

IMPORTÂNCIA DO *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa:
Cryptosporidiidae) NAS DIARRÉIAS DE BEZERROS
NA BACIA LEITEIRA DO SUL FLUMINENSE

JOSÉ CARLOS PEREIRA DE SOUZA

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

IMPORTÂNCIA DO *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa:
Cryptosporidiidae) NAS DIARRÉIAS DE BEZERROS
NA BACIA LEITEIRA DO SUL FLUMINENSE

JOSÉ CARLOS PEREIRA DE SOUZA

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR:
CARLOS WILSON GOMES LOPES

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau
de *Magister Scientiarum* em
Patologia Veterinária, Área
de Concentração Medicina
Veterinária Preventiva.

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

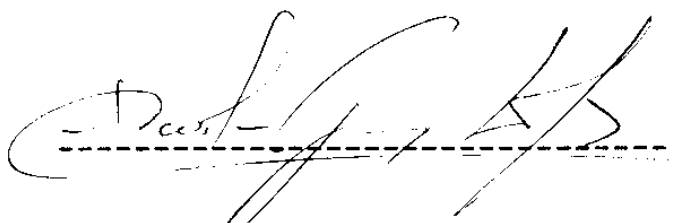
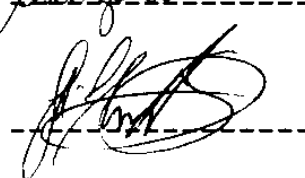
AGOSTO DE 1991

IMPORTÂNCIA DO *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa:
Cryptosporidiidae) NAS DIARRÉIAS DE BEZERROS
NA BACIA LEITEIRA DO SUL FLUMINENSE

AUTOR

JOSÉ CARLOS PEREIRA DE SOUZA

Aprovado em: 08 / 11 / 91.


Elizabeth B.B. Pereira


AGRADECIMENTO

Agradeço em especial a minha esposa e filhos pela paciência e cooperação dedicada durante o desenvolvimento deste trabalho, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que o mesmo pudesse ser realizado.

BIOGRAFIA DO AUTOR

JOSÉ CARLOS PEREIRA DE SOUZA, filho de Silvino Pereira de Souza e Helena Pereira de Souza, nascido à 29 de dezembro de 1947, no Município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro.

Realizou o curso primário no Grupo Escolar Presidente Dutra e 1º e 2º grau no Colégio Fernando Costa, Itaguaí, RJ. Em 1971, ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, tendo colado grau em 14 de dezembro de 1974.

Em fevereiro de 1975 foi aprovado em concurso interno para Médico Veterinário, Inspetor Federal do Convênio COBAL/MA e São Paulo.

Obteve o título de Especialista em Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal em curso realizado no Centro de Treinamento de Barretos, Estado de São Paulo,

ministrado pela Coordenadoria de Treinamento do Ministério da Agricultura - MA, no período de março a junho de 1975.

Aprovado em concurso público para Médico Veterinário do MA, tomando posse em abril de 1976. No período de 1977 e 1978 foi Professor Colaborador na Área de Anatomia do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UFRRJ.

No período de 1979 e 1980 continuou atuando como Médico Veterinário do Serviço de Inspeção Federal (SIF), MA, no Estado de São Paulo.

Em fevereiro de 1981, transferiu-se para o Rio de Janeiro passando a exercer suas atividades junto ao Serviço de Defesa Sanitária Animal, onde realizou curso de especialização em Epidemiologia e Administração em Saúde, oferecido pela OPAS/OMS.

Em março de 1990, ingressou no Curso de Pós-Graduação, em Patologia Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Biologia	4
2.2. Infecção nos animais	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Colheita do material	14
3.2. Procedimento laboratorial	14
3.2.1. Exame parasitológico das fezes	14
3.3. Método de coloração	15
3.3.1. Técnica de coloração para esfregaço de fezes	15
3.4. Identificação	15
3.4.1. Mensuração e fotomicrografia	15
3.5. Análises estatísticas	16

4. RESULTADOS	18
4.1. Considerações sobre o perfil zoonosantário dos grupos	18
4.1.1. Grupo I	19
4.1.2. Grupo II	20
4.1.3. Grupo III	22
4.2. Coloração de esfregado pela safranina-azul de Metileno (S-AM)	25
4.3. Resultado da incidência de <i>Cryptosporidium</i> no total de bezerros examinados	27
4.3.1. Resultados da incidência de <i>Cryptos-</i> poridium em bezerros do Grupo I	30
4.3.2. Resultados da incidência de <i>Cryptos-</i> poridium em bezerros do Grupo II	32
4.3.3. Resultados da incidência de <i>Cryptos-</i> poridium em bezerros do Grupo III	32
5. DISCUSSÃO	36
5.1. Caracterização das espécies encontradas	36
5.2. Discussão sobre os fatores idade, condição clínica com e sem diarreia e infecção por <i>Cryptosporidium</i>	39
5.3. Análise estatística dos resultados	41
6. CONCLUSÕES	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ÍNDICE DE TABELA

