

ÂNGELA IMPERIANO DA CONCEIÇÃO

**INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

GARANHUNS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
ANIMAIS DE PRODUÇÃO

ÂNGELA IMPERIANO DA CONCEIÇÃO

INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gílcia Aparecida de Carvalho

GARANHUNS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

C744i Conceição, Ângela Imperiano da

Infecção por *Cryptosporidium* spp. em Bezerros no Estado de Pernambuco, Brasil / Ângela Imperiano da Conceição. – Garanhuns, 2020.

82 f. : il.

Orientador: Gílcia Aparecida de Carvalho .
Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, Garanhuns, BR - PE, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Bovino 2. Protozoários 3. Zoonose 4. Ruminante I. Carvalho, Gílcia Aparecida de, orient. II. Título

CDD 636.2

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
ANIMAIS DE PRODUÇÃO

INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL

Dissertação elaborada por:
ÂNGELA IMPERIANO DA CONCEIÇÃO

Apresentada em: 17/02/2020

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a GÍLCIA APARECIDA DE CARVALHO
Orientadora - Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

Dr^a CARLA LOPES DE MENDONÇA
Clínica de Bovinos de Garanhuns – UFRPE

Prof. Dr. LEUCIO CÂMARA ALVES
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Aos meus pais, por todo amor, dedicação,
compreensão e tudo que me proporcionam
viver,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as suas dádivas em minha vida, por me sustentar e mostrar por onde caminhar. Minha fé transforma meus sonhos em possibilidades.

A minha família, pelo incentivo, apoio incondicional, cuidado, dedicação e amor. Pai (Loester Imperiano) e mãe (Elizete Ana), meus maiores incentivadores e exemplos, obrigada por aceitarem minhas escolhas, entenderem a distância e muitas vezes minha ausência, por nunca soltarem a minha mão e sempre me esperarem felizes e ansiosos.

Aos meus irmãos, Wédipo Imperiano e Hértilla Imperiano, por serem exatamente como são: referência de casa e acalento. Às minhas sobrinhas, Júlia Imperiano, Ana Beatriz Imperiano e Laura Imperiano, que me iluminam, alegram, e onde meu coração faz morada. Aos meus cunhados, Ana Carla e Sérgio Costa, pela valiosa amizade e apoio. A minha amiga querida, Monique Avelino, pelo carinho, cumplicidade e olhares compreendidos.

A professora Gílcia Aparecida, pela orientação, ensinamentos e oportunidade de trabalharmos juntas nestes dois anos. Ao professor Rafael Ramos por todo apoio, atenção e disponibilidade.

A Clínica de Bovinos de Garanhuns, por proporcionar tantos ensinamentos, científicos e de vida, e a todos que a compõe e a fazem ser a referência que é. Em especial agradeço a Dr^a Carla Lopes, Dr. José Augusto, Dr^a Maria Isabel e aos demais técnicos pelo incentivo e ajuda em todos os momentos que precisei. Aqui diante de inúmeros desafios reafirmei internamente meu desejo de vida profissional, e dei os primeiros passos para alcançá-lo.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária UFRPE, na pessoa do professor Leucio Alves, pela colaboração neste trabalho.

A Ana Clara Sarzedas e Lucas Spósito, pela inestimável amizade, companheirismo, e por sempre me estenderem a mão e tornarem até os dias mais tensos e saudosos de casa mais leves. Aos amigos, Tatiane Vitor, Rodolpho Rebouças, Gliere Soares, Regina Nóbrega, Leonardo Magno, Ana Katharina, Elizabeth Hortêncio, Willder Rafael, Jessica Pessoa, Carlos Ubirajara, Tatiene Móta e Lucia Macedo que compartilharam comigo anseios e alegrias da pós-graduação, me incentivaram, entenderam, e fizeram esses 2 anos mais felizes e harmoniosos.

Aos amigos que fazem parte do Laboratório de Parasitologia – LAPAR, da Unidade Acadêmica de Garanhuns, e Residentes da CBG, pela valiosa contribuição neste trabalho, disponibilidade e bons momentos vividos, em especial à Bárbara de Andrade, Raquel Colares,

Thatyane Carla, Nitalmo Leite, Tayrlla Polessa, Guilherme Mota, David Azevedo, Enoana Barbosa e Alexandre Siqueira.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo que me permitiu realizar esta pós-graduação.

Aos animais, dignos de toda dedicação, cuidado e respeito.

Aos proprietários que permitiram a realização das coletas e aplicação dos questionários epidemiológicos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

Sou grata!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A bovinocultura representa um dos grandes esteios econômicos do estado do Pernambuco. Entretanto, protozooses intestinais constituem um grande entrave para o desenvolvimento do segmento. A infecção por protozoários do gênero *Cryptosporidium* provoca sérios danos no epitélio intestinal durante seu desenvolvimento no hospedeiro. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o parasitismo por *Cryptosporidium* spp. em bezerros provenientes de municípios da Microrregião do Agreste Meridional do estado de Pernambuco, Brasil. Para tal, realizou-se um estudo transversal onde amostras fecais de bezerros (n=385) foram coletadas e posteriormente processadas por meio da técnica de centrífugo-sedimentação fecal em formol-éter com posterior coloração pela técnica Ziehl-Neelsen modificada. O estudo dos fatores de risco foi realizado empregando análise univariada. Além disto, descreve-se aqui um surto isolado de criptosporidose em uma fazenda de gado da raça Nelore, município de São Benedito do Sul (08°48'30" S e 35°57'06"W), Mata Meridional pernambucana, no qual utilizou-se a técnica supracitada em associação ao imunoensaio com o kit comercial MERIFLUOR® para o processamento das amostras fecais de bezerros (n=40). A prevalência para infecção por *Cryptosporidium* spp. no Agreste Meridional foi de 25,71% (99/385). A criação concomitante de espécies diferentes no mesmo ambiente (OR = 3,33; p = 0,0000), o sistema de criação semi-intensivo (OR = 1,70; p = 0,024) e a ausência de limpeza nas instalações (OR = 1,64; p = 0,029), mostraram-se estatisticamente associadas a presença da infecção. Na região do surto, o teste MERIFLUOR® detectou 45% (18/40) de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., e 15% (6/40) para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. concomitantemente. Os resultados desta pesquisa, inédita nas áreas de estudo, comprovam a presença do protozoário nas criações de bovinos, e, portanto, deve-se ressaltar a importância da implementação de medidas que reduzam perdas econômicas do setor produtivo e o impacto negativo na saúde pública, por se tratar de um agente zoonótico responsável por grandes transtornos em todo o mundo.

Palavras-chaves: protozoários, bovinos, diarreia, fatores de risco, zoonose

ABSTRACT

Cattle production represents one of the great economic supports of the state of Pernambuco. However, intestinal protozooses constitute a major barrier to segment development. Infection with protozoa of the genus *Cryptosporidium* causes serious damage to the intestinal epithelium during its development in the host. Thus, the objective of this work was to study the parasitism by *Cryptosporidium* spp. in calves from municipalities of the Southern Agreste Microregion of the state of Pernambuco, Brazil. For this purpose, a cross-sectional study was performed in which fecal samples of calves (385) were collected and further processed by the technique of fecal centrifugal sedimentation in formaldehyde with subsequent staining by the modified Ziehl-Neelsen technique. The study of risk factors was performed through univariate analysis. In addition, an isolated outbreak of cryptosporidiosis is described in a Nelore cattle farm, municipality of São Benedito do Sul (08°48'30 "S and 35°57'06" W), Pernambuco Southern Mata, in which the aforementioned technique in association with immunoassay with the commercial MERIFLUOR® kit for the processing of calf fecal samples (40). The prevalence for *Cryptosporidium* spp. in the Southeast was 25.71% (99/385). Concomitant rearing of different species in the same environment (OR = 3.33; p = 0.0000), semi-intensive rearing system (OR = 1.70; p = 0.024) and lack of on-site cleaning (OR = 1.64; p = 0.029) were statistically associated with the presence of infection. In the outbreak region, the MERIFLUOR® test detected 45% (18/40) of *Cryptosporidium* spp., and 15% (6/40) positive samples for *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. concomitantly. The results of this research, unprecedented in the study areas, prove the presence of protozoan in cattle production systems, and, therefore, the importance of implementing measures that reduce economic losses of the productive sector and the negative impact on public health should be emphasized, because it is a zoonotic agent responsible for major disorders worldwide.

Keywords: protozoa, cattle, diarrhea, risk factors, zoonosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Aumento de 100x em Microscópio óptico. (FONTE: Arquivo pessoal).....	18
Figura 2 - Ciclo de <i>Cryptosporidium</i> spp. com ao epitélio intestinal. Adaptado de: BOUZID <i>et al.</i> (2013).	21
Figura 3 - Ciclo de <i>Cryptosporidium</i> spp. sem adesão ao epitélio intestinal (epicelular não obrigatório). Adaptado de: CLODE; KOH; THOMPSON (2015).....	22
Figura 4 - Principais problemas sanitários que levam a perdas de bezerras de até um ano de idade em fazendas leiteiras brasileiras. Adaptado de: IILB (2019).....	29

Artigo 1: Prevalence and risk factors associated to the infection by *Cryptosporidium* spp. in calves.

Figure 1. Map of the Agreste Microregion of Pernambuco.....	55
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros.....19

Artigo 1: Prevalence and risk factors associated to the infection by *Cryptosporidium* spp. in calves.

Table 1. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. between age groups in calves with and without diarrhea in the Agreste Microregion of Pernambuco..... 53

Table 2. Univariate analysis of risk factors associated with *Cryptosporidium* spp. in calves of the state of Pernambuco..... 54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 GERAL.....	15
2.2 ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 BOVINOCULTURA NO NORDESTE	16
3.2 HISTÓRICO SOBRE <i>Cryptosporidium</i> spp.	16
3.3 AGENTE ETIOLÓGICO E TAXONOMIA.....	17
3.4 MORFOLOGIA DE <i>Cryptosporidium</i> spp.	18
3.5 HOSPEDEIROS	19
3.5.1 Bovinos	20
3.6 CICLO BIOLÓGICO	20
3.6.1 Ciclo com adesão às células epiteliais do hospedeiro	20
3.6.2 Ciclo sem adesão às células epiteliais hospedeiras	22
3.7 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FATORES DE RISCO PARA A TRANSMISSÃO	23
3.7.1 Fatores relacionados a transmissão para bovinos	24
3.8 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	24
3.9 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	25
3.11 DIAGNÓSTICO	26
3.12 <i>Cryptosporidium</i> spp. E O IMPACTO NA PRODUÇÃO DE BOVINOS	28
3.13 <i>Cryptosporidium</i> spp. E SAÚDE PÚBLICA	29
3.14 PROFILAXIA	31
REFERÊNCIAS	32
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	42
4.1 ARTIGO 1: Prevalence and risk factors associated to the infection by <i>Cryptosporidium</i> spp. in calves	42
4.2 ARTIGO 2: <i>Cryptosporidium</i> spp. in calves: a description of an outbreak.....	56
APÊNDICES	65
APÊNDICE A - Termo de Consentimento.....	65
APÊNDICE B - Questionário Epidemiológico	66

APÊNDICE C - Folder Educativo sobre Criptosporidiose	69
ANEXOS.....	71
ANEXO A - Instruções aos Autores (Revista The Veterinary Journal).....	71
ANEXO B - Instruções aos Autores (Tropical Animal Health and Production).....	76

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura representa um dos grandes esteios econômicos do país, sendo responsável por 30% do produto interno bruto do agronegócio (AGRAER, 2015; CEPEA, 2016; EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017). Entretanto, infecções por protozoários e nematódeos gastrintestinais constituem um grande entrave para expansão deste segmento. Neste sentido, os parasitos que mais destacam-se são: *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp., *Strongyloides* spp., *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* spp., *Dictyocaulus* spp., *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp., e *Giardia* spp. (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; RIET-CORREA *et al.*, 2007).

Protozoários pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* tem distribuição cosmopolita, elevado potencial zoonótico e destaca-se entre as causas mais comuns de diarreia neonatal, ocasionando diversos prejuízos para sanidade/produção animal, onde bezerros até três meses de idade são os mais susceptíveis a infecção (ADLER *et al.*, 2017; GONG *et al.*, 2017; RYAN; FAYER; XIAO, 2014; SANTIN; TROUT; FAYER, 2008). Estes, invadem e multiplicam-se em células epiteliais do trato gastrintestinal dos hospedeiros (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012; THOMSON *et al.*, 2017). O desenvolvimento do parasito provoca lesões intestinais e atrofia das microvilosidades do hospedeiro, e por consequência há diminuição da absorção dos nutrientes, da conversão alimentar e ganho de peso, além de diarreia osmótica, decorrente da síndrome de má absorção, que em animais jovens geralmente cursa com desidratação severa, podendo causar a morte (OLSON *et al.*, 2011; ORTOLANI; SOARES, 2003; SHARMAA; SHARMAB; MISHRAC, 2019; TZIPORI, 1983; ZAMBRISKI *et al.*, 2013).

A transmissão ocorre pela via fecal-oral, e a depender da idade e do estado imunológico do indivíduo infectado, a doença é auto limitante. A morbidade é elevada nos jovens, os mais acometidos, entretanto quando não há associação com outros enteropatógenos como *Eimeria* spp., *Salmonella* spp., coronaviruses e rotaviruses a mortalidade é baixa (CHEN *et al.*, 2002; FEITOSA *et al.*, 2004; SMITH; NICHOLS, 2010). É considerada também como uma enfermidade emergente e reemergente em humanos, onde os grupos de risco incluem crianças, idosos e pessoas imunocoprometidas (MADRID; BASTOS; JAYME, 2015; ROBERTSON; CHALMERS, 2013). Os bovinos representam as principais fontes de risco de infecção para os humanos, excepcionalmente no meio rural devido ao manejo inadequado dos rebanhos e maior proximidade com as fezes contaminadas com *Cryptosporidium* spp. ou quando estas entram em contato com água utilizada para consumo sem tratamento prévio (DELAFOSSÉ *et al.*, 2015;

GONG *et al.*, 2017; MANYAZEVAL *et al.*, 2018; MUNIZ NETA *et al.*, 2010; ORTOLANI; SOARES, 2003; SHARMAA; SHARMAB; MISHRAC, 2019).

Diferentes espécies de *Cryptosporidium* já foram identificadas e descritas como patógenos em diversos hospedeiros vertebrados, como mamíferos terrestres e aquáticos, aves, répteis e peixes (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; RYAN *et al.*, 2015). Nos bovinos, as espécies *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae* destacam-se como as mais importantes por suas características epidemiológicas e impacto causado na produção animal e saúde pública (COUTO; BOMFIM, 2012; SANTIN; TROUT; FAYER, 2008). Em humanos, acrescentam-se ainda *C. homini* e *C. meleagridis* entre as espécies mais estudadas (DELAFOSSÉ *et al.*, 2015; GONG *et al.*, 2017; STRIEPEN, 2013

A capacidade de permanecerem viáveis no ambiente por longos períodos, aliada a necessidade da pequena quantidade para causar a infecção, são fatores que facilitam a disseminação destes protozoários e ameaçam a sanidade do rebanho (STRIEPEN, 2013). Por estes motivos, frequentemente estes parasitos são alvos de pesquisas em diversos países, e trazem prevalências com variâncias de 10,2% a 43,1% (SMITH, *et al.*, 2014; URIE *et al.*, 2018). No Brasil, valores de prevalência entre 10,2%, a 63,54% foram encontrados (HECKLER *et al.*, 2015; TOLEDO *et al.*, 2017). No estado de Pernambuco, a infecção foi estudada em pequenos ruminantes, demonstrando prevalência de 3,7 (TEMBUE *et al.*, 2006) e 6,3 (SOUZA *et al.*, 2015) para ovinos e caprinos, respectivamente.

Apesar da infecção gerar perdas econômicas e problemas sanitários, dados sobre a presença do parasito na espécie bovina no estado de Pernambuco são inéditos. Desta forma, é de grande importância verificar a frequência do parasitismo por *Cryptosporidium* spp. em bezerros de municípios pertencentes ao Agreste Meridional do Pernambuco.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar a presença da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros provenientes de municípios da Microrregião do Agreste Meridional do Estado de Pernambuco, Brasil.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros;
- Identificar os fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros da área de estudo;
- Descrever o primeiro surto de criptosporidiose em bezerros nelores no estado de Pernambuco.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BOVINOCULTURA NO NORDESTE

A pecuária, por motivos históricos, socioeconômicos e geográficos, representa um dos grandes esteios da economia do país. A atividade além de abastecer o mercado nacional e gerar empregos, proporciona ao Brasil lugar de destaque no comércio internacional. No Nordeste, a bovinocultura além de ter grande importância como atividade de subsistência, se projeta de forma emergente no cenário nacional (AGRAER, 2015; ARAUJO, 2015; CEPEA, 2016).

O Brasil é o país que mais exporta carne bovina e é o quarto maior produtor de leite, sendo a região nordeste responsável por aproximadamente 10% e 6% destas produções, respectivamente (EMBRAPA, 2018; IBGE, 2018). No segundo trimestre de 2018, o estado de Pernambuco foi produtivamente responsável por mais de 17 toneladas de carne e mais de 57 milhões litros de leite cru, recebidos por estabelecimentos submetidos à inspeção sanitária (IBGE, 2018), sendo 80% desta última produção oriunda da bacia leiteira do estado, localizada na Microrregião do Agreste Meridional (SDT/MDA, 2011).

