONCLUSÃO

Esses achados trazem evidências de que a infecção por diferentes espécies de *Cryptosporidium* spp. está presente na região estudada, o que se traduz em um grave problema de saúde pública, principalmente com o relato predominante do *C. parvum* subtipo Ila15G2R1, que apresenta elevado potencial zoonótico, com risco de infecção para outras espécies animais, incluindo o homem.

REFERÊNCIAS

- AZAMI, M. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cattle in Isfahan, Iran. **Journal Eukaryotic Microbiology**. v. 54, p. 100-102, 2007.
- ALVES, M.; XIAO, L.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. **Parasitology Research**. v.99, p.287–292, 2006.
- BECHER, K. A.; ROBERTSON, I. D.; FRASER, D. M.; PALMER, D. G.; THOMPSON, R. C. A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. **Veterinary Parasitology**. v. 123, p. 1-9, 2004.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and Simple Method for

Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 28, p. 495-503, 1990.

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

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

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

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

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**. v. 45, p. 139-142, 1999.

EL-KHODERY, S. A.; OSMAN, S. A. Cryptosporidiosis in buffalo calves (*Bubalus bubalis*): Prevalence and potential risk factors. **Tropical Animal Health and Production**. v. 40, p. 419-426, 2008.

ENEMARK, H. L.; AHRENS, P.; LOWERY, C. J.; THAMSBORG, S. M.; ENEMARK, J. M. D.; BILLE-HANSEN, V.; LIND, P. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterization. **Veterinary Parasitology**. v. 107, p. 37-49, 2002.

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

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

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*), **Veterinary Parasitology**. v. 156, p. 191-198, 2008.

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

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

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M.; GREINER, E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States. **Veterinary Parasitology**. v. 135, p. 105–112, 2006.

FAYER, R.; GASBARRE, L.; PASQUALI, P.; CANALS, A.; ALMERIA, S.; ZARLENGA, D. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic, clinical, parasitic and immunologic patterns. **International Journal for Parasitology**. v. 28, p. 49–56, 1998.

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

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

FELTUS, D. C.; GIDDINGS, C. W.; SCHNECK, B. L.; MONSON, T.; WARSHAUER, D.; McEVOY, J. M. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. In Wisconsin. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, p.4303-4308, 2006.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. rev. amp. São Paulo: Ícone, 2004, 114-115 p.

GARCIA, A. M.; LIMA, J. D. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com práticas de manejo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 3, p. 23-28, 1994.

GILES, M.; CHALMERS, R. M.; PRICHARD, G.; ELWIN, K.; MUELLER-DOBLIES, D.; CLIFTON-HADLEY, F. A. *Cryptosporidium hominis* in a goat and sheep in the UK. **Veterinary Record**. v.164, p.24-25, 2009.

HALL, I. Genetics of asthma. **The investigational Drugs Journal**. v. 2, p. 754-755, 1999.

HARP, J. A.; WOODMANSEE, D. B.; MOON, H. W. Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. **Infection and Immunity**. v. 58, p. 2237-2240, 1990.

KAUCNER, C.; STINEAR, T. Sensitive and rapid detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription – PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64 p. 743-749, 1998.

LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. M. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 8, p. 791-800, 2003.

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

MALDONADO, C. S.; ATWILL, E. R.; SALTIJERALOAXACA, J. A.; HERRERA, A. L. C. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 36, p. 95-107, 1998.

MELONI, B. P.; THOMPSON, R. C. A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. **Journal of Parasitology**. v. 82, p. 757-762, 1996.

MAIA, A. A. M.; OGASSAWARA, S.; PENA, H. F. J.; HOGE, A. Y. A. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de bovinos em Montes Claros, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 47, p. 717- 719, 1995.

NACIRI, M.; LEFAY, M. P.; MANCASSOLA, R.; POIRIER, P.; CHERMETTE, R. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. **Veterinary Parasitology**. v. 85, p. 245-257, 1999.

NGUYEN, S. T.; NGUYEN, D. T.; LE, D. Q.; HUA, L. N. L.; NGUYEN, T. V.; HONMA, H.; NAKAI, Y. Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium* spp. in cattle in central Viet Nam. **Veterinary Parasitology**. v. 150, p. 357-361, 2007.

O'HANDLEY, R. M.; COCKWILL, C.; MCALLISTER, T. A.; JELINSKY, M.; MORCK, D. W.; OLSON, M. E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 214, p. 391–396, 1999.