	Página
TABELA 1: Valores médios e erro padrão da média e erro padrão da média dos diâmetros polar e equatorial dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> corados pela Safranina-azul de Metileno	38

ÍNDICE DAS FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Resultados encontrados nos grupos, para presença de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. considerando a condição clínica de presença ou ausência de diarreia	23
FIGURA 2: <i>Cryptosporidium</i> sp. esfregaços de fezes com oocistos de <i>C. muris</i> (a) e <i>C. parvum</i> (b). Safranina-azul de Metileno 1250x	26
FIGURA 3: Incidência de <i>Cryptosporidium</i> sp, encontrados nos bezerros dos três grupos, considerando a idade	28
FIGURA 4: Incidência de <i>Cryptosporidium</i> sp, considerando a condição clínica, com e sem diarreia nos bezerros dos três grupos	29

- FIGURA 5: Resultados encontrados no Grupo I, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para o oocistos de *Cryptosporidium* sp, e a presença ou ausência de diarreia 31
- FIGURA 6: Resultados encontrados no Grupo II, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para o oocistos de *Cryptosporidium* sp, e a presença ou ausência de diarreia 33
- FIGURA 7: Resultados encontrados no Grupo III, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para o oocistos de *Cryptosporidium* sp, e a presença ou ausência de diarreia 35

ÍNDICE DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE I: Preparo do esfregaço. Técnica de sedimentação em formalina-éter (Método de RITCHIE, 1948)	53
APÊNDICE II: Técnica de coloração pela safranina-azul de metileno	54
APÊNDICE III: Preparação da solução de safranina a 1%	55
APÊNDICE IV: Análise da variância, dos valores transformados, do número de bezerros, com e sem diarreia, nos três diferentes grupos (a), considerando a infecção por <i>Cryptosporidium</i> (b), infecção (c), idade (d)	56
APÊNDICE V: Contrastes de médias das fontes analisadas	57

APÊNDICE VI: Resultados encontrados nos grupos, para presença de oocisto de <i>Cryptosporidium</i> sp., considerando a condição clínica de presença ou ausência de diarreia	58
APÊNDICE VII: Incidência de <i>Cryptosporidium</i> sp, encontrados nos bezerros dos três grupos, considerando a idade	59
APÊNDICE VIII: Incidência de <i>Cryptosporidium</i> sp, considerando a condição clínica, com e sem diarreia nos bezerros dos três grupos	60
APÊNDICE IX: Resultados encontrados no Grupo I, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp, e a presença ou ausência de diarreia	61
APÊNDICE X: Resultados encontrados no Grupo II, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp, e a presença ou ausência de diarreia	62
APÊNDICE XI: Resultados encontrados no Grupo III, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp, e a presença ou ausência de diarreia	63

RESUMO

A ocorrência natural do *Cryptosporidium* em bezerros foi estudada na bacia leiteira Sul fulminense no Estado do Rio de Janeiro. Nove fazendas foram distribuídas em três grupos de acordo com suas condições sanitárias de manejo.

O parasito foi encontrado nas fezes de bezerros com ou sem diarreia com aproximadamente 30 dias de idade em todas as condições sanitárias de manejo estudadas. De acordo com as medidas dos oocistos, corados pela Safranina-azul de metileno, duas espécies foram identificadas como *C. muris* e *C. parvum*.

Nos 122 animais examinados, 59 tinham idade inferior a 30 dias, e destes, 36 (61,02%) foram positivos para *Cryptosporidium*, sendo 24 (40,68%) com diarreia e 12 (20,34%) não manifestaram este sintoma. Dos 63 bezerros, com idade superior a 30 dias, 52 (82,54%) foram positivos para *Cryptosporidium*, sendo que um destes 31 (49,21%) a diarreia estava presente e 21 (33,33%) não tinham diarreia.

A análise estatística não revelou significância quanto a presença de *Cryptosporidium* entre grupos estudados, sendo porém, significativa quando se comparou a presença do parasito com as condições sanitárias de manejo do rebanho com ou sem sinais clínicos de diarreia.

SUMMARY

At a South dairy region in the state of Rio de Janeiro, Brazil, the natural occurring of *Cryptosporidium* in calves was studied. Nine dairy farms were allocated in three group, according with their sanitary manejeмент conditions.

The parasite was found in the feces of calves with or without diarrhea with 30 days old approximately in all sanitary manejeмент conditions. According with the measurement of the oocysts, staining with Safranin-Methilene blue, two species were identified as *C. muris* and *C. parvum*.

In all 122 animals examined, 59 were under 30 days old, of these, 36 (61.02%) were positive for *Cryptosporidium*, being 24 (40.68%) with diarrhea and 12 (20.34%) without it. Of 63 animals over 30 days old, 52 (82.54%) were positive for *Cryptosporidium*; being that, 31 (41.21%) with diarrhea and 21 (33.33%) without it.