Entretanto, existem diversos entraves que limitam a exploração e expansão do setor, sendo estes fatores vinculados a peculiaridade climática da região e o manejo do rebanho, principalmente ao que se refere à nutrição e à sanidade animal (ARAUJO, 2015; STOTZER *et al.*, 2014). Em relação à sanidade, destacam-se as infecções parasitárias, dentre elas as causadas por protozoários, como por exemplo por *Cryptosporidium* spp., que reduz a conversão alimentar e a produtividade do rebanho acometido (ORTOLANI; SOARES, 2003; ZAMBRISKI *et al.*, 2013).

3.2 HISTÓRICO SOBRE *Cryptosporidium* spp.

Os primeiros relatos da infecção por *Cryptosporidium* spp. datam de 1907, quando o parasitologista Ernest Edward Tyzzer descreveu o parasitismo por *C. muris* em epitélio gástrico de camundongos de laboratório. Em 1912, em continuidade aos seus estudos, o mesmo autor identificou e diferenciou o *C. parvum* da primeira espécie relatada e demonstrou a transmissão fecal-oral do protozoário (TYZZER, 1912).

Em 1955, uma nova espécie (*Cryptosporidium meleagridis*) foi identificada pelo pesquisador Slavin, durante um surto acometendo perus jovens (SLAVIN, 1955). No entanto, apenas em 1971 o protozoário tornou-se de interesse veterinário, quando a infecção pelo parasito foi associada à diarreia severa em bezerros (FAYER *et al.*, 1997; PANCIERA;

THOMASSEN; GARNER, 1971; STERLING; ARROWOOD, 1992). No Brasil, o primeiro diagnóstico da infecção por este parasito em bovinos foi registrado em 1988, no estado de São Paulo, onde um lote de 23 bezerros foi positivo para a presença de oocistos nas fezes (MODOLO; GONÇALVES; KUCHEMUCK, 1988).

Em humanos, os primeiros registros ocorreram nos anos 1970, nos Estados Unidos, após descrição de dois casos clínicos de diarreia, em uma criança e posteriormente em um adulto imunossuprimido (MEISEL *et al.*, 1976; NIME *et al.*, 1976). No Brasil, os primeiros diagnósticos de criptosporidiose foram em 1985 (WEIKEL *et al.*, 1985). Desde então, diversos estudos associam o *Cryptosporidium* spp. aos distúrbios gastrintestinais, e evidenciam seu impacto na saúde pública (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007; SANTIN, 2013). Em 2004, a enfermidade foi oficialmente adicionada na lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde – OMS (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006).

3.3 AGENTE ETIOLÓGICO E TAXONOMIA

Apesar dos diversos estudos filogenéticos, ainda há divergências quanto à taxonomia do *Cryptosporidium* spp., sendo proposto (CAVALIER-SMITH, 2014; CLODE; KOH; THOMPSON, 2015; HIJJAWI *et al.*, 2002; RYAN; FAYER; XIAO, 2014; XIAO *et al.*, 1998):

Reino Protista
 Sub Reino Protozoa
 Filo Apicomplexa
 Classe Gregarinomorpha
 Subclasse Cryptogregarina
 Ordem Eucoccidiorida
 Família Cryptosporidiidae
 Gênero *Cryptosporidium*.

De acordo com Cavalier-Smith (2014) o protozoário foi reclassificado na subclasse Cryptogregarina. Análises microscópicas e moleculares evidenciam cada vez mais semelhanças do gênero *Cryptosporidium* com espécies do gênero *Gregarina*, tais como: resistência a fármacos coccidiostáticos e/ou coccidas; tamanho micrométrico dos estágios de desenvolvimentos e oocistos; capacidade dos oocistos causarem auto-infecção; presença de organela alimentadora; possível habilidade de completar o seu ciclo de vida na ausência de

ligação com uma célula hospedeira (ALDEYARBI; KARANIS, 2015; ALVES, 2006; CAVALIER-SMITH, 2014; CLODE; KOH; THOMPSON, 2015; HIJAWI *et al.*, 2002; RYAN *et al.*, 2016).

A presença de estágios de desenvolvimento extracelulares durante o ciclo biológico classifica as espécies deste gênero como epicelulares não obrigatórios, evidenciando a capacidade de desenvolvimento quando ligados a célula do hospedeiro, através do vacúolo parasitóforo, ou não, de maneira extracelular. Tais situações podem ocorrer simultaneamente (ALDEYARBI; KARANIS, 2016; BOROWSKI *et al.*, 2010; CLODE; KOH; THOMPSON, 2015).

Por meio de estudos moleculares diversas espécies do gênero foram validadas nos últimos anos. Atualmente, mais de 30 são reconhecidas (RYAN *et al.*, 2016; THOMSON *et al.*, 2017). Destas, pelo menos 17 são infectantes para a espécie humana, mas o *Cryptosporidium hominis* e o *Cryptosporidium parvum* são os responsáveis pela maioria das infecções (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012; RYAN; FAYER; XIAO, 2014; XIAO *et al.*, 2004; XIAO, 2010).

3.4 MORFOLOGIA DE *Cryptosporidium* spp.

Oocistos de espécies do gênero *Cryptosporidium* são morfologicamente reconhecidos como estruturas esféricas ou ovóides (Figura 1) de parede lisa, que medem entre 3,0-7,4 μm X 4,5-5,6 μm (GRECA, 2010; THOMSON *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 1998).

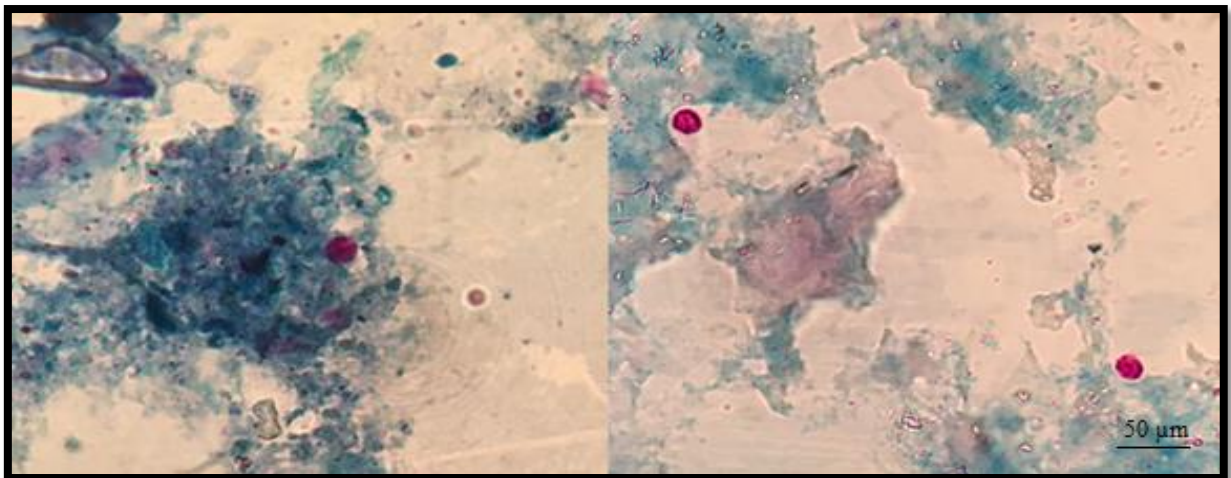


Figura 1 - Oocistos de *Cryptosporidium* spp. corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Aumento de 100x em Microscópio óptico. (FONTE: Arquivo pessoal).

É possível haver a formação de dois tipos de oocistos, sendo diferenciados pela espessura de suas paredes. Internamente, estes possuem quatro esporozoítos, que durante o ciclo biológico desenvolvem-se para trofozoítos. Outras formas de estágios são: merozoítos tipo I e II, macrogametócito, microgametócito e zigoto (BOSA, 2014; BOWMAN, 2010; THOMPSON *et al.*, 2005; THOMSON *et al.*, 2017).

3.5 HOSPEDEIROS

Espécies do gênero *Cryptosporidium* possuem ampla variedade de hospedeiros vertebrados (Tabela 1), como mamíferos terrestres (incluindo o homem) e aquáticos, aves, répteis, anfíbios e peixes, acometendo principalmente indivíduos jovens e imunodeprimidos (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; RYAN *et al.*, 2015).

Tabela 1 - Principais espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros.

ESPÉCIE	PRINCIPAL HOSPEDEIRO	OUTROS HOSPEDEIROS	REFERÊNCIA
<i>C. muris</i>	Roedores	Bovinos, Homem, Equinos, Felinos e Canino	TYZZER (1912)
<i>C. parvum</i>	Bovinos	Homem, Caprinos, Ovinos, Aves, Equinos, Canino e Felinos	TYZZER (1912)
<i>C. meleagridis</i>	Homem, Perus	Bovinos, Aves e Ovinos	SLAVIN (1955)
<i>C. felis</i>	Felinos	Bovinos, Homem	ISEKI (1979)
<i>C. canis</i>	Caninos	Bovinos, Homem e Felinos	TZIPORI; CAMPBELL (1981)
<i>C. serpentis</i>	Serpentes	Bovinos	LEVINE (1984)
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	Homem, Camelo e Ovinos	LINDSAY <i>et al.</i> (2000)
<i>C. hominis</i>	Homem	Bovinos, Primatas e Ovinos	MORGAN-RYAN <i>et al.</i> (2002)
<i>C. suis</i>	Suínos	Bovinos e Homem	RYAN <i>et al.</i> (2004)
<i>C. bovis</i>	Bovinos	Homem	FAYER; SANTÍN; XIAO (2005)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos	-	FAYER; SANTÍN; TROUT (2008)
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos	Bovinos	FAYER; SANTÍN (2009)
<i>C. ubiquitum</i>	-	Bovinos, Homem, Caprinos, Ovinos, Roedores e Caninos	FAYER; SANTÍN; MACARISIN (2010)

3.5.1 Bovinos

Bovinos são acometidos principalmente quando jovens, mas os adultos podem representar fonte importante de transmissão, mesmo não desenvolvendo sinais clínicos. Diversas espécies de *Cryptosporidium* podem acometer os bovinos, entretanto, apenas quatro representam maior importância epidemiológica, sendo elas: *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae* (COUTO; BOMFIM, 2012; PAZ E SILVA, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2016; SANTIN; TROUT; FAYER, 2008; XIAO *et al.*, 2004).

C. parvum, espécie mais estudada devido sua relevância zoonótica, elevada ocorrência e patogenicidade em ruminantes, acomete principalmente bezerros de até dois meses de idade. *C. bovis* e *C. ryanae*, apresentam maior ocorrência em bezerros não lactentes, enquanto *C. andersoni* comumente encontrado em novilhas e gado adulto (GONG *et al.*, 2017; SANTIN, 2013).

3.6 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. é autoxeno (BOWMAN, 2010). Entretanto, há evidências de que o parasito pode completar o ciclo de duas maneiras distintas (com ou sem adesão às células do hospedeiro), aumentando a produção de oocistos (CLODE; KOH; THOMPSON, 2015), descritos a seguir:

3.6.1 Ciclo com adesão às células epiteliais do hospedeiro

O ciclo tem início a partir da ingestão de oocistos viáveis pelo hospedeiro, e quando alcançam o sistema gastrointestinal desencistam após a ação de enzimas pancreáticas, sais biliares e temperatura. Posteriormente, cada oocisto libera quatro esporozoítos na luz intestinal. Estes se aderem a membrana plasmática dos enterócitos formando um vacúolo parasitóforo extracitoplasmático. Esse processo também pode ocorrer nas células dos sistemas respiratório e urinário. Posteriormente, se desenvolvem para trofozoítos e inicia-se a multiplicação assexuada (esporogonia ou merogonia), produzindo os merontes de primeira geração. A ruptura desse meronte resulta na liberação de merozoítos que se aderem a outras células do hospedeiro, produzindo novos merozoítos do mesmo tipo ou desenvolvem-se em merontes de segunda geração, que contém 4 merozoítos. Alguns merontes de segunda geração se diferenciam em macrogametócitos (gametas femininos) ou microgametócitos (gametas masculinos), iniciando a fase sexuada chamada gametogonia. Os microgamontes tornam-se multinucleados e liberam

os microgametas maduros que fertilizam os macrogametas nos macrogametócitos, dando origem a um zigoto (BOSA, 2014; CHALMERS; DAVIES, 2010; FAYER, 1997; THOMPSON *et al.*, 2005).

Ainda no hospedeiro, os zigotos formados passam por mais uma fase de desenvolvimento assexuado (esporogonia), o que origina oocistos esporulados contendo quatro esporozoítos, sendo esta a forma liberada do vacúolo parasitóforo que é posteriormente eliminado nas fezes (Figura 2) (AMARANTE, 1992; CHALMERS; DAVIES, 2010).

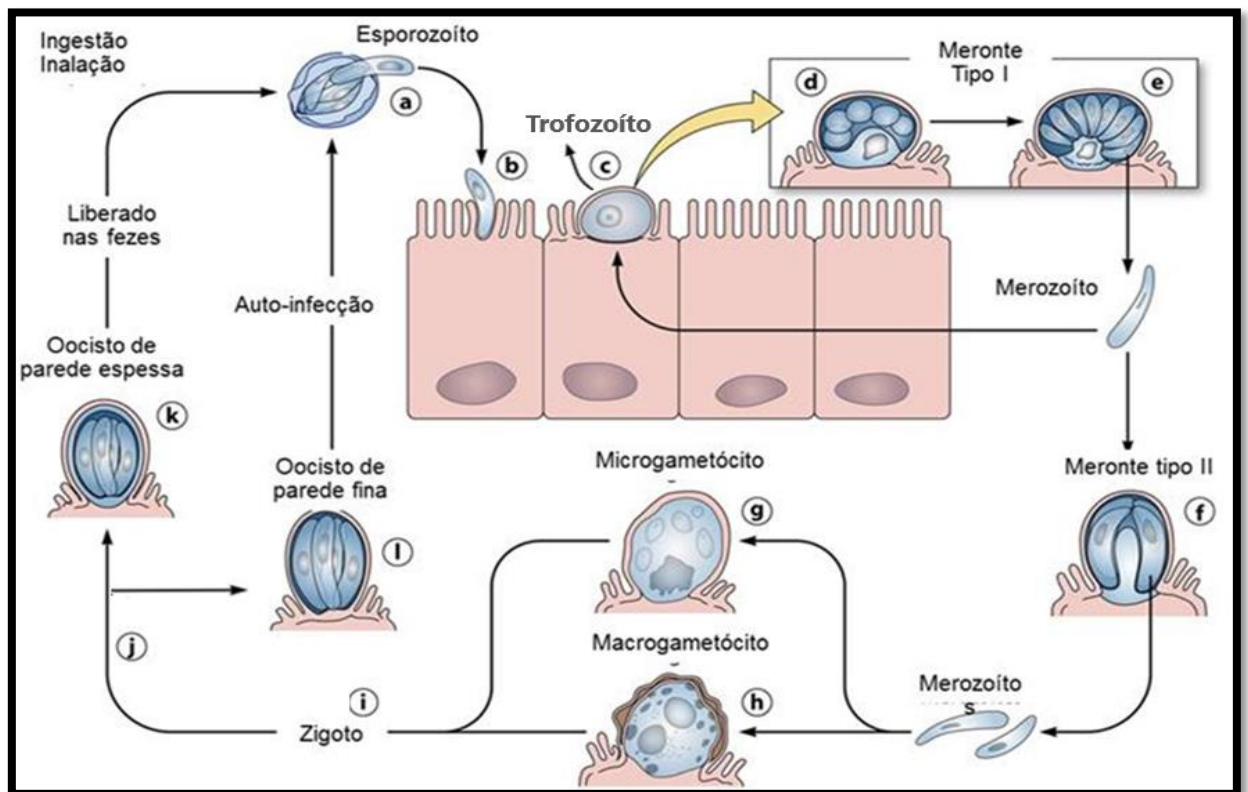


Figura 2 - Ciclo de *Cryptosporidium* spp. com ao epitélio intestinal. Adaptado de: BOUZID *et al.* (2013).

Os oocistos maduros constituem a forma infectante do parasito, e podem apresentar parede delgada que geralmente rompe ainda no hospedeiro, liberando os esporozoítos e iniciando uma auto-infecção; ou parede espessa, a qual confere resistência ao parasito. Os oocistos com parede espessa são eliminados com as fezes, contaminando o ambiente no qual permanece viável durante vários meses, e com capacidade de infectar outros hospedeiros. O ciclo tem duração aproximada entre dois a dez dias (XIAO, 2010).