O'HANDLEY, R. M. *Cryptosporidium parvum* infection in cattle: are current perceptions accurate? **Trends in Parasitology**. v. 23 p. 477-480, 2007.

PENG, M. M.; WILSON, M. L.; HOLLAND, R. E.; MESHNICK, S. R.; LAL, A. L.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* sp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. **Parasitology Research**. v. 90, p. 175-180, 2003.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genotype and subgenotype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. **Veterinary Parasitology**. v.146, p.357-362, 2007.

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

ROSSIT, A. R.; DE ALMEIDA, M. T.; NOGUEIRA, C. A.; DA COSTA, OLIVEIRA, J. G.; BARBOSA, D. M.; MOSCARDINI, A. C. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from Sao Paulo State, Southeastern Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 57, p. 59-66, 2007.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**. v.124, p.113-120, 2010.

SAKAI, H.; TSUSHIMA, Y.; NAGASAWA, H.; DUCUSIN, R. J. T.; TANABE, S.; UZUKA, Y.; SARASHINA, T. *Cryptosporidium* infection of cattle in the Tokachi District, Hokkaido. **Journal Veterinary Medical Science**. v. 65, p. 125-127, 2003.

SCOTT, C. A.; SMITH, H. V.; GIBBS, H. A. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckler cows. **Veterinary Record**. v. 134, p. 172, 1994.

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

SAS. Statistical Analysis System Institute. **SAS/STAT Procedure guide for personal computers**. Version 5. Cary: SAS Institute, 1999.

SMITH, H. V. Detection of parasites in the environmental. **Parasitology**. v. 117, p.113-141, 1998.

SOBA, B.; LOGAR, J. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. **Parasitology**. v.135, p.1263-1270, 2008.

SOUZA, J. C. P.; LOPES, C. W. G. Cryptosporidiose em bezerros de rebanhos da bacia leiteira Sul-Fluminense, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v. 14, p. 33-36, 1995.

SPÓSITO-FILHA, E.; OLIVEIRA, S. M. **Divulgação técnica criptosporidiose**. **Biológico**. v.71, p.17-19, 2009.

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

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence

alignment aided by quality tools. **Nucleic Acids Researchs**. v. 24, p. 4876-4882, 1997.

THOMPSON, R. C. A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Journal of Parasitology**. v. 89, p. 134–140, 2003.

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

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

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**. v.23, p.487–509, 1910.

TYZZER, E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidian found in the small I intestine of the common mouse. **Archives fur Protistenkunde**. v. 26, p. 394-412, 1912.

VILLACORTA, I.; ARES-MAZAS, E.; LORENZO, M. J. *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep and pigs in Galicia (NW Spain). **Veterinary Parasitology**. v. 38, p. 249- 525, 1991.

WADE, S. E.; MOHAMMED, H. O.; SCHAAF, S. L. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. **Veterinary Parasitology**. v. 93, p. 1-11, 2000.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium*

parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 1578-1583, 1999.

APÊNDICE A - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

POLÍTICA EDITORIAL E INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivo e política editorial

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária tem periodicidade trimestral e destina-se à publicação de trabalhos científicos originais sobre temas relativos a Helmintos, Protozoários e Artrópodes parasitas e assuntos correlatos.

A publicação de artigos dependerá da observância das normas editoriais, dos pareceres do Corpo Editorial e ou relator ad hoc. Apesar de serem de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos nos trabalhos, os editores reservam-se o direito de sugerir ou solicitar modificações necessárias.

A revista tem por finalidade publicar artigos completos, notas de pesquisa e artigos de revisão, sendo estes últimos condicionados a solicitação do corpo editorial.

O (s) autor (res) deverá (ão) submeter o trabalho anexando carta devidamente assinada, declarando ser o artigo original, não publicado anteriormente, salvo sob a forma de resumo em eventos científicos, assim como, declaração de concordância de todos os autores com a submissão do trabalho.

Taxas de publicação e tramitação:

A taxa de tramitação é de R\$ 20,00, por trabalho, pagos no ato da submissão. A taxa de publicação de artigos aceitos é de R\$ 15,00, por página impressa, cujo valor total será informado aos autores quando da editoração. Os pagamentos deverão ser realizados através de depósito na Conta corrente: 28848-9, Agência:

0296-0, Banco do Brasil. Enviar cópia do comprovante de depósito para o fax (16) 3202-4275 a/c Prof^a Rosangela Zacarias Machado.

Não serão cobradas taxas, se pelo menos um dos autores for associado ao Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária.