No significance was observed among group studied in this experiment, but the presence of parasites in animals was significant when it was considered in association with sanitary conditions with or without clinical sign of diarrhea.

1. INTRODUÇÃO

Dados preliminares do senso agropecuário do Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1989), apontaram no rebanho do Estado do Rio de Janeiro, 1.922.532 cabeças das quais 351.832 representavam vacas em lactação, formando uma das principais bacias leiteiras do Brasil. Segundo FIGUEIREDO (1982), 315.347 bovinos tinham idade inferior a 1 ano. Estes animais, provavelmente hoje, fazem parte do plantel leiteiro em produção.

O sul fluminense tem ocupado no Estado do Rio de Janeiro não só lugar de destaque na produção leiteira, mas também vem atuando como fornecedor de animais para renovação do plantel.

Muito se tem pesquisado na busca de soluções para problemas que afetam a pecuária nacional; e, poucas são as pesquisas voltadas ao conhecimento de detalhes tais como sistemas de manejo empregados na pecuária leiteira que visem oferecer melhores condições aos bezerros na primeira idade de

vida. Nesta fase, tem ocorrido os maiores índices de perdas por doenças infecciosas, nutricionais e parasitárias; perdas estas, caracterizadas pelos baixos índices de natalidade e altos índices de mortalidade. A diarreia dos bezerros tem sido citada como um complexo resultante da interação sinérgica entre um ou mais agentes infecciosos associado a imunidade e ao manejo zoonosário, favorecendo o desenvolvimento das enteropatias e ou agravando sua manifestação.

Sendo o *Cryptosporidium* um protozoário que pode acometer bezerros recém-nascidos, determinando com isso o aparecimento de diarreia, pretendeu-se com o presente trabalho, verificar sua incidência em animais jovens de planteis que formam a bacia leiteira do sul do estado.

Uma vez que a bacia leiteira do sul fluminense é uma das principais produtoras de leite do estado, e também de animais para reposição, estas observações poderão contribuir para orientação de programas sanitários que visem aprimorar os sistemas de criação de bezerros, principalmente, na primeira idade.

Por ser a Criptosporidiose uma zoonose em franca emergência, tem-se o dever de implementar conhecimentos desta doença, visto tratar-se de um problema de Saúde Pública. Assim sendo, este trabalho poderá fornecer subsídios para estudos da prevalência do protozoário, visando a orientação de programas de saúde no meio rural, esclarecendo aos grupos

de risco, como populações rurais, da facilidade de transmissão do *Cryptosporidium* e os fatores de risco relacionados com a propagação entre os animais domésticos e finalmente, alertando quanto a possibilidade destes animais se constituir reservatórios em potencial para a espécie humana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biologia.

O agente etiológico da Criptosporidiose é um pequeno protozoário, situado entre 2 e 6 Mm dependendo do estágio do ciclo biológico (O'DONOGHUE, 1985 e CURRENT, 1985), pertencendo ao gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 da família Cryptosporidiidae Leger, 1911, sub-ordem Emeriorina Leger, 1911, ordem Eucoccidiorida Leger e Dubosq, 1910, sub-classe Coccidiarina Leukart, 1879, classe Sporozoasida Leukart, 1879, filum Apicomplexa Levine, 1970.

Estudos da transmissão cruzada feitos por LEVINE (1984), demonstraram pouco ou nenhum hospedeiro específico para amostras isoladas de bezerros, cordeiros e humanos, levando-o a considerar o *Cryptosporidium* como gênero de uma única espécie. Entretanto, a evidência de 2 espécies distintas parasitando bezerros foram sugeridas por UPTON & CURRENT (1985). Desta forma, estudos mais pormenorizados

considerando-se a especificidade de hospedeiro, ciclo biológico e morfologia poderiam dirimir as dúvidas quanto a taxonomia deste protozoário. Este protozoário é um parasito de ciclo monoxeno que normalmente habita os bordos das microvilosidades do epitélio gastrintestinal de um número variável de vertebrados (POHLENZ *et al.*, 1978a e MOOM & BENRICK, 1978). Nas aves o desenvolvimento das fases biológicas também foi observado no epitélio traqueal conforme notificou NAVIN & JURANEK (1984).

O ciclo biológico parece mostrar o padrão descrito para outros coccídios, incluindo uma fase sexual, gametogonia, com produção de macro e microgametas e uma fase assexuada caracterizada por merontes I^o e II^o geração. Depois da fertilização ocorre a formação da parede dos oocistos, e finalmente a eliminação dos mesmos nas fezes, já esporulados, conforme citação de NAVIN & JURANEK (1984).