3.6.2 Ciclo sem adesão às células epiteliais hospedeiras

Estudos evidenciam que após início do ciclo o *Cryptosporidium* spp. se assemelha mais uma vez com espécies do gênero *Gregarinas*, através do processo chamado “Syzygy ou Sigízia”. Este evento é caracterizado pela união de trofozoítos em cadeias, os quais desenvolvem uma membrana ao seu redor (correspondente ao vacúolo parasitóforo) e posteriormente sofrem merogonia, iniciando a fase assexuada do ciclo e originando os merontes de primeira geração com diversos merozoítos (BOROWSKI *et al.*, 2010; HIJAWI *et al.*, 2002). Estes, diferenciam-se em merontes de segunda geração após uma nova merogonia. Posteriormente ocorre diferenciação dos merozoítos de segunda geração em micro ou macrogamontes. Os gametas femininos após serem fertilizados originam o zigoto, e a seguir ocorre reprodução assexuada (esporogonia), desenvolvendo oocistos de parede espessa e de parede fina (Figura 3). Desta maneira, o parasito multiplica-se sem aparente adesão epicelular com células hospedeiras, seja no lúmen intestinal, epitélio pulmonar, ou mesmo no ambiente (ALDEYARBI; KARANIS, 2015; CLODE; KOH; THOMPSON, 2015).

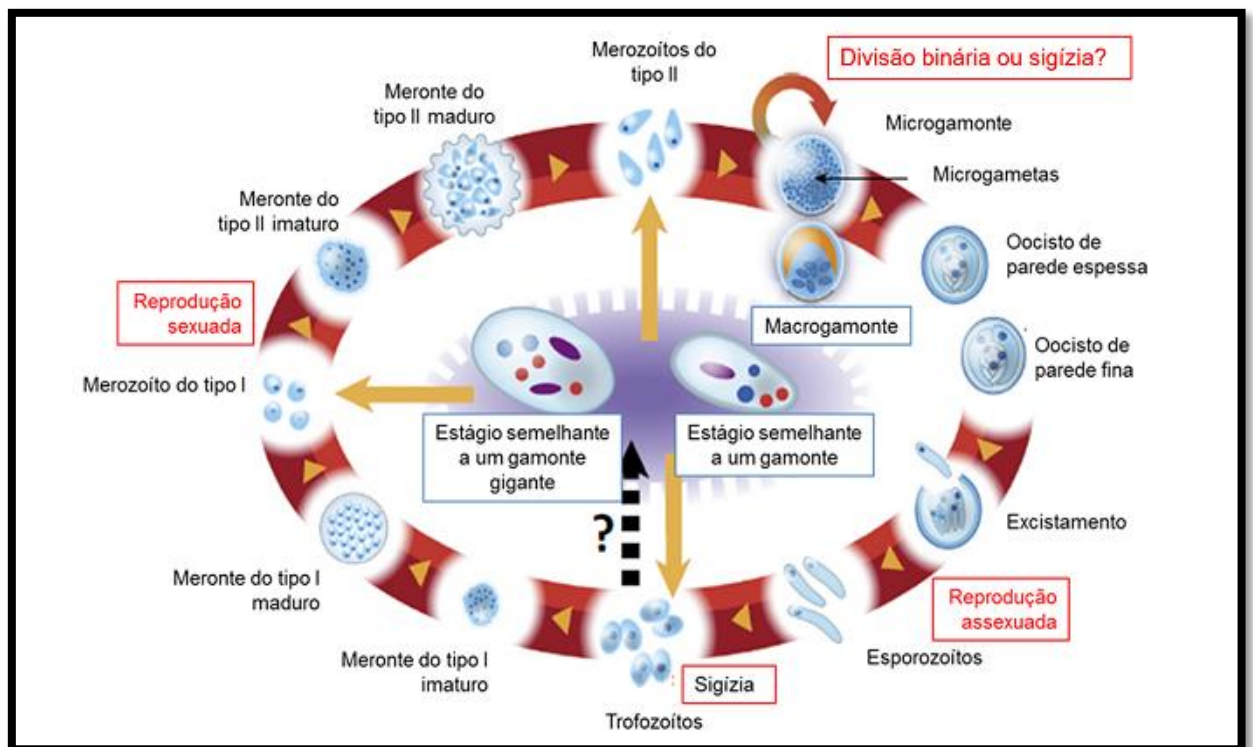


Figura 3 - Ciclo de *Cryptosporidium* spp. sem adesão ao epitélio intestinal (epicelular não obrigatório). Adaptado de: CLODE; KOH; THOMPSON (2015).

3.7 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FATORES DE RISCO PARA A TRANSMISSÃO

A facilidade de disseminação, resistência em diversos ambientes e o elevado potencial zoonótico, tornam o *Cryptosporidium* spp. extremamente importantes para a sanidade animal e saúde pública (MEIRELES, 2010; XIAO *et al.*, 2004).

A transmissão do protozoário é dada pela via fecal-oral de oocistos, e pode ocorrer de forma direta através do contato com fezes de indivíduos infectados, seja este da mesma espécie ou não, e independente da apresentação clínica da enfermidade; ou de maneira indireta, através do consumo de água e alimentos não tratados, ou ambiente e fômites contaminados com oocistos viáveis (ADLER *et al.*, 2017; BRIGGS *et al.*, 2014; CACCIÒ; CHALMERS, 2016; SMITH; NICHOLS, 2010; XIAO, 2010;).

É também relatado a transmissão entre parceiros sexuais, funcionários e pacientes de hospital ou crianças que frequentam creches, além dos inúmeros casos de transmissão zoonótica, a maioria envolvendo profissionais e estudantes que manuseiam animais infectados, especialmente bovinos (CACCIÒ; CHALMERS, 2016; O'DONOGHUE, 1995).

A alta infectividade do protozoário, necessidade de um pequeno número para infectar um novo indivíduo e resistência no ambiente são considerados como facilitadores para a transmissão dos oocistos. A dose infectante de *Cryptosporidium* spp. geralmente é baixa (10 – 100 oocistos), porém esta pode sofrer variação de acordo com a fonte de infecção, a espécie envolvida, a viabilidade e exposição dos susceptíveis aos oocistos, por exemplo. Apesar disto, a virulência do *Cryptosporidium* spp. é considerada baixa (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; PEREIRA *et al.*, 2008; ROBERTSON; CHALMERS, 2013; STRIEPEN, 2013).

Oocistos de *Cryptosporidium* spp viáveis têm sido recuperados a partir de amostras de águas de superfície (rios, córregos e reservatórios), efluentes de esgoto tratados e não tratados, piscina filtrada, água do mar próximo a saída de esgoto, e mais importante, de suprimentos de água potável tratada em várias regiões, ressaltando a importância deste meio de transmissão tanto para animais como em humanos, pois promove de maneira rápida a disseminação dos oocistos a um número considerável de susceptíveis (CACCIÒ; CHALMERS, 2016; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; FREITAS *et al.*, 2017; O'DONOGHUE, 1995).

Estes, permanecem infectantes por seis meses ou mais em ambientes com umidade adequada e temperatura próxima de 20°C. São resistentes também sob imersão na água doce (aproximadamente 176 dias) e do mar (aproximadamente 35 dias), dessecação até a temperatura

de 70°C e congelamento a -10°C por alguns dias. Ainda apresentam resistência a desinfecção química a base de amônia, álcool, aldeídos, cloro ou compostos alcalinos (FALCHI, 2006; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; ROBERTSON; CHALMERS, 2013). Poucas soluções alcançam a inativação do agente em ambientes contaminados, e frequentemente é necessária uma concentração mais elevada do que a recomenda pelo fabricante, tais como cloro comercial não diluído a 70%, peróxido de hidrogênio 3%, formaldeído a 10% e amônia a 10%, entretanto, nestas concentrações alguns destes desinfetantes não são apropriados para uso comum ou tratamento de água (O'DONOGHUE, 1995; PEREIRA *et al.*, 2008; XIAO; FAYER, 2008).

3.7.1 Fatores relacionados a transmissão para bovinos

Dentre os fatores relacionados ao hospedeiro que influenciam no contágio e desenvolvimento da criptosporidiose, a idade e a competência imunológica são os mais importantes. Bezerros até três meses de idade são os mais susceptíveis a infecção, e embora a verdadeira incidência desta seja desconhecida, destaca-se entre as causas mais comuns de diarreia neonatal e tem grande e negativo impacto na sanidade/produção animal (ADLER *et al.*, 2017; GONG *et al.*, 2017; RYAN; FAYER; XIAO, 2014; SANTIN; TROUT; FAYER, 2008). A raça, bem como o sexo do hospedeiro, não representa fator de risco para a infecção (ALMEIDA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Ambientais como aglomerações ou superlotação de espaços físicos em fazendas, criação concomitante de espécies diferentes, limpezas periódicas deficitárias, pouca ventilação e inserção de raios solares nos alojamentos, excepcionalmente nos piquetes de animais jovens, associada a grande quantidade de oocistos eliminados nas fezes, também estão diretamente ligados ao aumento transmissão do protozoário nas criações de bezerros (ALMEIDA *et al.*, 2010; DELAFOSSE *et al.*, 2015; EDERLI *et al.*, 2008; UTSI *et al.*, 2015).

3.8 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A infecção por *Cryptosporidium* spp. tem distribuição cosmopolita, excluindo a Antártica. A prevalência relatada em humanos tem variação entre 1-4% e de 3-20% em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente. Valores ainda maiores são encontrados (10-30%) ao considerar os indivíduos assintomáticos de países não desenvolvidos (WHO, 2006). Deve-se ressaltar que estes dados são subdiagnosticado e subnotificado na maioria dos países (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017).

Frequentemente a prevalência da infecção por este protozoário em bovinos é objeto de pesquisas em diversos países como Irã – 28,3% (ASADPOUR *et al.*, 2013), Inglaterra e País de Gales – 10,2% (SMITH, *et al.*, 2014), Argentina – 16% (GARRO *et al.*, 2016), China – 11,9% (GONG *et al.*, 2017), e Estados Unidos da América – 43,1% (URIE *et al.*, 2018).

Estudos epidemiológicos, realizados nos últimos anos, elucidam que a enfermidade se encontra presente nos rebanhos brasileiro de bovinos e que a prevalência é heterogênea entre estados: Mato Grosso – 40% (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2007), São Paulo – 19,7% (TEIXEIRA *et al.*, 2011), Rio de Janeiro – 19,6% (COUTO; LIMA; BOMFIM, 2014), Minas Gerais – 17,1% (RODRIGUES *et al.*, 2016), Mato Grosso do Sul – 63,54% (HECKLER *et al.*, 2015), Paraná – 10,2% (TOLEDO *et al.*, 2017) e Piauí – 16,43 % (ABREU *et al.*, 2019). No estado do Pernambuco, infecções por este protozoário foram estudadas e comprovadas nas espécies ovina – 3,7% (TEMBUE *et al.*, 2006) e caprina – 6,3% (SOUZA *et al.*, 2015) foram comprovadas, entretanto, que dados sobre a enfermidade em bovinos são escassos.

3.9 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A gravidade das lesões varia de acordo com as espécies envolvidas, quantidade de inóculo, patogenicidade do mesmo e do status imunológico do hospedeiro (RYAN *et al.*, 2014).

O processo de desenvolvimento nas células hospedeiras e a ruptura do vacúolo durante as mudanças de fases do ciclo, determinam mudanças na superfície do epitélio, que podem ser evidenciadas desde a fusão das microvilosidades, metaplasia, ulceração, atrofia ou até degeneração, o que também pode representar uma porta de entrada para outras infecções entéricas (ENEMARK *et al.*, 2003; GRAAF *et al.*, 1999; OLSON *et al.*, 2011). Neste período, aumento dos linfonodos e eosinofilia da lâmina própria também podem ser encontrados (ENEMARK *et al.*, 2003).

Estas alterações da mucosa intestinal levam a inadequada absorção de nutrientes, fluidos e eletrólitos presentes no lúmen, resultando no excesso de partículas osmoticamente ativas, o que promove o surgimento de uma diarreia osmótica, caracterizando a síndrome da má absorção, encontrada na criptosporidiose e em outras infecções espoliativas (ORTOLANI; SOARES, 2003; PAZ E SILVA, 2007; ZAMBRISKI *et al.*, 2013).

Além disto, o tipo de invasão intracelular, mas extracitoplasmática, permite que o protozoário não sofra injúrias pela ação do sistema imunológico, e ao mesmo tempo, se beneficie do transporte de solutos através da membrana da célula parasitada (ABRAHAMSEN

et al., 2004; FAYER *et al.*, 1997; FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012; THOMSON *et al.*, 2017).

A principal sintomatologia associada ao parasitismo do *Cryptosporidium* spp. nas criações de bovinos é a diarreia (GONG *et al.*, 2017). Os animais mais susceptíveis são os bezerros, correspondendo da idade neonatal até aproximadamente oito a dez semanas, nos quais a enfermidade cursa geralmente com severa enterite (GONG *et al.*, 2017; TZIPORI, 1983).

Como consequência da gastroenterite, é comum os acometidos apresentarem concomitantemente desidratação, desequilíbrio eletrolítico com acidose metabólica, hipoglicemia, apatia, anorexia, emagrecimento e retardamento do crescimento, podendo resultar ou não em morte. Portanto, a enfermidade promove significativas e importantes perdas econômicas para animais de produção (MUNIZ NETA *et al.*, 2010; OLSON *et al.*, 2011; ZAMBRISKI *et al.*, 2013).

Animais com idade superior a dois meses podem apresentar sinais clínicos tão intensos quanto os mais jovens, a depender dos fatores de riscos que possam estar associados. Quando adultos, dificilmente irão apresentar sinais clínicos, mas são considerados como potenciais fontes de infecção para o rebanho e de contaminação ambiental (MUNIZ NETA *et al.*, 2010; ORTOLANI; SOARES, 2003).

Em humanos, é observada diarreia, desidratação de moderada a severa, vômitos, inapetência e perda de peso. Tais sinais são encontrados principalmente em pacientes imunocomprometidos, portadores de doenças crônicas e/ou debilitantes ou em indivíduos com sistema imune não desenvolvido totalmente, como crianças (CHEN *et al.*, 2002; STRIEPEN, 2013). A enfermidade, nestes casos é crônica, e pode ainda manifestar quadros intensamente espoliativos, febre, dor abdominal, e envolvimento do sistema respiratório e/ou urinário. Nos imunocompetentes, a doença geralmente é auto-limitante, onde a diarreia aguda é o principal sintoma. (ALVES, 2006; DELAFOSSE *et al.*, 2015; THOMSON *et al.*, 2017).

3.11 DIAGNÓSTICO

Ao longo dos anos, diversas técnicas foram adaptadas para o diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* spp., a maioria delas envolvendo a observação direta de oocistos por microscopia. Para tal, são utilizados métodos parasitológicos de concentração baseados em princípios de flutuação ou centrífugo sedimentação de amostras como fezes, tecidos, aspirados

duodenais, secreções do sistema respiratório, com colorações específicas (ALMEIDA, 2006; MUNIZ NETA *et al.*, 2010).

As técnicas que frequentemente são utilizadas para concentração de oocistos são: Centrifugo-flutuação em solução saturada de sacarose - Sheather (ANDERSON, 1981), Centrifugo-sedimentação em formol-éter (DAVID; FREBAULT; THOREL, 1989; RITCHIE, 1948), e a Centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (FAUST *et al.*, 1938). Já as técnicas de coloração especiais mais difundidas estão: Ziehl-Neelsen modificado/ácido-resistente, Kinyoun, Dimetil Sulfóxido com carbol-fucsina, Safranina, Coloração Modificada de Kohn e Verde Malequita (ELLIOT; MORGAN; THOMPSON, 1999; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; HENRIKSEN; POHLENZ, 1981; MA; SOAVE, 1983). Em exames histopatológicos, a visualização do parasito é obtida através de colorações específicas como a Giemsa ou hematoxilina-eosina (CHALMERS; DAVIES, 2010; GRECA, 2010; O'DONOGHUE, 1995;).

Vale ressaltar que devido à ausência de características morfológicas específicas e ao reduzido tamanho e carga parasitária (principalmente em amostra oriunda de animal assintomático), não é possível a identificação das diferentes espécies de *Cryptosporidium* utilizando-se apenas a morfometria microscópica. Portanto, o resultado do exame é limitado quanto a presença ou não de oocistos, fazendo-se necessário a utilização de métodos imunológicos e moleculares para obtenção de resultados mais detalhados (MUNIZ NETA *et al.*, 2010; XIAO; FAYER, 2008).

Apesar de serem difundidas e apresentarem vantagens como praticidade, baixo custo e boa eficácia, as técnicas supracitadas apresentam menor sensibilidade e especificidade quando comparadas aos métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase – PCR (BOSA, 2014; KAUSHIK *et al.*, 2008),

É possível por meio da PCR a caracterização da espécie, genotipagem e conseqüentemente, o conhecimento do potencial zoonótico da amostra analisada (ALMEIDA, 2006; CHALMERS; DAVIES, 2010; MUNIZ NETA *et al.*, 2010). No entanto, mesmo apresentando diversas vantagens (rapidez, sensibilidade e acurácia) esta técnica tem muitas limitações, e sua utilidade pode variar dependendo de vários fatores, sendo os principais o custo, necessidade de instalações adequadas, a variabilidade de sensibilidade e especificidade entre os iniciadores/*primers* existentes e a possibilidade de contaminantes ambientais interferirem em

ensaios qualitativos e/ou quantitativos (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; MORGAN *et al.*, 1998).