Apresentação de manuscritos/Instruções aos autores

Na elaboração do texto deverão ser observadas as seguintes normas:

Os trabalhos deverão ser apresentados em três cópias impressas em uma só face, com páginas numeradas, não excedendo a 15 para artigos completos e 5 para notas de pesquisa, digitados em fonte Times New Roman tamanho 12, margens superior e inferior com 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaço entre linhas 1,5. As tabelas e as ilustrações deverão ser apresentadas em folhas separadas e anexadas ao final do trabalho. A versão final dos trabalhos, aceitos para publicação, deverá ser apresentada em disquete (3 ½ polegadas) ou em CD ROM identificados, em editor de texto compatível com o Word for Windows, sem formatação do texto, devidamente acompanhados de uma cópia impressa.

Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês, da forma mais concisa possível, com linguagem sempre que possível no passado e impessoal, com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos e lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente.

Siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso.

As citações no texto devem ser efetuadas pelo sistema autor-data, conforme norma NBR 10520/2002 da ABNT.

Os artigos completos devem ser organizados obedecendo a seguinte seqüência: Título, Autores, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões (ou combinação destes três últimos), Agradecimentos (facultativo) e Referências Bibliográficas.

As notas de pesquisa obedecem a seqüência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escrito em texto corrido.

Características dos elementos de um trabalho científico:

Título/autores: Original e traduzido e logo abaixo do título deve constar o (s) nome(s) do (s) autor (res). No rodapé, vinculação dos autores, órgão financiador e endereço completo para correspondência, incluindo e-mail, telefone e fax.

Abstract: Deve ser sempre escrito em língua inglesa, em um único parágrafo sem deslocamento, e inserido logo após os autores, constituindo-se em tradução fiel do resumo, seguido por key-words.

Resumo: deve conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo sem deslocamento, redigido na língua de origem do trabalho. Não deve conter citações bibliográficas; siglas e abreviações dos nomes de instituições. Deve ser informativo, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. Os trabalhos redigidos em língua inglesa deverão apresentar o resumo em língua portuguesa, seguido das palavras-chave.

Palavras-chave e Key-words: as palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho e seu uso limitado a cinco.

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

Material e Métodos: Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Trabalhos submetidos à avaliação em Comitê de Ética deverão incluir um parágrafo nesta seção para notificação.

Resultados: Sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações, auto-explicativas. O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo.

Discussão: Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente com os resultados, formando o tópico Resultados e Discussão.

Tabelas: Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final. A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário, lembrando que tabelas muito grandes são difíceis de serem lidas. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados. Todos os dados das tabelas devem ser digitados em minúsculo, exceto as siglas.

Figuras: as figuras são ilustrações tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema. Devem ser de boa qualidade e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, tal

qual foram obtidas, nos casos de foto em papel enviar o(s) original(ais). A revista não publica figuras em cores.

Conclusões: As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Neste caso, este item não será necessário.

Agradecimentos: Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências bibliográficas: A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor, sem numeração, registrando-se o nome de todos os autores, usando as normas da ABNT (NBR 6023/2002) simplificada conforme exemplos:

Livro:

LEVINE, J. D. Veterinary Protozoology. Ames: ISU Press, 1985. 414 p.

Artigo completo:

BUGG, R. J.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; TOMPSON, R. C. A. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. Veterinary Journal, v. 157, n. 3, p. 295-301, 1999.

Resumo:

LIMA, N. D. Eimeriose dos ruminantes. In: II SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 20, 1980, Fortaleza. Anais ... Brasília: C B P V, 1980. p. 79-97.

Tese, dissertação:

ARAUJO, M. M. Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de Patos, Paraíba – Brasil. 2002. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

Documento eletrônico:

CDC. Epi Info, 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>>.

Acesso em: 10 jan. 2003.

JESUS, V. L. T.; PEREIRA, M. J. S.; ALVES, P. A. M. Susceptibilidade de raças bovinas a tricomonose genital. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro: CBPV, 2002. 1 CD-ROM.

Endereço para envio de trabalhos:

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado (editora-chefe) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP - Campus Jaboticabal) Depto. de Patologia Veterinária Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n - Zona Rural CEP 14884-900 - Jaboticabal/SP e-mail: zacariascbpv@fcav.unesp.br telefones: (16) 3209 – 2662; (16) 3209 – 2663; (16) 3209 – 2664.

Atenção: para obter informação sobre a tramitação de artigos submetidos antes de outubro de 2008, enviar solicitação para: revista-cbpv@ufrj.br

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](#)