O período pré-patente em animais com infecção natural ou artificial é variável, conforme a espécie parasitada. Em bezerros, este período foi observado entre 2 a 7 dias por ANDERSON (1981) e TZIPORI *et al.* (1983). Para leitões, este período foi de 3 a 6 dias, segundo relatos de MOOM & BENRICK (1981) e TZIPORI *et al.* (1981a). Estudos realizados por TZIPORI *et al.* (1981b) e ANDERSON (1982) evidenciaram um período pré-patente de 2 a 5 dias em cordeiros infectados. Animais jovens tem sido mais susceptíveis à infecção, por isso são considerados de alto

risco. Cordeiros livres de patógenos específicos (SPF), experimentalmente infectados com cepas de *Cryptosporidium* tiveram o ciclo reduzido a 72 hs como citaram TZIPORI *et al.* (1981b); MOOM & BENRICK (1981) e SONODGRASS *et al.* (1984), período este relativamente pequeno em relação a outros coccídios.

TZIPORI (1981) considerou importante os seguintes fatores para distinguirem o gênero *Cryptosporidium* dos demais coccídios entericos:

- a) ausência de hospedeiros específicos;
- b) parasita extra-celular que se adere as microvilossidades do epitélio intestinal;
- c) rápido ciclo biológico;
- d) número e tamanho de oocistos excretados nas fezes serem reduzidos; e
- e) acomete, geralmente, animais jovens.

Este parasito ao fixar-se nas bordas das microvilossidades intestinais, projeta-se para a luz do órgão onde são envoltos por uma membrana epitelial formando um vacúolo parasitóforo, não penetrando entretanto no citoplasma da célula hospedeira. Esta única localização tem sido descrita e considerada como intracelular, porém extracitoplasmática (BOCH *et al.*, 1982 e O'DONOGHUE, 1985).

Na epidemiologia deste protozoário é importante o conhecimento de seu ciclo biológico, visto que ele ao

abandonar a célula parasitada para ser eliminado nas fezes do hospedeiro, encontra-se já esporulado, conforme os trabalhos de FOHLENZ *et al.* (1978a), ISEKI (1979) e O'DONOGHUE (1985), que demonstraram a esporulação de oocistos presos nas microvilosidades das células intestinais, nas fezes infectadas de bezerros e gatos, respectivamente. Estas características também diferenciam o gênero *Cryptosporidium* de outros coccídeos como *Eimeria* e *Isospora* que só esporulam no meio ambiente (TZIPORI, 1981a).

2.2. Infecção nos animais.

A diarreia em bezerros recém-nascidos tem sido objeto de investigação por pesquisadores de vários países. Muito se tem pesquisado na tentativa de elucidar os agentes etiológicos que isoladamente ou em associação tem causado estas enteropatias determinando grandes prejuízos a bovinocultura. Assim sendo, coube a PANCIEIRA (1971), o mérito de pela primeira vez identificar o *Cryptosporidium* associado a diarreia em bezerros. Esta observação despertou o interesse veterinário que resultou em numerosos trabalhos em várias espécies domésticas.

TZIPORI (1981a) em seu trabalho sobre a etiologia e

diagnóstico da diarreia dos bezerros, citou o *Cryptosporidium* como um importante agente causador dessa enteropatia, em mono infecção ou mesmo em associação com rotavírus, coronavírus e *Escherichia coli* enterotoxigênica. Desta maneira, infecções associadas a *E. coli* e coronavírus, nas enteropatias de bezerros recém-nascidos com ou sem diarreia, foram relatados por MEUTEN & VAN KRUININGEN (1974); JOHN & SMITH (1975); MORIN *et al.* (1976); HEINE & BOCH (1981); MOOM *et al.* (1981); HOWVERTH (1981); NAGY & POHLENZ (1982); SANFORD & JOSEPHSON (1982); GONZALES *et al.* (1983); ANDERSON (1984); CONTREPOIS & VALLET (1984); HENRIKSEN & KROGH (1985); UPTON & CURRENT (1985); ANDERSON (1986); GIALLETTI *et al.* (1986) e MODULO *et al.* (1987 e 1988).

A associação entre rotavírus e *Cryptosporidium* ou entre rotavírus, coronavírus, *E. coli* mais *Cryptosporidium* em bezerros com diarreia foi tão freqüente quanto as associações anteriores, segundo as observações feitas por POWEL *et al.* (1976); POHLENZ *et al.* (1978b); HEINE & BOCH (1981); JERRET & SNODGRASS (1981); SNODGRASS *et al.* (1981); MOOM & BENRICK (1981); PEARSON *et al.* (1982); JUNGMAN & HIEPE (1983); POHJOLA & LINBERG (1986); MOON & WOODMANSEE (1986) e REYNOLDS (1986).

SNODGRASS *et al.* (1986) estudando a prevalência de enteropatógenos causadores de diarreia em bezerros recém-nascidos, observaram que as associações entre *Cryptosporidium*, coronavírus e *E. coli* enterotoxigênica não

foram significativas e que a associação entre rotavírus e *Cryptosporidium* ocorria com maior frequência.