Outras técnicas que envolvem detecção de anticorpos ou imunoglobulinas específicas, como a Imunofluorescência Direta e Indireta com anticorpos monoclonais, hemoaglutinação passiva reversa, Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA), e ensaios imunocromatográficos qualitativos de fase sólida também são implementadas em diversos estudos. Testes de detecção direta do parasito geralmente apresentam alta especificidade e sensibilidade, em contrapartida, testes imunológicos para detecção de anticorpos contra *Cryptosporidium* spp., apesar de simples, rápidos e específicos, apresentam baixa sensibilidade, e não ser possível diferenciar uma reação frente a uma infecção antecedente ou ativa. Além disto, apesar do oocisto apresentar antígenos em sua parede capaz de promover resposta imunológica, muitos destes são os mesmos em várias espécies, e desta forma, não existem anticorpos que diferenciem espécies de *Cryptosporidium* (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; HUBER, 2007).

3.12 *Cryptosporidium* spp. E O IMPACTO NA PRODUÇÃO DE BOVINOS

Cerca de 15% das bezerras produzidas em fazendas leiteiras do Brasil não ultrapassam a faixa etária de um ano de idade e, dentre os principais problemas sanitários que levam a tais perdas (Figura 4), as diarreias/gastroenterites lideram os prejuízos econômicos ocasionados ao setor (IILB, 2019). Sabendo que uma das causas parasitárias mais frequentes de diarreias em bovinos é a presença de *Cryptosporidium* spp., a real dimensão do que o parasitismo por este protozoário proporciona é preocupante, excepcionalmente a longo prazo (LACERDA, 2014; STOTZER *et al.*, 2014; THOMSON *et al.*, 2017).

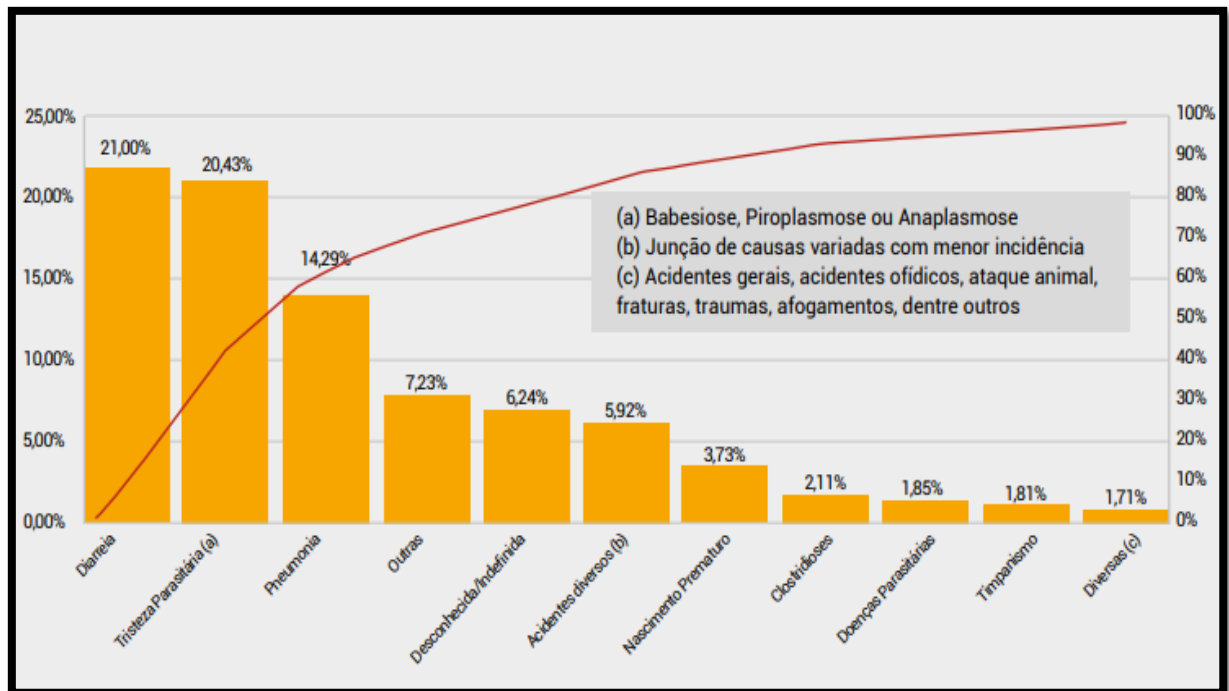


Figura 4 - Principais problemas sanitários que levam a perdas de bezerras de até um ano de idade em fazendas leiteiras brasileiras. Adaptado de: IILB (2019).

A infecção por *Cryptosporidium* spp. em rebanhos de ruminantes domésticos compromete negativamente a atividade pecuária. O ganho de peso corporal de bezerros infectados chega a apresentar redução de 55%, quando comparado a animais não parasitados (ABREU *et al.*, 2019). Em criações de ovinos na Austrália a infecção resultou em carcaças mais leves no momento do abate, com redução de 1,65 kg a 2,6 kg (JACOBSON *et al.*, 2016; SWEENY *et al.*, 2011).

Desta forma, além de haver redução significativa do retorno do capital investido em insumos e genética do rebanho, muito devido ao atraso no crescimento, baixa produtividade, ocorrência de mortes e descarte involuntário de animais acometidos, custos com o tratamento ou prevenção também devem ser contabilizados, principalmente por estes não estarem unicamente interligados aos gastos com medicações ou vacinas (STOTZER *et al.*, 2014; THOMSON *et al.*, 2017).

3.13 *Cryptosporidium* spp. E SAÚDE PÚBLICA

A infecção por *Cryptosporidium* spp. tem forte ligação com a saúde pública há décadas, onde estudos apontam este parasito como responsável por mais de 60% de todos os casos de surtos registrados associados ao consumo de água contaminada com protozoários causadores

de doenças no mundo (BALDURSSON; KARANIS, 2011; CHECKLEY *et al.*, 2015; EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017; SANTIN, 2013) Entre estes, há destaque para o surto ocorrido em Milwaukee, Estados Unidos da América, no ano de 1993, onde, devido a contaminação da rede de abastecimento público de água, 403.000 mil pessoas foram infectadas por *Cryptosporidium* spp. e cerca de 50 vieram a óbito (MACKENZIE; HOXIE; PROCTOR, 1994).

Por estes incidentes, *Cryptosporidium* spp. está classificado como um patógeno de referência para a avaliação da qualidade da água potável, e ranqueado em quinto lugar dentre os parasitos alimentares mais importantes pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO, e a Organização Mundial da Saúde - OMS (FAO; WHO, 2014; MEDEMA *et al.*, 2006; RYAN; FAYER; XIAO, 2014).

Os oocistos geram um grande desafio para as indústrias de tratamento hídrico, ultrapassando sistemas de filtragem e apresentando resistência a vários desinfetantes, incluindo o hipoclorito de sódio a 10%, método mais utilizado na desinfecção da água nos reservatórios públicos (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017; MEDEMA *et al.*, 2006). Análises realizadas em águas de superfície, reservatórios e esgotos, frequentemente detectam a presença do *Cryptosporidium* spp.. Em Londrina, Paraná, espécies do protozoário, dentre elas *C. parvum* e *C. Suis*, foram encontradas em 84% das amostras de esgoto bruto em 8% do esgoto tratado (MARTINS *et al.*, 2019). Araújo e colaboradores (2018) isolaram oocistos de *C. parvum* e *C. homini* em 58% das amostras (29/50) oriundas de duas bacias hidrográficas do estado de São Paulo. Já em Viçosa, Minas Gerais, 43% das amostras analisadas, oriundas do reservatório que abastece a cidade, formam positivas, e mais uma vez o *C. parvum* foi detectado (ANDRADE *et al.*, 2018).

No estado de Pernambuco, pesquisas evidenciaram a presença de protozoários como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp em água bruta e tratada na região Metropolitana da capital do estado, e posteriormente nas águas do Rio Beberibe (FREITAS *et al.* 2015; FREITAS *et al.*, 2017; MACHADO *et al.* 2009).

Destaca-se ainda que a maioria das águas de superfícies são encontradas nas proximidades de fazendas agrícolas ou de criações de animais domésticos. O manejo inadequado dos resíduos destas propriedades, como as fezes dos animais (principalmente as de bovinos), frequentemente comprometem a qualidade dos reservatórios hídricos pela inerente possibilidade de contaminação (ALMEIDA, 2006; ANDRADE *et al.*, 2018; FERREIRA;

BORGES, 2002; MACHADO *et al.*,2009). Portanto, o acompanhamento da presença do *Cryptosporidium* spp. nestes ambientes é de suma importância, pois representam potencial risco a saúde pública (ANDRADE *et al.*,2018).

3.14 PROFILAXIA

As estratégias higiênico-sanitárias são indispensáveis para minimizar os fatores de risco e conseqüentemente os impactos negativos da infecção por *Cryptosporidium* spp., uma vez que ainda não há vacinas disponíveis (BALDURSSON; KARANIS, 2011; MEAD, 2014).

Pode-se incluir como medidas adequadas de manejo a colostragem e fornecimento balanceado de alimentação, limpeza periódica das instalações, higienização de comedouros e bebedouros, divisão dos animais de acordo com a idade, remoção e eliminação das fezes ou cama úmida, remoção de animais diarreicos do lote para cuidados específicos. Estas ações, além de comuns a outras necessidades da produção animal, são capazes de reduzir a exposição de indivíduos susceptíveis aos oocistos deste protozoário, ou a outros patógenos, que possam estar presentes no ambiente (COSENDEY; FIUZA; OLIVEIRA, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2016; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2011).

Em humanos, práticas que evitem o contato direto com fezes de indivíduos infectados (especialmente de crianças e animais jovens de fazenda com diarreia), o consumo de água (durante atividades recreativas ou não) ou alimentos não tratados e fômites que possam estar contaminados com oocistos *Cryptosporidium* spp. são as principais formas de prevenção (ADLER *et al.*, 2017; CACCIÒ; CHALMERS, 2016).

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSEN, M.S.; *et al.* Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v.304, p.441-445, 2004.
- ABREU, B.S.; *et al.* Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and its association with ponderal development and diarrhea episodes in nellore mixed breed cattle. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.13, n.1, p.24-29, 2019.
- ADLER, S.; *et al.* Symptoms and risk factors of *Cryptosporidium hominis* infection in children: data from a large waterborne outbreak in Sweden. **Parasitology Research**, v.116, n.10, p.1-6, 2017.
- AGRAER - Agencia de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural. O agronegócio e o comércio mundial. **Governo do Estado do Mato Grosso do Sul**. 2015. Disponível em: <<http://www.agraer.ms.gov.br/o-agronegocio-e-o-comercio-mundial-sao-temas-de-palestra-de-fernando-lamas-e-rui-daher-em-sp/>>. Acesso em: 14 de abril de 2019.
- ALDEYARBI, H.M.; KARANIS, P. Electron microscopic observation of the early stages of asexual multiplication and development of *Cryptosporidium parvum* in *in vitro* axenic culture. **European Journal of Protistology**, v.52, p.36-44, 2016.
- ALDEYARBI, H.M.; KARANIS, P. The ultra-structural similarities between *Cryptosporidium parvum* and the *gregarines*. **The Journal Eukaryotic Microbiology**, v.63, n.1, p.79-85, 2015.
- ALMEIDA, A.J. **Diagnóstico e fatores de risco da criptosporidiose bovina na microrregião de Campos dos Goytacazes-rj, e identificação de *Cryptosporidium parvum* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2006. 80 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes, rio de janeiro, 2006.
- ALMEIDA, A.J.; *et al.* Risk factors associated with the occurrence of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1325-1330, 2010.
- ALVES, M.M.F. **Caracterização epidemiológica da criptosporidiose em Portugal, por estudo molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp. de humanos e de animais**. 2006. 227p. Tese (Doutorado). Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal, 2006.
- AMADI, B.; *et al.* High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. **BMC Infectious Diseases**. v.9, 195p. 2009.
- AMARANTE, H.M.B. **Ocorrência do *Cryptosporidium* sp. em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes em Curitiba**. 1992. 122p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 1992.
- ANDERSON, B.C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.178, n.9, p.892-984, 1981.

ANDRADE, R.C.; *et al.* *Cryptosporidium* genotyping and land use mapping for hazard identification and source tracking in a small mixed rural–urban watershed in Southeastern Brazil. **Journal of Water and Health**, v.17, n.1, p.149-159, 2018.

ARAUJO, J.A. Produtividade e eficiência no setor agropecuário do nordeste brasileiro. **Interações**, v.16, n.2, p. 385-394, 2015.

ASADPOUR, M. *et al.* Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in Mashhad Area, Khorasan Razavi Province, Iran. **Iranian Journal Parasitology**, v.8, n.4, p.601-607, 2013.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. **Water Research**. v.45, p.6603-6614, 2011.

BOROWSKI, H.; *et al.* Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. **Parasitology**, v.137, p.13-26, 2010.

BOSA, C.R. **Deteção e identificação de *Cryptosporidium* spp. Tyzzer, 1907 em fezes de animais e em água do zoológico municipal de Curitiba, Paraná, Brasil.** 2014. 124 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BOUZID, M.; *et al.* *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, n.26, p.115-134, 2013.

BOWMAN, D.D. **Georgis - Parasitologia veterinária.** Rio de Janeiro: Elsevier, 9. ed. 2010. 783 p.

BRANKSTON, G.; *et al.* Assessing the impact of environmental exposures and *Cryptosporidium* infection in cattle on human incidence of cryptosporidiosis in Southwestern Ontario, Canada. **PLOS ONE**, v.13, n.4, 2018.

BRIGGS, A.D.; *et al.* Approaches to the detection of very small, common, and easily missed outbreaks that together contribute substantially to human *Cryptosporidium* infection. **Epidemiology Infectology**, v. 2, n.1, p.1-8, 2014.

CACCIÒ, S.M.; CHALMERS, R.M; Human cryptosporidiosis in Europe. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, p.471-480, 2016.

CARDOSO, J.M.S. *et al.* Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p.239-242, 2008.

CARVALHO, J.G.; *et al.* Estudo longitudinal da infecção por enteropatógenos em bezerros neonatos, com diarreia, sob diferentes estratégias de aleitamento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.6, p.529-536, 2014.

CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. **European Journal of Protistology**, v.50, n.5, 472-495, 2014.

- CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **PIB do Agronegócio BRASIL 2016**. 2016. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>>. Acesso em: 20 de abril de 2019.
- CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P. Minireview: Clinical criptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.138-146, 2010.
- CHECKLEY, W.; *et al.* A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. **Lancet Infectious Diseases**, v.15, p.85–94, 2015.
- CHEN, X.M.; *et al.* Cryptosporidiosis. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 346, p. 1723-1731, 2002.
- CLODE, P.L.; KOH, W.H.; THOMPSON, R.C.A. Life without a host cell: What is *Cryptosporidium*? **Trends in Parasitology**, v.31, n.12, p.614-624, 2015.
- COSENDEY, R.I.J.; FIUZA, V.R.S.; OLIVEIRA, F.C.R. Importância do manejo na criptosporidiose em criações de ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p. 209-214, 2008.
- COSTA, L.B.; *et al.* *Cryptosporidium* –malnutrition interactions: mucosal disruption, cytokines, and TLR signaling in a weaned murine model. **Journal of Parasitology**, v.97, p.1113-1120, 2011.
- COUTO, M.C.M.; BOMFIM, T.C.B. Espécies de *Cryptosporidium* que infectam bovinos: características etiológicas e epidemiológicas. **Veterinária Notícias**, v.18, n.2, p.94-109, 2012.
- COUTO, M.C.M.; LIMA, M.F.; BOMFIM, C.B. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. **Acta Tropica**, v.130, p.117-122, 2014.
- DAVID, H.; FREBAULT, V.L.; THOREL, M.F. Méthodes de laboratoire pour mycobacteriologie Clinique. **Institut Pasteur**, 24p., 1989.
- DELAFOSSÉ, A.; *et al.* *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in Western France. **Preventive Veterinary Medicine**, v.118, n.4, p. 406-412, 2015.
- ECDC - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Annual epidemiological report 2014—food- and waterborne diseases and zoonoses**. Stockholm: ECDC; 2014.
- EDERLI, B.B.; *et al.* Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* sp. em cães domiciliados na cidade de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p.250-266, 2008.
- EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks—an update 2011–2016. **Water Research**, v.114, p.14–22, 2017.
- ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, A.R.S. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.45, n.3, p.139-142, 1999.

EMBRAPA. **Indicadores Leite e Derivados**. 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/176816/1/Indicadores-leite-78-Maio.pdf>>. Acesso em: 28 de junho de 2019.

EMA - European Medicines Agency Veterinary Medicines. **EUROPEAN PUBLIC ASSESSMENT REPORT (EPAR): HALOCUR (EPAR summary for the public)**. 2007. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/documents/overview/halocur-epar-summary-public_en.pdf>. Acesso em: 18 de Dezembro de 2018.

ENEMARK, H.L.; *et al.* Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* evaluation of an animal infection model. **Veterinary Parasitology**, v.113, n.1, p.35-57, 2003.

FALCHI, R.L.R. **Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS**. 90p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Rio Grande do Sul, 2006.

FAO - Food and Agriculture Organization; WHO - World Health Organization. **Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites**. Rome: Microbiological Risk Assessment Series, 2014. 324 p.

FAUST, E.C.; *et al.* A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. **The American Journal of Tropical Medicine**, v.18, p.169-178, 1938.

FAYER, R.; *et al.* *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.49-56, 1997.

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. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v.164, p.192-200, 2009.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.23-32, 2010.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). **Veterinary Parasitology**, v.156, n. 3-4, p. 191-198, 2008.