A ocorrência de *Cryptosporidium* como único agente patógeno nas diarreias dos bezerros foi confirmado por PEARSON & LOGAN (1978); FOHLENZ (1980); TZIPORI *et al.* (1980); MOOM & BENRICK (1981); ANGUS *et al.* (1982); HEINE *et al.* (1984) e ANDERSON (1984).

A infecção natural ou artificial em cordeiros por *Cryptosporidium*, foi relatado por BERG *et al.* (1978); TZIPORI *et al.* (1981b); ANDERSON (1982); ANGUS *et al.* (1982) e SNODGRASS *et al.* (1984), que observaram a sintomatologia, período de incubação, eliminação de oocistos, fonte de infecção e associação com outros agentes enteropatógenos, tais como: rotavírus, *E. coli*, coronavírus e *Cryptosporidium*.

LEVINE (1984) relatou detalhadamente a transmissão cruzada das espécies do gênero *Cryptosporidium* entre mamíferos. Caracterizando desta maneira a sistemática deste protozoário. Este mesmo pesquisador, citou que quatro espécies de *Cryptosporidium* poderiam ser considerados como válidas, entre as dezoito ultimamente descritas, as demais foram consideradas como sinonímia. Atualmente podem ser aceitas como válidas: *C. crotali* Triffit, 1925, parasita de serpentes; *C. meleagridis* Slavin, 1955, parasita de intestino e vias aéreas de aves; *C. muris* Tizzer, 1907, parasita de glândulas gástricas e intestino de mamíferos e *C. nasorum* Hoove, Hoerr, Carlton, Hinsman & Ferguson, 1981,

parasita de peixes. Mais tarde UPTON & CURRENT (1985) acrescentaram como válida, *C. parvum*, já descrito por Tizzer em 1912, parasitando microvilosidades do epitélio intestinal de mamíferos. Em aves, foi ainda descrito *C. baileyi* por CURRENT *et al.* (1986) como espécie válida para aquele grupo de animais.

Entre outras espécies o *Cryptosporidium* foi identificado como parasita de suínos, eqüinos, caprinos, aves, coelhos, cobaias, camundongos, répteis, gatos e primatas não humanos (TZIPORI, 1981a e 1982a; CAMPBELL *et al.*, 1982; TZIPORI *et al.* 1982b; SOULE *et al.*, 1983; LEVINE, 1984; FAYER, 1986; KLESSIUS, 1986 e BOMFIM, 1989). Nestas espécies, o parasita foi isolado de infecção natural ou usou-se cepas de espécies diferentes, visando estudos de especificidade de hospedeiros.

KLESSIUS (1986) ao infectar bezerros com oocistos de *Cryptosporidium* isolados de camundongos silvestres *Mus musculus*, alertou para o fato de que estes podiam iniciar ou manter a infecção em animais domésticos e possivelmente no homem.

Em seres humanos, o primeiro caso de Criptosporidiose foi relatado por NIME *et al.* (1976), em um paciente de 3 anos. A partir deste, outros dados foram publicados relatando a ocorrência da infecção em indivíduos portadores da Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (SIDA), ou em pessoas submetidas à tratamento com imonossupressivos

nos casos de transplantes de órgão, ou mesmo em pessoas cuja atividade ocupacional esteja ligada à animais, principalmente bovinos (ANDERSON, 1982; ANDERSON *et al.*, 1982; REESE *et al.*, 1982; CURRENT *et al.*, 1983; TZIPORI, 1983; ANGUS, K.W., 1983 e POHJOLA *et al.*, 1986).

No estado do Rio de Janeiro, a ocorrência de coccídeos do gênero *Eimeria* nas enteropatias de bezerros foi relatada por FIGUEIREDO (1982), que relacionou a presença do parasito com a faixa etária dos animais, sendo mais frequente na faixa de 3 a 24 semanas de vida. Quanto ao gênero *Cryptosporidium*, recentemente foi assinalado por MODOLO *et al.* (1988) em São Paulo, que o identificou em material colhido num surto de diarreia em bezerros recém-nascidos, na região de Botucatu, Estado de São Paulo.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

O material utilizado neste trabalho foi proveniente de bezerros da raça Holandeza e mestiços Gir-Holanda, pertencentes a 9 propriedades de exploração leiteira, localizadas nos municípios de Itaguaí, Resende e Itatiaia, municípios estes que fazem parte da região fisiográfica do sul do Estado do Rio de Janeiro.

Escolheu-se os municípios de Resende e Itatiaia porque além de serem representativos na produção leiteira, também o são como exportadores de animais de reposição para outros municípios. Itaguaí foi escolhido por ser um típico importador de bovinos de raça leiteira de outras regiões, principalmente, do sul de Minas Gerais e Vale do Paraíba.