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

FEITOSA, F.L.F.; *et al.* Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.1, 2004.

FERREIRA, M.S., BORGES, A.S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.443-457, 2002.

- FIUZA, V.R.S.; *et al.* Occurrence of *Cryptosporidium andersoni* in Brazilian Cattle. **Journal of Parasitology**, n.97, v.5, p. 952-953, 2011.
- FRANCO, R.M.B.; BRANCO, N.; LEAL, D.A.G. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**. v.41, n.2, p.119-135, 2012.
- FREITAS, D.A.; *et al.* Occurrence of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and other pathogenic intestinal parasites in the Beberibe River in the State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n.1, p.220-223, 2015.
- FREITAS, D.A.; *et al.* *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. removal by bank filtration at Beberibe River, Brazil. **River Research and Applications**, v.33, n.7, p.1079-1087, 2017.
- GARRO, C.G.; *et al.* Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. **Parasite Epidemiology and Control**, v.1, p.36-41, 2016.
- GONG, C.; *et al.* Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in China: a review. **Parasite**, v.24, n.1, p.8, 2017.
- GRAAF, D.C.; *et al.* A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1269-1287, 1999.
- GRECA, M.P.S. **Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e região metropolitana.** 2010. 93p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2010.
- HECKLER, R.P.; *et al.* First genetic identification of *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA14G2R1 in beef cattle in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.121, p.391-394, 2015.
- HEIGES, M.; *et al.* CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.419-422, 2006.
- HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.22, n.3-4, p.594-596, 1981.
- HIJAWI, N.S.; *et al.* Successful *in vitro* cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**, v.32, p.1719-1726, 2002.
- HOLSBACK, L.; *et al.* *Cryptosporidium* occurrence in ruminants from the North Pioneer mesoregion of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v.27, n.2, p.248-253, 2018.
- HUBER, F.; *et al.* Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.30, n.150, p.65-74, 2007.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária abril a junho de 2018**. 2018. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_2tri.pdf>. Acesso em: 14 de abril de 2019.

IILB – Índice IDEAGRE do Leite Brasileiro. **Boletim do Índice IDEAGRE do Leite Brasileiro**. 2019. Disponível em: <www.iilb.com.br>. Acesso em: 30 de julho de 2019.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v.28, p.13-35, 1979.

JACOBSON, C.; *et al.* Greater intensity and frequency of *Cryptosporidium* and *Giardia* oocyst shedding beyond the neonatal period is associated with reductions in growth, carcass weight and dressing efficiency in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.228, p.42–51, 2016.

KAR, S.; *et al.* Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v.177, p.366–370, 2011.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v.5, n.1, p.1-38, 2007.

KAUSHIK, K.; *et al.* Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. **Acta Tropica**, v.107, n.1, p.1-7, 2008.

LACERDA, R.C.P. **Impacto económico da diarreia neonatal em explorações extensivas de bovinos de carne no concelho de moura**. 2014. 60p. Dissertação (Mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, Portugal, 2014.

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

LINDSAY, D.S.; *Cryptosporidium andersonin* sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.47, p.91-95, 2000.

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

MACHADO, E.C.L.; *et al.* Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife-PE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1459-1462, 2009.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted throughout the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v.331, p.161-167, 1994.

MADRID, D.M.C; BASTOS, T.S.A; JAYME, V.S. Emergência da criptosporidiose e impactos na saúde humana e animal. **Enciclopédia Biosfera**, v.11 n.22; p.2150-2171, 2015.

- MANYAZEWA, A.; *et al.* Prevalence, risk factors and molecular characterization of *Cryptosporidium* infection in cattle in Addis Ababa and its environs, Ethiopia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.13, p.79-84, 2018.
- MARTINS, F.D.C.; *et al.* Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage from an urban area in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.28, n.2, p.291-297, 2019.
- MEAD, J.R. Prospects for immunotherapy and vaccines against *Cryptosporidium*. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.10, p.1505-1513, 2014.
- MEDEMA, G.; *et al.* WHO Guidelines for drinking water quality: *Cryptosporidium*. **World Health Organization**, v.138, 2006.
- MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.4, p. 197-204, 2010.
- MEISEL, J.L.; *et al.* Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v.70, n.6, p.1156-1160, 1976.
- MODOLO, JR; GONÇALVES, RC; KUCHEMUCK, M.R.G. Ocorrência de criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.10, n.1, p.9-10, 1988.
- MORGAN, U.M.; *et al.* Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* oocysts using rDNA sequencing and direct PCR analysis. **Journal of Parasitology**, v.83, p.825-830, 1998.
- MORGAN-RYAN, U.M.; *et al.* *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.49, n.6, p.433-440, 2002.
- MUNIZ NETA, E.S.; *et al.* Comparação das técnicas de ziehl-neelsen modificada e contraste de fase na detecção de oocistos do gênero *Cryptosporidium tyzzer*, 1907 (Apicomplexa: cryptosporidiidae) em bovinos assintomáticos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.32, n.4, p.201-204, 2010.
- NIME, F.A.; *et al.* Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v.70, p.592-598, 1976.
- O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. **International Journal for Parasitology**, v.25, n.2, p.139-195, 1995.
- OLIVEIRA FILHO, J.P.; *et al.* Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.10, p.419-424, 2007.
- OLIVEIRA, S.; WILMSEN, M.O.; ROSALINSKI-MORAES, F. Criptosporidiose em ruminantes: revisão. **PUBVET**, v.6, n.8, 2012.
- OLSON, M.E.; *et al.* Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v.20, n.4, p.185-191, 2011.

ORTOLANI, E.L.; SOARES, P.C. Epidemiological aspects of Cryptosporidiosis in dairy calves. **Parasitología latinoamericana**, v.58, n.3, p.122-127, 2003.

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

PAZ E SILVA, F.M. **Diagnóstico e caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos.** 2007. 167p. Dissertação(Mestrado).Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade Medicina Veterinária. Araçatuba, São Paulo, 2007.

PEREIRA, J.T; *et al.* Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Parana state, Southern Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.151, n.2-3, p.64-473, 2008.

RIET-CORREA, F.; *et al.* **Doenças de Ruminantes e Equídeos.** Santa Maria: Pallotti, 3. Ed. 2007. 722 p.

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

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

RODRIGUES, R.D.; *et al.* Comparação da eficiência das colorações de ziehl-neelsen modificado e safranina modificada na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida, Cryptosporidiidae) a partir de amostras fecais de bezerros de 0 a 3 meses. **Ciência Animal Brasileira**, v.17, n.1, p.119-125, 2016.

RYAN, U.; *et al.* *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa:Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia 727 reticulata*). **Experimental Parasitology**, v.150, p.31-35, 2015.

RYAN, U.; *et al.* *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v.90, p.769-773, 2004.

RYAN, U.; *et al.* It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: what are the implications for the water industry? **Water Research**, v.105, p.305-313, 2016.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v.141, p.1667-1685, 2014.

SANTIN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **New Zealand Veterinary Journal**, v.61, n.1, p.1-10, 2013.

SANTIN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.15-23, 2008.

SANTOS, R.O.; *et al.* Occurrence of protozoan from the genus *Cryptosporidium* spp. In cattle raised in properties of the rural zone in the county of bom Jesus, Piauí. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.10, n.4, p.346-351, 2016.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. **Trends in Parasitology**, v.22, n.5, p.203-208, 2006.

SDT/MDA – Secretaria de Desenvolvimento Territorial / Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável do Agreste Meridional de Pernambuco**. Brasília, 2011.

SHARMAA, K.; SHARMAB, M.; MISHRAC, M. **Bovine cryptosporidiosis in calves: A Review**. **International Journal of Animal Research**, v.4, n.26, 2019

SILVA JÚNIOR FA; *et al.* Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.8, p.690-696, 2011.

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

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, London, v. 124, p. 61-79, 2010.

SMITH, R.P.; *et al.* Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. **Veterinary Parasitology**, v.204, p.111-119, 2014.

SOUZA, A.C.M.; *et al.* Ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos da região Metropolitana de Recife e Zona da Mata de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.18, n.2, 2015.

STERLING, C.R.; ARROWOOD, M.J. Cryptosporidia. *In*: Julius P. Kreier, *Parasitic Protozoa*. **Academic press, INC.**, 159-225. 1992.

STOTZER, E.S.; *et al.* Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.8, n.3, p. 198-221, 2014.

STRIEPEN, B. Time to tackle cryptosporidiosis. **Nature**, New York, v. 503. p. 190-191, 2013.

SWEENY, J.P.; *et al.* *Cryptosporidium* and *Giardia* associated with reduced lamb carcass productivity. **Veterinary Parasitology**, v.182, p.127-139, 2011.

TEIXEIRA, W.F.P.; *et al.* Diagnóstico de criptosporidiose em amostras fecais de bezerros por imunofluorescência direta e microscopia de contraste de fase. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p.1057-1062, 2011.

TEMBUE, A.A.M.; *et al.* Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ovinos no município de Ibimirim, estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.9, n.1, p.41-43, 2006.

THOMPSON, R.C.; *et al.* *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. **Advances in Parasitology**, v.59, p.77-162, 2005.

THOMSON, S.; *et al.* Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. **Veterinary Research**, v.48, n.42, p.16, 2017.

TOLEDO, R.S.; *et al.* *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. **PLoS ONE**, v.12, n.4, p.20, 2017.

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

TZIPORI, S. *Cryptosporidiosis* in animals and humans. **Microbiological Reviews**, v.47, n.1, p.84-96, 1983.

TZIPORI, S.; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.14, n.4, p.455-456, 1981.

TZIPORI, S.; WARD, H. *Cryptosporidiosis*: biology, pathogenesis and disease. **Microbes na Infection**, v.4, p.1047-1058, 2002.

URIE, N.J.; *et al.* Preweaned heifer management on US dairy operations: Part III. Factors associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* in preweaned dairy heifer calves. **Journal of Dairy Science**, v.101, n.9, 2018.

UTSI, L.; *et al.* *Cryptosporidiosis* outbreak in visitors of a UK industry-compliant petting farm caused by a rare *Cryptosporidium parvum* subtype: a case-control study. **Epidemiology & Infection**, n.144, v.5, p.1000-1009, 2015.

VARGAS JUNIOR, S.F.; *et al.* Surto de criptosporidiose em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.8, p.749-752, 2014.

WEIKEL, C.S.; *et al.* *Cryptosporidiosis* in Northeastern Brazil: Association with Sporadic Diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v.151, n.5, p.963-965, 1985.

WHO - World Health Organization; **Guidelines for Drinking Water Quality** *Cryptosporidium*. 2006. Disponível em: <
https://www.who.int/water_sanitation_health/gdwqrevision/cryptodraft2.pdf>. Acesso em: 17/07/2019.

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

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

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

ZAMBRISKI, J.A.; *et al.* Description of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves. **Parasitology Research Journal**, v.112, n.3, p.1247-1254, 2013.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1:

Prevalence and risk factors associated to the infection by *Cryptosporidium* spp. in calves

(Artigo submetido a revista The Veterinary Journal)

1 **Prevalence and risk factors associated to the infection by *Cryptosporidium* spp. in calves**

2

3 **Abstract**

4 *Cryptosporidium* spp. are zoonotic protozoa frequently associated with diarrhoea in
5 calves, and responsible for important economic losses. The aim of this study was to determine
6 the prevalence and risk factors associated with infection by *Cryptosporidium* spp. in calves
7 raised in a milk production area of North-eastern Brazil. Faecal samples (n = 385) were
8 obtained from young animals (up to ten months old) and assessed by centrifugal faecal
9 sedimentation in formal-ether followed by the modified Ziehl-Neelsen staining technique. In
10 addition, the Odds ratio was calculated to evaluate the association between variables and
11 infection by the protozoa. Out of all samples analysed, 25.71% (99/385) scored positive for
12 the presence of *Cryptosporidium* spp.. Consociated rearing with other species (OR = 3.33; $P =$
13 0.000), the semi-intensive rearing system (OR = 1.70; $P = 0.024$), and absence of hygienic
14 conditions (OR = 1.64; $P = 0.029$) were considered risk factors. Based on data reported
15 herein, the adoption of hygienic-sanitary measures is imperative on the farms studied in order
16 to reduce *Cryptosporidium* spp. infection and the economic impact caused by this type of
17 parasitism.

18

19 *Keywords:* Cattle, *Cryptosporidium parvum*, zoonosis

20

21 **Introduction**

22 *Cryptosporidium* spp. are protozoa that present great importance for animal livestock
23 production and human health (Meireles, 2010; Ryan et al., 2014). This parasite belongs to the
24 Phylum Apicomplexa, class Gregarionomorphea, and is frequently reported in outbreaks of

25 diarrhoea in calves worldwide (Ryan et al., 2014; Efstratiou et al., 2017), being responsible
26 for damage to the intestinal epithelium, reducing nutrient absorption, and causing
27 dehydration, which may lead to death in some animals (Thomson et al., 2017; Abreu et al.,
28 2019). From an economic point of view, it has been demonstrated that the body weight gain in
29 infected calves is 55% lower than in healthy animals (Abreu et al., 2019), which compromises
30 livestock production (Thomson et al., 2017).

31

32 Cattle may be infected by several species of *Cryptosporidium* spp., however, only
33 some of these (e.g., *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* and *C. andersoni*) are epidemiologically
34 important (Gong et al., 2017). Natural parasitism by *Cryptosporidium* spp. in Brazilian cattle
35 has been detected throughout the country (Silva Junior et al., 2011; Abreu et al., 2019).

36 Among the main factors favouring the occurrence of cryptosporidiosis, age, immunological
37 competence, and consociated rearing are the most relevant (Bouzid et al., 2013; Adler et al.,
38 2017).

39

40 The epidemiological chain of this protozoon evolves on and off-host factors, and the
41 main route of transmission is through the ingestion of oocysts present in the environment,
42 water, and food (Smith and Nichols, 2010; Adler et al., 2017). It is important to note that as
43 water sources (e.g., rivers and lakes) are close to farms, the inappropriate discarding of
44 production waste may affect the water quality, and consequently increase the risk of pathogen
45 infection (Andrade et al., 2018).

46

47 Currently, Brazil is one of the most important producers of beef and milk in the world,
48 and the North-eastern region has an important role, especially in milk production (IBGE,

49 2018). However, there are still several obstacles that limit the exploration and expansion of
50 this sector, including parasitic infections, such as those caused by *Cryptosporidium* spp.. Due
51 to the importance of the region, which is responsible for the production of 80% of the milk of
52 the state of Pernambuco, studies focusing on the detection of *Cryptosporidium* spp. in calves
53 are pivotal. Therefore the aim of this study was to assess the prevalence and risk factors
54 associated with infection by *Cryptosporidium* spp. in calves in a Agreste region of North-
55 eastern Brazil.

56

57 **Material and methods**

58 *Study Area and Ethical Aspects*

59 The study was conducted in the Agreste region (8°53'25" South and 36°29'34" West)
60 of the state of Pernambuco, North-eastern Brazil (Fig. 1.). The area is characterized by a
61 warm dry sub-humid tropical climate, with an average annual temperature of 21°C (ranging
62 from 15° to 31°C), average rainfall of 198 mm (ranging from 65mm to 325mm), and relative
63 air humidity of 90% (ranging from 80 to 98%). Milk production is the main economic activity
64 in the area, being responsible for 80% of the production of the state of Pernambuco (BDE,
65 2017).

66

67 All procedures performed herein were approved by the Ethics Committee for Animal
68 Use (ECAU) of the Federal Rural University of Pernambuco under license number 73/2018.

69

70 *Sampling and laboratorial procedures*

71 From April 2018 to April 2019, faecal samples (n = 385) of calves up to 10 months of
72 age were collected using plastic gloves and maintained at 8°C until laboratory processing.

73 Samples were distributed into three groups according to the age of the animals (G1: up to 30
74 days old; G2: from 31 to 60 days old; and G3: from 61 days to 10 months old).

75

76 At the moment of collection, each animal was physically examined (Dirksen, 1993)
77 and an epidemiological questionnaire containing information about the hygiene conditions
78 and characteristics of the herd were carried out with the owner.

79

80 The minimum sample size was calculated considering a bovine population of 510,824
81 (IBGE, 2016), estimated prevalence of 50% for *Cryptosporidium* spp. infection, and
82 confidence level of 95% (Thrusfield, 2004).

83

84 Samples were processed to identify *Cryptosporidium* spp. through the centrifugal
85 sedimentation method in formaldehyde (Ritchie, 1948; David et al., 1989), followed by the
86 modified Ziehl-Neelsen staining technique (Henriksen and Pohlenz, 1981). Each slide was
87 viewed in an optic microscope under different magnifications (40X and 100X).

88

89 *Data analysis*

90 The Lilliefors test was used to verify data normality. The Yates-corrected Chi-square
91 test (χ^2) was used to compare the positivity of *Cryptosporidium* spp. according to the age and
92 presence of clinical signs. The significance level was set at 5%. SPSS version 13.0 was used
93 to perform all analysis. Conversely, the Odds ratio was calculated using EPIINFOTM7.2.2.6
94 software.

95

96 The Quantum Geographic Information System (QGIS 3.8.0 Zanzibar) was used to
97 process the choropleth vector map. Subtitle classes were created through Jenks Optimization
98 (Jenks and Caspall, 1971).