Para caracterizar estas propriedades foi feito um inquérito de opinião com preenchimento de fichas no ato da visita. Basicamente obteve-se as seguintes informações:

- 1 - localização, identificação das propriedades;
- 2 - população animal.

- 2.1 - vacas;
 - 2.2 - bezerros de 0 a 4 meses; 4 a 12 meses;
 - 2.3 - novilhas;
 - 2.4 - novilhos e
 - 2.5 - touros e bois.
- 3 - ocorrência de enfermidades nos bezerros.
- 3.1 - taxa de mortalidade.
- 4 - manejo zoonitário.

Para avaliação dos aspectos referentes ao estado de conservação, higiene das instalações e manejo zoonitário, adotou-se critério de julgamento considerando-se como bom, regular ou ruim, o conjunto de dados analisados para cada propriedade.

As informações foram prestadas pelos proprietários ou pessoa por eles credenciados. Após análise das fichas, considerando que segundo ROSENBERG (1986) as formas de produção, neste caso enquadradas como empresarial de leite, são definidas por um conjunto de fatores, entre eles: nutrição, manejo, sanidade e genética, os quais caracterizam o perfil de saúde animal, as nove propriedades foram separadas em três grupos.

Os resultados encontrados nos três grupos para *Cryptosporidium* foram protocolados para posterior análise.

3.1. Colheita do material.

Foram colhidas 122 amostras de fezes diretamente da ampola retal em bezerros das nove propriedades trabalhadas. A faixa etária dos bezerros examinados variava de 5 a 90 dias do nascimento. O material foi embalado em sacos plásticos identificados, registrando-se num livro de protocolo o nome ou número do animal, idade, sexo, raça, sintomatologia clínica com presença ou não de diarreia. Em seguida, era transportado para o Laboratório da Estação para Pesquisa Parasitológica W.O. NEITZ, Área de Parasitologia do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia da UFRRJ, onde foram realizados os exames.

3.2. Procedimento laboratorial.

3.2.1. Exame parasitológico das fezes.

Cada amostra foi examinada determinando-se a presença ou não de oocistos de coccídeos, depois de ter sido concentrada pela técnica de centrifugo-flutuação, descrita por FIGUEIREDO (1982).

Posteriormente, preparou-se o esfregaço para cada amostra de acordo com o método de RITCHIE, 1948 (Apêndice 1).

3.3. Meio de coloração.

3.3.1. Técnica de coloração para esfregaço de fezes.

Para identificação dos oocistos foi usada a técnica de coloração pela Safranina - Azul de Metileno⁴ (S-AM) de acordo com BAXBY et al. (1984) e modificada durante este trabalho (Apêndice 3).

3.4. Identificação.

3.4.1. Mensuração e fotomicrografia.

A identificação do *Cryptosporidium* foi baseado no trabalho de LEVINE (1984). Para a leitura das lâminas corados

⁴ - MERCK, Rio de Janeiro.

utilizou-se microscópio SM-Lux^a, separando-se as positivas. Nestas foram identificados e medidos oocistos anotando-se diâmetro polar e equatorial. Segundo estas medidas separou-se 200 oocistos, sendo que 100 destes correspondiam a espécie *C. muris* e 100 a espécie *C. parvum*, conforme descrito por TYZZER (1907 e 1912) e confirmado por UPTON & CURRENT (1985) (Tabela 1).

As mensurações dos oocistos foram feitas com auxílio de microscópio S.M.-Lux Leitz^b com ocular micrométrica SK-15 x Wild^c.

O material estudado, foi fotografado com câmara fotográfica MPS 5i acoplada a um microscópio Dialux 20EB, utilizando-se filme Kodak Plus x Pan 125 ISO.

3.5. Análises estatísticas.

O ensaio foi planejado considerando um delineamento inteiramente ao acaso, onde grupos de manejo zoonossanitário, infecção por *Cryptosporidium*, condição clínica para presença ou não de diarreia e a idade dos bezerros examinados foram as

^a - Leitz, República Alemã.

^b - Leitz Wetzlar, República Federal Alemã.

^c - Wild Heerbrugg, Suíça.

fontes de variação utilizadas.

Para a avaliação dos resultados, número de bezerros, os valores foram previamente transformados para raiz quadrada de $x+0,5$ e posteriormente analisados pelo teste "F" de Fisher-Snedecor (análise da variância)⁵, Apêndice 4, e para as médias entre os grupos, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância (SNEDECOR & COHRAM, 1976). As demais médias foram comparadas pelo teste "t" de Student ao nível de 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES, 1985) (Apêndice 5).

⁵ - Microstat - em microcomputador COBRA, São Paulo.

4. RESULTADOS

4.1. Considerações sobre o perfil zoonossanitário dos grupos.

Foram examinados animais procedentes de 9 propriedades as quais foram classificadas e separadas em três grupos, de acordo com os resultados da análise das informações obtidas através do inquerito de opinião e das observações feitas no ato da visita para colheita do material, considerando que, segundo ROSEMBERG (1986), o perfil da saúde animal está diretamente relacionado à nutrição, manejo, genética e sanidade, fatores estes que irão definir as formas de produção e produtividade.

4.1.1. Grupo I.

Os bezerros pertencentes a este grupo, ao nascerem permaneciam com a mãe por um período mínimo de 12 horas, necessário para o animal receber o colôstro, após, o que eram apartados e levados à bezerreiros individuais onde recebiam aleitamento artificial servido em balde, sendo administrado quatro litros diários divididos em duas parcelas de dois litros pela manhã e dois litros à tarde, entretanto em uma das propriedades foi verificada que a quantidade de leite fornecida correspondia a 10% do peso corporal do animal.

Nas três propriedades, observou-se que no intervalo entre o aleitamento, os bezerros recebiam 2 kg de ração balanceado* servida no cocho e água *Ad libitum*. Este sistema era mantido até aos 40 dias quando se procedia o desmame precoce.

Após o desmame, nas propriedades enquadrados neste grupo, os bezerros eram colocados em bezerreiros coletivos onde recebiam 2 kg de ração e forragem de boa qualidade⁷, picada, até completarem 120 dias de idade. Nesta fase, todos os animais eram conduzido diretamente ao pasto, porém continuavam a receber suplementação de ração balanceada, caracterizando o sistema de criação semi-confinado.

* - Purina, São Paulo.

⁷ - Capim Camerum ou Napie, *Panicetum purpureum*.

Quanto aos aspectos higiênicos sanitários, observou-se que: (a) os bezerreiros individuais ou coletivos eram diariamente lavados e desinfectados; (b) os bebedouros e cochos eram limpos e higienizados diariamente; (c) o manejo técnico-sanitário era sempre orientado por Médico Veterinário; (d) a profilaxia de doenças infecto-contagiosas e parasitárias era bem orientada; (e) os animais doentes eram separados em enfermarias para serem tratados; (f) o índice de mortalidade informado foi de 0 a 3% ao ano; e (g) foram observados vestígios de roedores nos currais e depósitos de ração.

Em duas das propriedades constatou-se que o plantel era formado com animais de alto valor genético da raça Holandesa Preto e Branco (HPB) e a incidência de diarreia verificada nos animais deste grupo foi de 40% (Figura 1).

4.1.2. Grupo II.

Nas duas propriedades enquadradas neste grupo, ao nascer, os bezerros permaneciam 15 a 24 hs com as mães. Após esta fase eram apartados e colocados em bezerreiros individuais que em uma das propriedades era do tipo gaiola com 1,5 m². Estas gaiolas eram colocadas diretamente no

piquete para que os animais fossem submetidos a uma adaptação precoce.

O aleitamento também artificial era feito em baldes, sendo administrados 2 litros de leite pela manhã e 2 litros à tarde. No intervalo entre as duas alimentações era administrada ração balanceada e água *Ad libidum*. Na propriedade em que as gaiolas eram colocadas diretamente no piquete, os bezerros também alimentavam-se da própria gramínea* que formava o pasto.

O desmame precoce era feito quando os bezerros completavam 60 dias em uma das propriedades, e aos 90 dias na outra.

Após o desmame os bezerros eram colocados em piquetes até às 11 hs da manhã, após o que eram recolhidos em bezerreiros coletivo onde recebiam ração balanceada e forragem picada. Este manejo era mantido até que os bezerros completassem 120 dias de idade quando então eram levadas diretamente ao pasto, porém, continuavam recebendo uma suplementação de ração balanceada.

As instalações nas propriedades deste grupo seguiam um padrão tecnicamente orientado.

Face a higienização deficientes dos bezerreiros, cochos e bebedouros a água tinha aspecto turvo.

Foi observado vestígio de roedores nos depósitos de

* - *Brachiaria decumbens*.

ração e periferia de bazeirreiros e currais. O índice de mortalidade informado foi de 3 a 5%. O índice de diarreia nos bezerros deste grupo foi de 57,14% do total de animais (Figura 1).

O controle e profilaxia de doenças parasitárias e infecto-contagiosa era orientado pelo Médico Veterinário responsável técnico, com visitas quinzenais às propriedades onde os animais enfermos eram separados em enfermarias para tratamento intensivo.

Nas duas propriedades deste grupo havia controle genético e a raça explorada era Holandesa Preto e Branco (HPB).

4.1.3. Grupo III.

No grupo III foram enquadrados quatro propriedades que apresentaram características técnico-sanitário e manejo semelhantes.