99

100 **Results**

101 Out of all samples analyzed, 25.71% (99/385) scored positive for the presence of
102 *Cryptosporidium* spp. oocysts.

103

104 The highest prevalence was detected in animals from G2 (from 31 to 60 days old), but
105 without statistical difference ($\chi^2 = 1.6400$; $P = 0.440436$). It is important to note that diarrheal
106 disease was observed in 28.28% (28/99) of positive animals, and 71.71% (71/99) of positive
107 animals did not present any clinical signs ($\chi^2 = 2.0447$; $P = 0.152733$) (Table 1). Oocysts
108 presented a mean length of 3.98 ± 0.69 and width of $4.46 \pm 0.71 \mu\text{m}$.

109

110 Consociated rearing with other species (OR = 3.33; $P = 0.0000$), the semi-intensive
111 rearing system (OR = 1.70; $P = 0.024$), and the absence of hygienic conditions (OR = 1.64; P
112 = 0.029) were considered risk factors (Table 2).

113

114 **Discussion**

115 This study demonstrates that *Cryptosporidium* spp. is a sanitary threat to calves reared
116 in an area of milk production in Brazil. The overall prevalence detected herein (i.e., 25.71%)
117 differs from others reported in different Brazilian regions (Rodrigues et al., 2016; Santos et
118 al., 2016).

119

120 Although it has been demonstrated that this kind of parasitism especially affects young
121 animals, in this study no difference was observed between groups (G1, G2, and G3). In fact,
122 the increase in age is the self-limiting factor due to the immunological response (Yoshiuchi et
123 al., 2010), although it is important to note that infected animals are important to
124 environmental contamination since they eliminate oocysts in faeces (Muniz Neta et al., 2010;
125 Santos et al., 2016). For a long time, the elimination of oocysts was frequently associated
126 with the presence of clinical signs such as diarrhea (Silva Junior et al., 2011; Santos et al.,
127 2016), however, it is currently known that asymptomatic animals have also been responsible
128 for the elimination of oocysts.

129

130 Several risk factors (e.g., age, herd size) have been associated with infection by
131 *Cryptosporidium* spp. (Adler et al., 2017). In this study consociated rearing with other
132 species, the semi-intensive rearing system, and the absence of hygienic conditions were the
133 only risk factors observed. This protozoa species may infect different vertebrate hosts, and
134 when reared in the same environment, the risk of infection enhances up to three-fold when
135 compared with single rearing (Xiao and Fayer, 2008). At the same time, the rearing system is
136 one of the most common risk factors. This occurs because of the close contact between
137 susceptible animals and infected animals, favouring the dissemination of parasites, including
138 *Cryptosporidium* spp. (Fayer et al., 2000; Oliveira Filho et al., 2007).

139

140 Undoubtedly, the absence of hygienic conditions is one of the most important causes
141 of *Cryptosporidium* infection and has been frequently reported in previous studies (Silva
142 Junior et al., 2011). The presence of organic matter, such as faeces, provides an environment
143 with adequate temperature and humidity to maintain the oocysts, facilitating transmission.

144 Interestingly, these protozoa may remain infective for six months or more (Robertson and
145 Chalmers, 2013; Striepen, 2013).

146

147 **Conclusions**

148 This is the first epidemiological study to assess the prevalence and risk factors
149 associated with infection by this protozoon in calves in the state of Pernambuco, North-
150 eastern Brazil, showing that a quarter of the herd studied was positive for the infection. Based
151 on data exposed herein, it is important to adopt measures of hygiene to avoid infection by
152 *Cryptosporidium* spp., reducing the potential economic impact and preventing human
153 infection.

154

155 **Conflict of interest statement**

156 The authors have no conflicts of interest.

157

158 **Acknowledgments**

159 This article is based on the Master of Science dissertation (Postgraduate Program in
160 Ruminant Health and Breeding) of the first author, developed at the Federal Rural University
161 of Pernambuco, with support from a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de
162 Pessoal de Nível Superior (CAPES).

163

164 **References**

165 Abreu, B.S., Pires, L.C., Santos, K.R., Luz, C.S.M, Oliveira, M.R.A., Sousa Junior, S.C.,
166 2019. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and its association with ponderal
167 development and diarrhea episodes in nellore mixed breed cattle. Acta Veterinaria
168 Brasilica 13, 24-29.

169

- 170 Adler, S., Widerström, M., Lindh, J., Lilja, M., 2017. Symptoms and risk factors of
171 *Cryptosporidium hominis* infection in children: data from a large waterborne outbreak
172 in Sweden. *Parasitology Research* 116, 1-6.
173
- 174 Andrade, R.C., Bastos, R.K.X., Bevilacqua, P.D., Andrade, R.V., 2018. *Cryptosporidium*
175 genotyping and land use mapping for hazard identification and source tracking in a
176 small mixed rural–urban watershed in Southeastern Brazil. *Journal of Water and*
177 *Health* 17, 149-159.
178
- 179 Bouzid, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Tyler, K.M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity
180 and virulence. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 115-134.
181
- 182 BDE (Bases de Dados do Estado), 2017. Vacas Ordenhadas e Produção de Leite.
183
- 184 David, H., Frebault, V.L., ThoreL, M.F., 1989. Méthodes de laboratoire pour
185 mycobacteriologie Clinique. Institut Pasteur, 24p.
186
- 187 Dirksen, G., 1993. Sistema Digestivo. In: Rosenberger Exame Clínico dos Bovinos (3 Ed.).
188 Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp.166-228.
189
- 190 Efstratiou, A., Ongerth, j.e., Karanis, P., 2017. Waterborne transmission of protozoan
191 parasites: review of worldwide outbreaks—an update 2011–2016. *Water Research*
192 114, 14-22.
193
- 194 Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission,
195 detection and identification. *International Journal for Parasitology* 30, 1305-1322.
196
- 197 Gong, C., Cao, X.F., Deng, L., Li, W., Huang, X.M., Lan, J.C., Xiao, Q.C., Zhong, Z.J., Feng,
198 F., Zhang, Y., Wang, W.B., Guo, P., Wu, K.J., Peng, G.N., 2017. Epidemiology of
199 *Cryptosporidium* infection in cattle in China: a review. *Parasite* 24, 1-8.
200
- 201 Henriksen, S. A., Pohlenz, J. F. L., 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-
202 Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22, 594-596.
203
- 204 IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics)., 2018. Indicadores IBGE: Estatística
205 da Produção Pecuária abril a junho de 2018.
206
- 207 IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics)., 2016. Municipalities – Municipal
208 livestock production.
209
- 210 Jenks, G.F., Caspall, F.C., 1971. Error on choroplethic maps: Definition, measurement,
211 reduction. *Annals of the American Association of Geographers* 61, 217-244.
212
- 213 Meireles, M.V., 2010. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary
214 medicine and public health. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 19, 197-
215 204.
216

- 217 Muniz Neta, E.S., Sampaio, D.C., Galvão, G.S., Munhoz, A.D., 2010. Comparação das
218 técnicas de ziehl-neelsen modificada e contraste de fase na detecção de oocistos do
219 gênero *Cryptosporidium tyzzer*, 1907 (apicomplexa: cryptosporidiidae) em bovinos
220 assintomáticos. Revista Brasileira de Medicina Veterinária 32, 201-204.
221
- 222 Oliveira Filho, J. P.; Silva, D.P.G., Pacheco, M.D., Mascarini, L.M., Ribeiro, M.G., Alfieri,
223 A.A., Alfieri, A.F., Stipp, D.T., Barros, B.J.P., Borges, A.S., 2007. Diarreia em
224 bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. Pesquisa
225 Veterinária Brasileira 27, 419-424.
226
- 227 Ritchie, L. S., 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bulletin
228 of the United State Armed, Medical Department 8, 326p.
229
- 230 Robertson, L. J.; Chalmers, R. M., 2013. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in
231 Nordic countries?. Trends in parasitology 29, 3-9.
232
- 233 Rodrigues, R.D., Gomes, L.R., Souza, R.R., Barbosa, F.C., 2016. Comparação da eficiência
234 das colorações de ziehl-neelsen modificado e safranina modificada na detecção de
235 oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida, Cryptosporidiidae) a partir de
236 amostras fecais de bezerros de 0 a 3 meses. Ciência Animal Brasileira 17, 119-125.
237
- 238 Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current
239 understanding and research needs. Parasitology 141, 1667-1685.
240
- 241 Santos, R.O., Oliveira, M.R.A., Luz, C.S.M., Abreu, B.S., Sousa Júnior, S.C., Santos, K.R.,
242 2016. Occurrence of protozoa from the genus *Cryptosporidium* spp. in cattle raised in
243 properties of the rural zone in the county of bom jesus, Piauí. Acta Veterinaria
244 Brasilica 10, 346-351.
245
- 246 Silva Junior, F.A, Carvalho, A.H.O., Rocha, C.M.B.M., Guimaraes, A.M., 2011. Fatores de
247 risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em
248 bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de
249 Minas Gerais. Pesquisa Veterinária Brasileira 31, 690-696.
250
- 251 Smith, H. V.; Nichols, R. A. B., 2010. *Cryptosporidium*: Detection in water and food.
252 Experimental Parasitology 124, 61-79.
253
- 254 Souza, A.C.M.; Silva, G.R., Marques, S.R., Borges, J.C.G, Alves, L.C., Faustino, M.A.G.,
255 2015. Ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos da região
256 Metropolitana de Recife e Zona da Mata de Pernambuco. Ciência Veterinária nos
257 Trópicos 18, 2.9-212.
258
- 259 Striepen, B., 2013. Time to tackle cryptosporidiosis. Nature 503, 190-191.
260
- 261 Tembue, A.A.M., Alves, L.C., Borges, J.C.G, Faustino, M.A.G., Machado, E.L.C., 2006.
262 Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ovinos no município de Ibimirim, estado de
263 Pernambuco. Ciência Veterinária nos Trópicos 9, 41-43.
264

- 265 Thomson, S., Hamilton, C.A., Hope, J.C., Katzer, F., Mabbott, N.A., Morrison, L.J., Innes,
266 E.A., 2017. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control
267 strategies. *Veterinary Research* 48, 1-16.
268
- 269 Thrusfield, M.V., 2004. *Epidemiologia Veterinária* (2 Ed.) Ed. Roca, São Paulo.
270
- 271 Xiao, L., Fayer, R., 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of
272 *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International*
273 *Journal for Parasitology* 38, 1239-1255.
274
- 275 Yoshiuchi, R., Matsubayashi, M., Kimata, I., Furuya, M., Tani, H., Sasai, K., 2010. Survey
276 and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned
277 companion animal, dogs and cats, in Japan. *Veterinary Parasitology* 174, 313-316.

278 **Table 1.**

279 Prevalence of *Cryptosporidium* spp. between age groups in calves with and without diarrhea in
 280 the Agreste Microregion of Pernambuco.

	Positive (n=99)	With Diarrhea (n=28)	No Diarrhea (n=71)
0 – 30 Days	26	11 (42.30%)	15 (57.69%)
31 – 60 Days	37	13 (35.13%)	24 (64.87%)
> 60 Days	36	4 (11.11%)	32 (88.89)

281

282 **Table 2.**

283 Univariate analysis of risk factors associated with *Cryptosporidium* spp. in calves of the state
 284 of Pernambuco.

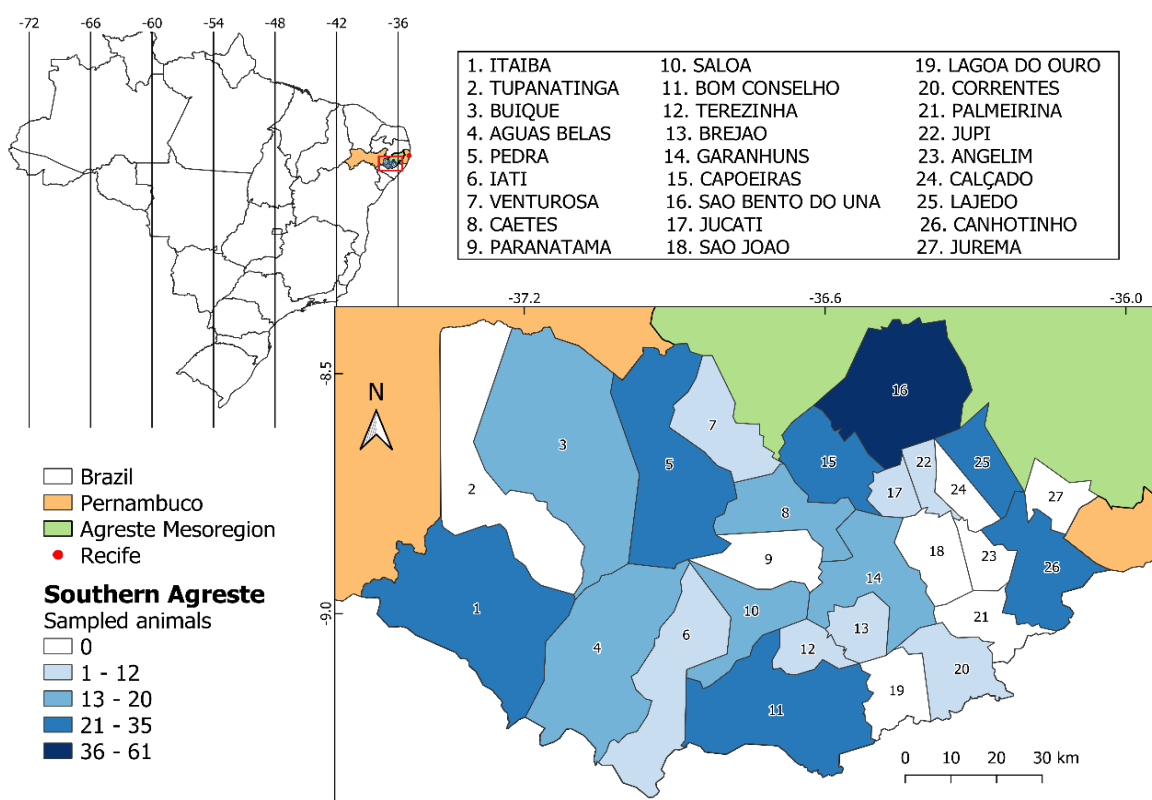
Variable	N	Modified Ziehl-	Univariate	
		Neelsen Positive	Analysis OR (I. C. 95%)	Value - <i>P</i>
Age (days)				
0-30	111	26 (23.42%)		
31-60	124	37 (29.84%)	1.39 (0.74-2.61)	0.168
>60	150	36 (24.00%)	0.74 (0.41-1.31)	0.170
Created species				
Cattle	114	49 (42.98%)		
Mixed	271	50 (18.45%)	3.33 (1.99-5.54)	0,000
Breeding System				
Intensive	251	73 (29.08%)		
Semi intensive	134	26 (19.40%)	1.70 (1.00-2.95)	0.024
Hygiene of the premises				
Yes	240	70 (29.17%)		
Not	145	29 (20.00%)	1.64 (0.98-2.80)	0.029
Presence of diarrhea				
Yes	87	28 (32.18%)		
Not	298	71 (23.83%)	1.51 (0.86-2.62)	0.077

285 ^a N – Total samples; OR – Odds Ratio; C. I. – Confidence interval.

286 ^b * *P* < 0.05 significant association.

287 **Figure**

288



289

290 Fig.1. Map of the Agreste Microregion of Pernambuco.

4.2 ARTIGO 2:

Cryptosporidium spp. **in calves: a description of an outbreak**

(Artigo submetido a revista Tropical Animal Health and Production)

Cryptosporidium spp. in calves: a description of an outbreak

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

Abstract

Cryptosporidium spp. are protozoa responsible for intestinal disorders commonly known as cryptosporidiosis, which is characterised by enteritis and dehydration. Although this disease had been studied in recent years, information on calves in the North-eastern region of Brazil is limited. Therefore, the aim of this study was to characterize an outbreak of cryptosporidiosis in calves reared on a beef production farm. Nelore bovines (n = 65) of up to 45 days old presented intense diarrhoea and 18 died after the onset of clinical signs. Considering that the clinical suspicion was cryptosporidiosis, faecal samples (n = 40) were obtained and analysed using the centrifugal-sedimentation technique in formol-ether with modified Ziehl-Neelsen staining, and the immunoassay MERIFLUOR® test. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. were observed in 35% (14/40) of the samples by the modified Ziehl-Neelsen technique. Conversely, the immunological assay detected 45% (18/40) of samples positive for *Cryptosporidium* spp., and 15% (6/40) for *Giardia* spp., respectively. The diagnosis of *Cryptosporidium* spp. in calves was described for the first time in this study in the state of Pernambuco, in the North-eastern region of Brazil. Therefore, preventive measures should be adopted on beef production farms in order to reduce the losses and economic impact caused by this neglected protozoa.

Keywords: Cryptosporidiosis; MERIFLUOR test; Ruminants; Zoonosis;

Introduction

Cryptosporidium spp. are zoonotic protozoa belonging to the Phylum Apicomplexa which parasitizes intestinal cells of vertebrate hosts and occasionally cells of the respiratory and excretory systems (Cavalier-Smith 2014; Ryan et al. 2014; Thomson et al. 2017). Although this parasite may infect a wide range of hosts, in cattle considerable damages have been observed (Fayer et al. 2000; Ryan et al. 2015). Currently, this parasite has been considered a re-emerging pathogen affecting humans, being one of the most important causes of diarrheal disease in immunosuppressed patients (Striepen 2013; Madrid et al. 2015). It is known that during development, *Cryptosporidium* spp. cause atrophy of intestinal cells, reducing the absorption of nutrients and, consequently, leading to weight loss, which characterizes cryptosporidiosis (Ortolani and Soares 2003; Zambriski et al. 2013). From a clinical point of view, cryptosporidiosis is characterised especially by diarrhoea and dehydration, which may lead to death in young animals (Olson et al. 2004; Zambriski et al. 2013).

30 Presently, more than 30 species of *Cryptosporidium* have been identified (Thomson et al. 2017), and at
31 least 14 have been detected in bovines (Santin et al. 2008; Couto and Bomfim 2012; Rodrigues et al. 2016).
32 Amongst the species that infect these animals, *C. parvum* has been extensively studied due to high pathogenicity
33 and zoonotic aspects (Gong et al. 2017). In general, the mortality is low, but when affecting young animals co-
34 infected with other pathogens (e.g., *Eimeria* spp., *Salmonella* spp., coronaviruses and rotaviruses) high mortality
35 may occur (Delafosse et al. 2015; Thomson et al. 2017).

36 The prevalence of *Cryptosporidium* spp. in cattle can vary. In Brazil, it has been reported in different
37 areas, with the majority of cases registered in the South, Southeast, and Midwest. However, in the North-eastern
38 region data are limited (Abreu et al. 2019), therefore the aim of this study was to characterize an outbreak of
39 cryptosporidiosis in calves raised on a beef cattle farm.

40

41 *Material and methods*

42 *Animals*

43 On November 2018, calves (Nelore breed) reared on a beef cattle farm located in the municipality of São
44 Benedito do Sul (08°48'30" South and 35°57'06" West), state of Pernambuco, North-eastern region of Brazil,
45 presented clinical signs suggestive of cryptosporidiosis. These animals were from a herd composed of 100 calves
46 up to 45 days old, raised in a semi-intensive system, where they maintained contact with adult animals from other
47 herds. The diet was based on Tifton grass and water *ad libitum*. Sixty-five calves presented the symptoms
48 mentioned and of these 18 died approximately 20 days after disease onset. The sick animals were treated with
49 Enrofloxacin and Doramectin, but no improvement in their clinical status was observed.

50 At the visit, a humid environment with the presence of organic matter and mud were recorded. During
51 the outbreak (November 2018) an atypical situation with intense rainfall was observed in the area.

52 All live calves (n = 47) were physically examined and clinical data reported in individual clinical charts.
53 Subsequently, faecal samples (n = 40) were collected from the rectal ampoule of calves aged 30 (n = 20) and 45
54 (n = 20) days, stored in plastic vials and maintained in isothermal boxes (8 °C) until laboratory processing. Seven
55 animals did not present enough faeces at the moment of sampling.

56 *Laboratorial procedures*

57 *Parasitological analysis*

58 The identification of *Cryptosporidium* spp. was performed through the centrifugal-sedimentation
59 technique in formol-ether (Ritchie 1948; David et al. 1989) modified and stained by the Ziehl-Neelsen technique

60 (Henriksen and Pohlenz 1981). Slides were observed under an optical microscope at different magnifications (40X
61 and 100X). All parasitic structures detected were measured using an optical microscope equipped with a camera
62 using AxioVision software (release 4.8).

63 *Immunoassay analysis*

64 The immunoassay evaluation was performed using the commercial kit MERIFLUOR®
65 *Cryptosporidium/Giardia* (Bioscience) following the manufacturer's instructions.

66 *Data analysis*

67 Absolute and relative frequencies were obtained through the descriptive analysis.

68

69 *Results*

70 A total of 47.5% (19/40) of faeces were diarrheic and the presence of blood was observed in 17.5% (7/40)
71 of samples. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. were detected in 35% (14/40) of animals. In particular 42.9% (6/14)
72 of positive animals were 30 days old and 57.1% (8/14) 45 days old. Oocysts presented a mean length of $3.86 \pm$
73 0.71 and width of 4.07 ± 0.66 μm .

74 The immunological test scored positive in 47.5% (19/40) of samples, being 30% (12/40) reagent for
75 *Cryptosporidium* spp., 2.5% (1/40) for *Giardia* spp., and 15% (6/40) co-infected by both parasites. Positive
76 samples in the parasitological examination were confirmed by the immunological assay.

77 All positive animals presented diarrhoea, weight loss, dehydration, and apathy, clinical signs suggestive
78 of cryptosporidiosis.

79

80 *Discussion*

81 This study characterizes for the first time an outbreak of cryptosporidiosis in calves reared on a beef
82 production farm in the state of Pernambuco, North-eastern Brazil.

83 Although protozoan infection is a common finding in cattle herds, the positivity may vary, ranging from
84 10.2% to 63.54% (Heckler et al. 2015; Rodrigues et al. 2016; Toledo et al. 2017; Abreu et al. 2019). These
85 differences can be attributed to the different methods employed for this kind of diagnosis. For instance, in the
86 present study positivity values of 35% and 45% were found using the modified Ziehl-Neelsen technique and
87 immunological assay, respectively.

88 The clinical signs herein reported were nonspecific and may be confused with other gastrointestinal
89 disorders; therefore the laboratorial confirmation is pivotal (Fayer et al. 2000; Olson et al. 2004; Muniz Neta et al.

90 2010). In the current study, it is believed that the hygiene conditions of the farm could facilitate the maintenance
91 and dissemination of protozoan. It is known that excessive humidity and accumulation of organic matter (e.g.,
92 faeces and mud), as well as the sharing of the same environment between young and adult animals may be
93 considered risk factors for this infection (Olson et al. 2004; Silva Junior et al. 2011; Gong et al. 2017). From an
94 epidemiological perspective, adult animals are very important as although they are asymptomatic, they are able to
95 eliminate oocysts, contaminating the environment (Xiao and Fayer 2008; Delafosse et al. 2015; Gong et al. 2017).

96 The atypical rainfall observed at the study area during the outbreak, associated with the humid
97 environment in which the calves were maintained, most likely favoured the spread of the oocysts and
98 environmental contamination, increasing the risk of animal infection, as previously observed in other studies
99 (Feitosa et al. 2004; Almeida et al. 2008; Bouzid et al. 2013).

100 Diarrhoea in infected animals may be an absent finding. In fact, this clinical sign is dependent on the
101 species involved, and the immunological status of the animal (Feitosa et al. 2008; Ryan et al. 2015). Both parasites
102 (i.e., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp.) reported herein in some animals cause damage to the host intestinal
103 epithelium, leading to reduction in nutrient absorption, weight loss, and important economic impact (Silva Junior
104 et al. 2011; Zambriski et al. 2013).

105 In general, the presence of *Cryptosporidium* spp. has been considered an opportunistic infection (Moore
106 and Zeman 1991; Vargas Junior et al. 2014), however findings from this study suggest that this parasite could be
107 the primary cause of the disease, since some animals with intense diarrhoea were parasitized exclusively by
108 *Cryptosporidium* spp..

109

110 *Conclusion*

111 This is the first report of an outbreak of cryptosporidiosis in calves reared on a beef production farm in
112 the area of study. Therefore, considering that this disease may be facilitated by interaction between improper
113 management and exposure of susceptible animals, preventive measures should be adopted on beef production
114 farms in order to reduce the losses and economic impact caused by this neglected protozoa.

115

116 *Acknowledgements*

117 This article is based on the Master of Science dissertation (Postgraduate Program in Ruminant Health and
118 Reproduction) of the first author, developed at the Federal Rural University of Pernambuco, with support from a
119 fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149

Compliance with ethical standards

Statement of animal rights

All procedures performed herein were approved by the Ethics Committee for Animal Use (ECAU) of the Federal Rural University of Pernambuco under license number 73/2018.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest.

References

Abreu, B.S., Pires, L.C., Santos, K.R., Luz, C.S.M, Oliveira, M.R.A., Sousa Junior, S.C., 2019. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and its association with ponderal development and diarrhea episodes in nellore mixed breed cattle. *Acta Veterinaria Brasilica*, 13, 24-29.

Almeida, A.J., Oliveira, F.C., Teixeira, C.S., 2008. Risco relativo da infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* em bezerros bovinos no norte do estado do Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 17, 243-248.

Bouزيد, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Tyler, K.M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 115–134.

Cavalier-Smith, T., 2014. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*, 50, 472-495.

Couto, M.C.M., Bomfim, T.C.B., 2012. Espécies de *Cryptosporidium* que infectam bovinos: características etiológicas e epidemiológicas. *Veterinária Notícias*, 18, 94-109.

David, H., Frebault, V.L., ThoreL, M.F., 1989. *Méthodes de laboratoire pour mycobacteriologie Clinique*. (Institut Pasteur).

Delafosse, A., Chartier, C., Dupuy, M.C., Dumoulin, M., Pors, I., Paraud C., 2015. *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in Western France. *Preventive Veterinary Medicine*, 118, 406–412.

Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30, 1305-1322.

- 150 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.,
151 Meireles, M.V., 2008. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em bezerros.
152 Pesquisa Veterinária Brasileira, 28, 452-456.
- 153 Feitosa, F.L.F., Shimamura, G.M., Roberto, T., Meireles, M.V., Nunes, C.M., Ciarlini, P.C., Borges, A.S., 2004.
154 Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. Ciência
155 Rural, 34, 189-193.
- 156 Gong, C., Cao, X.F., Deng, L., Li, W., Huang, X.M., Lan, J.C., Xiao, Q.C., Zhong, Z.J., Feng, F., Zhang, Y.,
157 Wang, W.B., Guo, P., Wu, K.J., Peng, G.N., 2017. Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle
158 in China: a review. Parasite, 24, 1-8.
- 159 Heckler, R.P., Borges, D.G. Bacha, F.B., Onizuka, M.K., Teruya, Le, Neves, J.P., Leal, C.R., de Lemos,
160 R.A., Meireles, M.V., Borges, F.A., 2015. First genetic identification of *Cryptosporidium parvum*
161 subtype IIaA14G2R1 in beef cattle in Brazil. Preventive Veterinary Medicine, 121, 391–394.
- 162 Henriksen, S. A., Pohlenz, J. F. L., 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta
163 Veterinaria Scandinavica, 22, 594-596.
- 164 Madrid, D.M.C., Bastos, T.S.A., Jayme, V.S., 2015. Emergência da criptosporidiose e impactos na saúde humana
165 e animal. Enciclopédia Biosfera, 11, 2150 – 2171.
- 166 Moore, D.A., Zeman, D.H., 1991. *Cryptosporidiosis* in neonatal calves: 277 cases (1986-1987). Journal of the
167 American Veterinary Medical Association, 198, 1969-1971.
- 168 Muniz Neta, E.S., Sampaio, D.C., Galvão, G.S., Munhoz, A.D., 2010. Comparação das técnicas de ziehl-neelsen
169 modificada e contraste de fase na detecção de oocistos do gênero *Cryptosporidium tyzzer*, 1907
170 (apicomplexa: cryptosporidiidae) em bovinos assintomáticos. Revista Brasileira de Medicina Veterinária,
171 32, 201-204.
- 172 Olson, M. E., O’Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C.A., 2004. Update on
173 *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. Trends in Parasitology 20, 185-191.
- 174 Ortolani, E.L.; Soares, P.C., 2003. Epidemiological aspects of *Cryptosporidiosis* in dairy calves. Parasitología
175 latino-americana, 58, 122-127.
- 176 Ritchie, L. S., 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bulletin of the United State
177 Armed, Medical Department, 8, 326p.
- 178 Rodrigues, R.D., Gomes, L.R., Souza, R.R., Barbosa, F.C., 2016. Comparação da eficiência das colorações de
179 Ziehl-Neelsen modificado e safranina modificada na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

- 180 (Eucoccidiorida, Cryptosporidiidae) a partir de amostras fecais de bezerros de 0 a 3 meses. *Ciência*
181 *Animal Brasileira*, 17, 119-125.
- 182 Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and
183 research needs. *Parasitology*, 141, 1667-1685.
- 184 Ryan, U., Papparini, A., Tong, K., Yang, R., Gibson-Kueh, S., O'Hara, A., Lymbery, A., Xiao, L., 2015.
185 *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa:Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia 727 reticulata*).
186 *Experimental Parasitology*, 150, 31-35.
- 187 Santin, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2
188 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155, 15-23.
- 189 Santos, R.O., Oliveira, M.R.A., Luz, C.S.M., Abreu, B.S., Sousa Júnior, S.C., Santos, K.R., 2016. Occurrence of
190 protozoa from the genus *Cryptosporidium* spp. in cattle raised in properties of the rural zone in the county
191 of bom Jesus, Piauí. *Acta Veterinaria Brasilica*, 10, 346-351.
- 192 Silva junior, F.A., Carvalho, A.H.O., Rocha, C.M.B.M., Guimaraes, A.M., 2011. Fatores de risco associados à
193 infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na
194 mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31, 690-696.
- 195 Striepen, B., 2013. Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature*, 503, 190-191.
- 196 Thomson, S., Hamilton, C.A., Hope, J.C., Katzer, F., Mabbott, N.A., Morrison, L.J., Innes, E.A., 2017. Bovine
197 cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, 48, 1-16.
- 198 Toledo, R.S., Martins, F.D.C., Ferreira, F.P., Almeida, J.C., Ogawa, L., Santos, H.L.E.P.L., Santos, M.M.,
199 Pinheiro, F.A., Navarro, I.T., Garcia, J.L., Freire, R.L., 2017. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in
200 feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. *PLoS ONE*, 12, 1-20.
- 201 Vargas Junior, S.F., Pereira, M.C., Adrien, M.L., Fiss, L., Molarinho, K.R., Soares, M.P., Schild, A.L., Sallis,
202 L.S.V., 2014. Surto de criptosporidiose em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária*
203 *Brasileira*, 34, 749-752.
- 204 Xiao, L.; Fayer, R., 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia*
205 and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38, 1239-1255.
- 206 Zambriski, J.A., Nydam, D.V., Bowman, D.D., Bellosa, M.L., Burton, A.J., Linden, T.C., Liotta, J.L., Ollivett,
207 T.L., Tondello-Martins, L., Mohammed, H.O., 2013. Description of fecal shedding of *Cryptosporidium*
208 *parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves. *Parasitology Research Journal*, 112, 1247–
209 1254.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho, inédito na região, comprova a presença da infecção por protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. em bezerros de aptidão para produção de leite e carne na área de estudo. Tal resultado tem grande importância para o setor pecuário e o meio veterinário, além de fazer um alerta a saúde pública por se tratar de um protozoário zoonótico responsável por grandes transtornos em todo o mundo. O conhecimento sobre a prevalência e os fatores de risco vinculados a infecção em bezerros da Microrregião do Agreste Meridional permite a implementação de medidas eficazes que reduzam perdas econômicas do setor produtivo e o impacto negativo na saúde pública, tais como a propagação de orientações e informações a respeito a esta infecção por meio de folder educativo (Apêndice C).

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO-UFRPE
 UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS-UAG
 LABORATÓRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
 portador de RG nº _____ residente em
 _____, abaixo assinado, atesto que entendi o
 conteúdo desse consentimento informado e concordo de livre e espontânea vontade em
 participar do estudo sobre parasitos gastrintestinais em fezes de bovinos da microrregião do
 agreste meridional de Pernambuco. Atesto que fornecerei fezes de meus animais (bovinos) e
 informações verídicas ao questionário aplicado pelo grupo de pesquisa da UFRPE. Declaro
 ainda, que esclareci todas as minhas dúvidas com os responsáveis pela pesquisa e autorizo a
 publicação dos dados e/ou fotos.

_____, _____ de _____ de 20____.

 Proprietário responsável dos animais

 Assinatura de um dos responsáveis pela pesquisa

APÊNDICE B - Questionário Epidemiológico



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO-UFRPE
 UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS-UAG
 LABORATÓRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA
 Avenida Bom Pastor, s/n. – Boa Vista, Garanhuns/PE
 55.293-901 – Telefone: (87) 3764-5505 / (87)3764-5551

QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO

FICHA Nº: _____ PROPRIEDADE Nº _____

DATA: ____/____/____

INVESTIGADOR: _____

IDENTIFICAÇÃO

Fazenda: _____

Proprietário _____

Endereço: _____

Município: _____

Contato: _____

DADOS DO REBANHO

Número total de animais: _____ Animais de 0 - 30 dias: _____

Animais de 30 - 60 dias: _____ Animais de 60 - 90 dias: _____

Animais de 4 – 6 meses: _____ Animais acima de 6 meses: _____

Fêmeas: _____ Fêmeas em lactação: _____

Machos: _____

1) Espécie:

a) Bovina () Sim () Não

b) Mista () Sim () Não

Quais espécies: _____

2) Raça: _____

3) Tipo de criação

- a) Extensivo ()
 b) Semi-intensivo ()
 c) Intensivo ()

5) Alimentação

- a) Neonatos: _____
 b) Jovens: _____
 c) Adultos: _____

7) Local de fornecimento de alimento

- a) Cocho ()
 b) Solo ()
 c) Outro: _____

9) Animais tem acesso a água represada

- a) Sim ()
 b) Não ()
 Qual: _____

11) Tipo de instalação

- a) Cimentado ()
 b) Chão batido ()
 c) Outro _____

13) Instalação maternidade

- a) Sim ()
 b) Não ()

15) Periodicidade da limpeza do ambiente

- a) Diariamente ()
 b) Semanalmente ()
 c) Quinzenalmente ()
 d) Mensalmente ()

17) Usa esterqueira

- a) Sim ()
 b) Não ()

4) Tipo de exploração

- a) Carne ()
 b) Leite ()
 c) Mista ()

6) Mineralização () Sim () Não**8) Fonte de água**

- a) Água tratada ()
 b) Córregos e riachos ()
 c) Açudes ()
 d) Poço ()
 Onde é represada: _____

10) Instalação coletiva para todos os animais

- a) Sim ()
 b) Não ()

12) Instalação separada para fêmeas e machos

- a) Sim ()
 b) Não ()

14) Instalação separada para bezerros

- a) Sim ()
 b) Não ()

16) Usa desinfetante

- a) Sim ()
 b) Não ()
 Qual _____

18) Procedência dos animais

- a) Rebanho autóctone ()
 b) Exposição/leilão ()
 c) Feira livre ()

19) Realiza quarentena

- a) Sim ()
- b) Não ()

21) Animais tem surtos de diarreia

- a) Sim ()
- b) Não ()

Idade mais frequente: _____

23) Utiliza antiparasitário

- a) Sim ()
- b) Não ()

25) Grupo animal para desverminação

- a) Toda população ()
- b) Somente bezerros ()
- c) Animais após desmame ()
- d) Animais com sinais clínicos ()
- e) Outros: _____

27) Animais apresentam problemas de desenvolvimento

- a) Sim ()
- b) Não ()

29) Tipo de cobertura

- a) Monta natural ()
- b) Inseminação artificial ()
- c) Transferência de embriões ()

31) Produção diária de leite na fazenda

- a) Abaixo de 50 L/dia ()
- b) Entre 51 e 100 L/dia ()
- c) Acima de 100 L/dia ()

20) Há animais doentes:

- a) Sim ()
- b) Não ()

Com o que? _____

22) Possui assistência veterinária

- a) Sim ()
- b) Não ()

24) Período para desverminação

- a) Logo após o parto ()
- b) Uma vez ao ano ()
- c) Duas vezes ao ano ()
- d) Mais de três vezes ao ano ()

26) Rotação de princípio ativo

- a) Após um ano utilizando ()
- b) Troca a cada desverminação ()
- c) De acordo com o preço ()
- d) Esporadicamente ()
- e) Não rotaciona ()

28) As fêmeas apresentam problemas reprodutivos

- a) Sim ()
- b) Não ()

Quais: _____

30) Tipo de ordenha

- a) Manual ()
- b) Mecânica ()
- c) Não realiza ()

APÊNDICE C - Folder Educativo sobre Criptosporidiose



Universidade Federal Rural de Pernambuco - PRPPG
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Programa de Pós Graduação em Sanidade e Reprodução de
 Animais de Produção

Endereço UAG/UFRPE: Av. Bom Pastor, S/N, Boa Vista,
 Garanhuns, PE / CEP 55.292-270

Laboratório de Parasitologia - LAPAR

FONTE DAS IMAGENS: Fig. capa: www.tecnologiaetreinamento.com.br; Fig. 1, 2B e 3: Arquivo pessoal; Fig.2A: VARGAS JUNIOR, S.F.; et al. Surto de criptosporidiose em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.34, n.8, p.749-752, 2014.



Universidade Federal Rural de Pernambuco
 Unidade Acadêmica de Garanhuns - UAG/UFRPE
 Programa de Sanidade e Reprodução de Animais de
 Produção

CRIPTOSPORIDIOSE EM BOVINOS: O QUE É?



Garanhuns/PE

Criptosporidiose em Bovinos

O que é?

É uma doença grave que acomete os bovinos causada pelo parasito *Cryptosporidium* spp. É mais comum nos animais jovens, mas os adultos também podem ser afetados. Além disso, é uma **zoonose**, ou seja, pode ocorrer em humanos, sendo as crianças e pessoas debilitadas as mais atingidas.

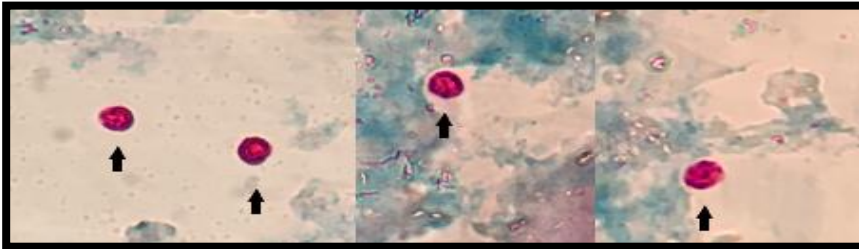


Figura 1. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de bezerros (estruturas esféricas e rosadas indicadas pelas setas).

O que causa e quais os sinais?

Alguns animais, principalmente os adultos, apesar de estarem infectados podem não apresentar sinais clínicos visíveis. Os bezerros geralmente apresentam:

- Lesões no intestino
- Falha na absorção de nutrientes
- Atraso no desenvolvimento
- Diarreia e desidratação
- Emagrecimento
- Queda na produtividade



Figura 2. Bezerros com criptosporidiose apresentando diarreia.

Como é transmitida?

Fecal-Oral: através da ingestão de água ou alimentos contaminados pelo parasito que é eliminado junto das **fezes** dos animais infectados, mesmo sem apresentar diarreia. No mesmo ambiente, o *Cryptosporidium* spp., pode afetar diferentes espécies de animais.



Figura 3. (A) Bezerro e aves criados no mesmo ambiente. Fornecimento de água (B) e alimento/sal (C) contaminados.

Diagnóstico

É feito em laboratório, por meio de exame específico das fezes dos animais. **Procure um Médico Veterinário!**

Como prevenir?

- Limpeza do ambiente
- Evitar superlotações
- Isolamento dos doentes
- Fornecimento de colostro, alimentos e água de boa qualidade.
- Separar animais por idade

ANEXOS

ANEXO A - Instruções aos Autores (Revista *The Veterinary Journal*)

Normas complementares empregadas no Artigo 1.

Disponível na página: <<https://www.elsevier.com/journals/the-veterinary-journal/1090-0233/guide-for-authors>>.

The Veterinary Journal (established 1875) is an international journal of veterinary research that publishes original papers and reviews on all aspects of veterinary science. Contributions reporting investigative work in the scientific disciplines involving veterinary species are particularly welcome where they make a significant contribution to the field. The Editors will be pleased to consider suggestions for Special Issues on subjects of topical importance. The journal also publishes Guest Editorials and occasionally Personal Views by invitation, but does not have a Letters section. Book Reviews are published on-line. Articles of purely regional significance and studies of non-domestic species are considered only if they clearly have broader scientific importance. Manuscripts that report novel studies with substantial importance to the profession are preferred, including analytical studies that are relevant to practising veterinarians.

Types of paper: Manuscripts may describe original work in a Full Paper (Original Article) or a Short Communication, or may form a Review of the existing state of knowledge on a particular aspect of veterinary science. Reviews should, in general, be written in support of original investigations. Case Reports are not published.

Ethics in publishing: Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Animal welfare: Where animals have been used in a study, the institutional ethical or animal welfare Authority under which the work was conducted must be stated, along with the specific authorisation reference number and the date of approval. Such studies must meet Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE).

Declaration of interest: All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches.

Submission declaration and verification: Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

If the work has been published previously (as a published lecture, academic thesis or electronic preprint), the authors must declare this information on initial submission.

Preprints: Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Copyright: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement'. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases. For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement'. Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights: As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

Elsevier supports responsible sharing: Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source: You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies: Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Language (usage and editing services): Please write your text in good English (British usage is preferred, North American authors may use American English). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop

Use of Word Processing Software: It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, please use a table grid, (however use only one grid for each individual table and not a grid for each row). The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on

Electronic artwork.
To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure: Authors submitting papers that are suitable for consideration but do not comply fully with this Guide will be asked to amend the text and re-submit. Model article formats in WORD are available (click to follow link below as appropriate):

- Original Article
- Short Communication
- Review
- Guest Editorial
- Personal View
- Book Review

Original Articles should be no longer than 3,000 words in length, excluding the Title page, Abstract, Acknowledgements, Tables, Figures and References. Reviews should be about 4,000 words in length and Short Communications up to 1,000 words.

Articles - Original Articles: (word limit 3,000 words) should be arranged as follows: (1) Title page; (2) an Abstract of up to 250 words (with no sub-headings), which should emphasise objectives, the experimental procedure, results and conclusions; up to five alphabetically arranged Keywords in Sentence case should be supplied below the Abstract; (3) the main text must be sub-divided into Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, and Conclusions; (4) Conflict of interest statement; (5) Acknowledgements; (6) Appendix: Supplementary material (where this is provided; see below); (7) References; (8) Tables; (9) Figure legends; (10) Figures (uploaded as separate files); (11) Highlights (uploaded as a separate file). The sections should not be numbered. Please see the model article provided (view here).

Please note:

- Insert a page break only after the Title page, after the Abstract with Keywords, after the References section, between each Table, and before the Legends to figures.
- The Results and Discussion sections must be distinct and not combined.
- Avoid sub-headings in the Discussion section.
- References must not be included within the Conclusions section.
- The first person (I, we, our) must be avoided in the Abstract, but may be used elsewhere in the paper.

Tables should be included within the article and placed sequentially after the References, but before the Figure legend(s), with one Table per page.

Figure legends should be included in the main manuscript file after any Tables. Each figure should be uploaded as a separate file (Fig. 1, Fig. 2 etc.).

Subdivision - unnumbered sections: Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Essential title page information:

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case

superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.
- **Abstract:** A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.
- **Highlights:** Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 125 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.
- **Acknowledgements:** Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).
- **Nomenclature and Units:** Manufacturers. Manufacturers and suppliers should be indicated within the text after the name of the product. For example: 'diazepam (Valium, Roche)' or 'using an infusion pump (Medfusion 2010, Medex)'. Addresses/locations of manufacturers should not be given and the use of ® or ™ should be avoided. Note: proprietary names must not appear in the title or Abstract.
- **Artwork:** Figures. The quality of all Figures submitted must be high. The Editors will reject Figures of an unacceptable standard or ask the Authors to replace them. Figures should be referred to sequentially in the text as Fig. 1, Fig. 2, Figs. 3a,b and 4, etc. A Legend must be provided for each Figure and placed after any Tables in the main manuscript file. Do not write legends on the figures themselves. Scale bars must be provided on all photomicrographs and electron micrographs.

In preparing figures, Authors should note the following:

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork;
- Save text in figures as "graphics" or enclose the font;
- Only use the following fonts in your figures: Times New Roman, Arial, Courier, Helvetica, Symbol;
- Number the figures according to their sequence in the text;
- Use a logical naming convention for your artwork files;
- Provide all figures as separate files;
- Produce images near to the desired size of the printed version;
- Ensure that all units and wording in the figures conform to TVJ style (see Units above).
- **References:**
 - Citation in text: Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

- Reference style: Authors are strongly advised to use reference management software such as EndNote. However, references should be checked carefully for accuracy and corrected manually to ensure the format matches exactly the TVJ style described below.
- Only essential references should be included. Text citations can be in either of two ways: (a) with date in parentheses, e.g. as demonstrated by Mills (2011); or (b) with names and dates in parentheses, e.g. according to recent findings (Mills, 2011). If a citation has more than two Authors the first Author should be given followed by et al. in standard text format (not italicised), e.g. Jones et al. (2007) or (Jones et al., 2007). Where lists of references are cited in the text, they should be placed first chronologically and then alphabetically, e.g. (Philbey et al., 2003; Cassidy and Mills, 2005; Litster, 2010). If two or more references by the same Author(s) published in the same year are cited, they should be distinguished from each other by placing a, b, etc. after the year, e.g., (Laven, 2011a, b; Laven and Smith, 2010a, b). Personal communications should be designated as '(E.A. Blomme, personal communication)'.
- The Reference list at the end of the paper should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. References should be single spaced and a line break should be inserted between each reference. All Authors should be included up to 10, after which you should write 'et al.'; Please note that, in all cases Journal titles must be given in full. Volume numbers and full page numbers should be provided, but issue numbers should be omitted. Where a Supplement is cited, give the Supplement number e.g. 'Equine Veterinary Journal Supplement 37' or 'Journal of Reproduction and Fertility 54 (Suppl. 1), 115-126'. Where selected pages only have been consulted, such as in a book, this is given by 'pp. 237-240' or 'p. 456' (see below).

ANEXO B - Instruções aos Autores (Tropical Animal Health and Production)

Normas complementares empregadas no Artigo 2.

Disponível na página: <<https://www.springer.com/journal/11250/submission-guidelines>>.

Tropical Animal Health and Production is an international journal publishing the results of original research in any field of animal health, welfare, and production with the aim of improving health and productivity of livestock, and better utilisation of animal resources, including wildlife in tropical, subtropical and similar agro-ecological environments.

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study;
- Performed research;
- Analyzed data;
- Contributed new methods or models;
- Wrote the paper

It is the responsibility of the corresponding authors that the names, addresses and affiliations of all authors are correct and in the right order, that institutional approvals have been obtained and that all authors have seen and agreed to a submission. This includes single authorship papers where appropriate. If at all in doubt please double check with eg. Supervisors, line managers department heads etc.

Types of articles

Manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double spaced, using A4 paper size. Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence.

Regular Articles: Articles should be as concise as possible and should not normally exceed approximately 4000 words or about 8 pages of the journal including illustrations and tables. Articles should be structured into the following sections:

- (a) Abstract of 150-250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached. The Abstract should be presented as a single continuous paragraph without subdivisions.
- (b) Introduction stating purpose of the work.
- (c) Materials and Methods.
- (d) Results.
- (e) Discussion (conclusions should be incorporated in the discussion!).
- (f) Acknowledgements.
- (g) Statement of Animal Rights.
- (h) Conflict of Interest Statement.
- (i) References.

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Costs of Color Illustrations

Online publication of color illustrations is always free of charge.

For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of EUR 950 / US\$ 1150 (+ local tax) per article, irrespective of the number of figures in it.

Preprint Policy

Springer accepts posting of preprints of primary research manuscripts on preprint servers, authors’ or institutional websites. Details of our policy on posting, licensing, citation of preprints and communications with the media about preprints of primary research manuscripts may be found here.

Authors should disclose details of preprint posting, including DOI and licensing terms, upon submission of the manuscript or at any other point during consideration at a Springer journal. Once the preprint is published, it is the author’s responsibility to ensure that the preprint record is updated with a publication reference, including the DOI and a URL link to the published version of the article on the journal website.

Preprints may be cited in the reference list of articles under consideration at Springer journals as shown below:

Babichev, S. A., Ries, J. & Lvovsky, A. I. Quantum scissors: teleportation of single-mode optical states by means of a nonlocal single photon. Preprint at <http://arxiv.org/abs/quant-ph/0208066> (2002).

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s);
- A concise and informative title;
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country;
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author;
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s);
- If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published;
- For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

- Text Formatting - Manuscripts should be submitted in Word.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text;
- Use italics for emphasis;
- Use the automatic page numbering function to number the pages;
- Do not use field functions;
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar;
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables;
- Use the equation editor or MathType for equations;
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Please note:

Use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document.

References

- All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list;
- In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages. Examples: 'Peters (1985) has shown that 'This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 12--16)';
- If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation et al. should be used. All names should be given in the list of references;
- References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with co-authors. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc;
- Use the following system for arranging each reference in the list:
 - For journal articles: Ahl, A.S., 1986. The role of vibrissae in behaviour: a status review, *Veterinary Research Communications*, 10, 245--268
 - For books: Fox, J.G., Cohen, B.J. and Lowe, F.M., 1984. *Laboratory Animal Medicine*, (Academic Press, London)
 - For a paper in published symposia proceedings or a chapter in multi-author books: Lowe, K.F. and Hamilton, B.A., 1986. Dairy pastures in the Australian tropics and subtropics. In: G.T. Murtagh and R.M. Jones (eds), *Proceedings of the 3rd Australian conference on tropical pastures*, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 68--79
 - For unpublished theses, memoranda etc: Crowther, J., 1980. *Karst water studies and environment in West Malaysia*, (unpublished PhD thesis, University of Hull)
 - For Online documents: Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999;
- Do not abbreviate the titles of journals mentioned in the list of references;
- Titles of references should be given in the original language, except for the titles of publications in non-Latin alphabets, which should be transliterated, and a notation such as '(in Russian)' or '(in Greek, with English abstract)' added;
- Citations of personal communications should be avoided unless absolutely necessary. When used, they should appear only in the text, using the format: 'E. Redpath, personal communication, 1986' and should not appear in the Reference List. Citations to the unpublished data of any of the authors should not be included unless the work has already been accepted for publication, in which case a reference should be given in the usual way with "in press" in place of the volume and page numbers.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats. Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration;
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism'));
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing');
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers;
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data;
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.

Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).

Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

Author contributions

Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions regarding contribution statements.

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

Free text: All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the

manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript;

Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],...;

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not accepted after acceptance** of a manuscript.

Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current. Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number);
- Honoraria for speaking at symposia;
- Financial support for attending symposia;
- Financial support for educational programs;
- Employment or consultation;
- Support from a project sponsor;
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships;
- Multiple affiliations;
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest;
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights);
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work;

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found.

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.