Nas propriedades deste grupo os bezerros permaneciam em média 24 hs com as mães, posteriormente eram

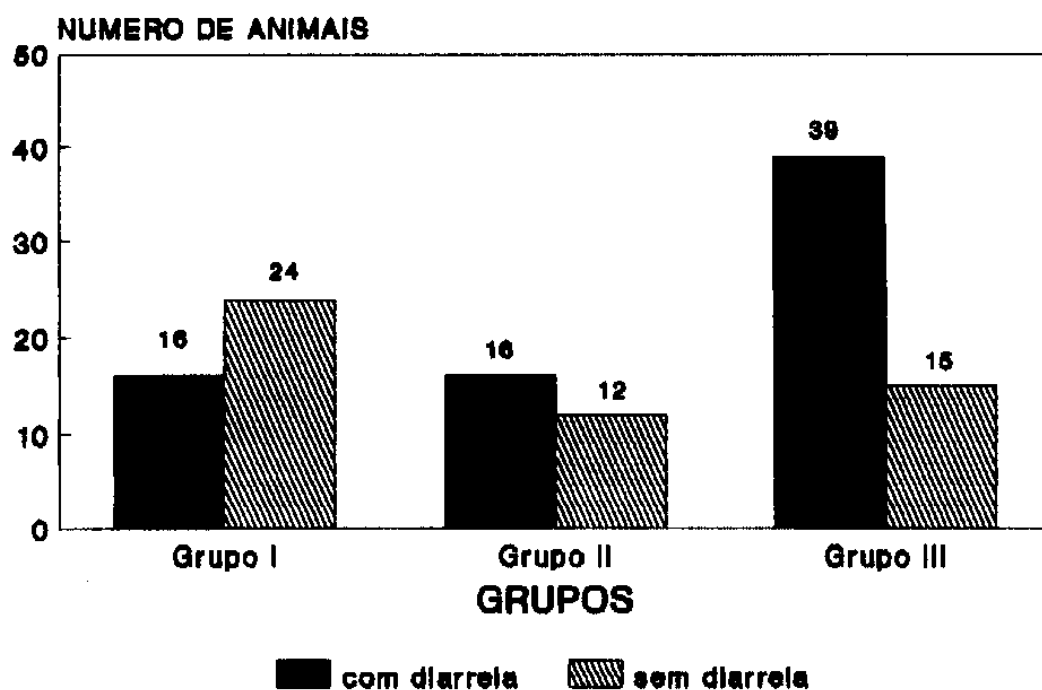


FIGURA 1: Resultados encontrados nos grupos, para presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. considerando a condição clínica de presença ou ausência de diarreia.

apartados e colocados em bezerreiros coletivos. Como nas propriedades deste grupo o sistema de ordenha era o de bezerro ao pé da vaca, estes só mamavam ao término da ordenha, quando então eram soltos em piquetes até as 15 hs e novamente eram recolhidos. Ao término da ordenha da tarde, os bezerros eram liberados no curral para alimentarem-se nas respectivas mães. Em apenas uma das propriedades o aleitamento era artificial, feito em baldes, sendo administrado 3 litros de leite por dia para cada bezerro, em uma só vez.

O desmame era feito a medida que os bezerros completavam 6-7 meses de idade, quando eram colocados no pasto. Bezerros muito debilitados, recebiam suplementação alimentar com ração balanceada.

A falta de higiene era notória em todas as dependências, observando-se acúmulo de fezes de vários dias nos bezerreiros, currais e periferia dos prédios. Nos bebedouros notou-se água acumulada por vários dias onde havia crescimento de lodo e larvas de insetos.

A assistência médica-veterinária só era solicitada em caráter de emergência, não havendo profilaxia ou controle de doenças parasitárias ou infecto-contagiosa, o que pode ser confirmado pelo número elevado, de animais carrapateados.

Observou-se que bezerros doentes e mesmo moribundos não eram separados dos demais.

O índice de mortalidade informado foi de 5 a 12% ao

ano. A frequência de diarreia observada foi de 72,22% do total de bezerros examinados neste grupo (Figura 1).

Comparando-se aos grupos anteriores, o manejo zoonitário neste grupo pode ser considerado ruim.

4.2. Coloração de esfregaço pela safranina-azul de Metileno (S-AM).

Os esfregaços foram corados com solução aquosa de safranina a 1%, segundo BAXBY *et al.* (1984) e imediatamente eram submetidos à microscopia. Os oocistos coraram-se em rosa pálido, porém esta coloração desaparecia no dia seguinte, não permitindo mais evidenciá-los.

Na tentativa de melhorar esta técnica para facilitar a evidenciação e mensuração dos oocistos, o que permitiu chegar aos resultados da Tabela 1, a safranina passou a ser diluída em 10 ml de álcool etílico e completado o volume para 100 ml com água destilada. Esfregaços corados com esta solução exibiam nos oocistos uma coloração vermelho-rubi e refringente (Figura 2). A partir de então as lâminas puderam ser estocadas por até 5 meses sem haver alteração na tonalidade.

A presente técnica também evidenciou grande número

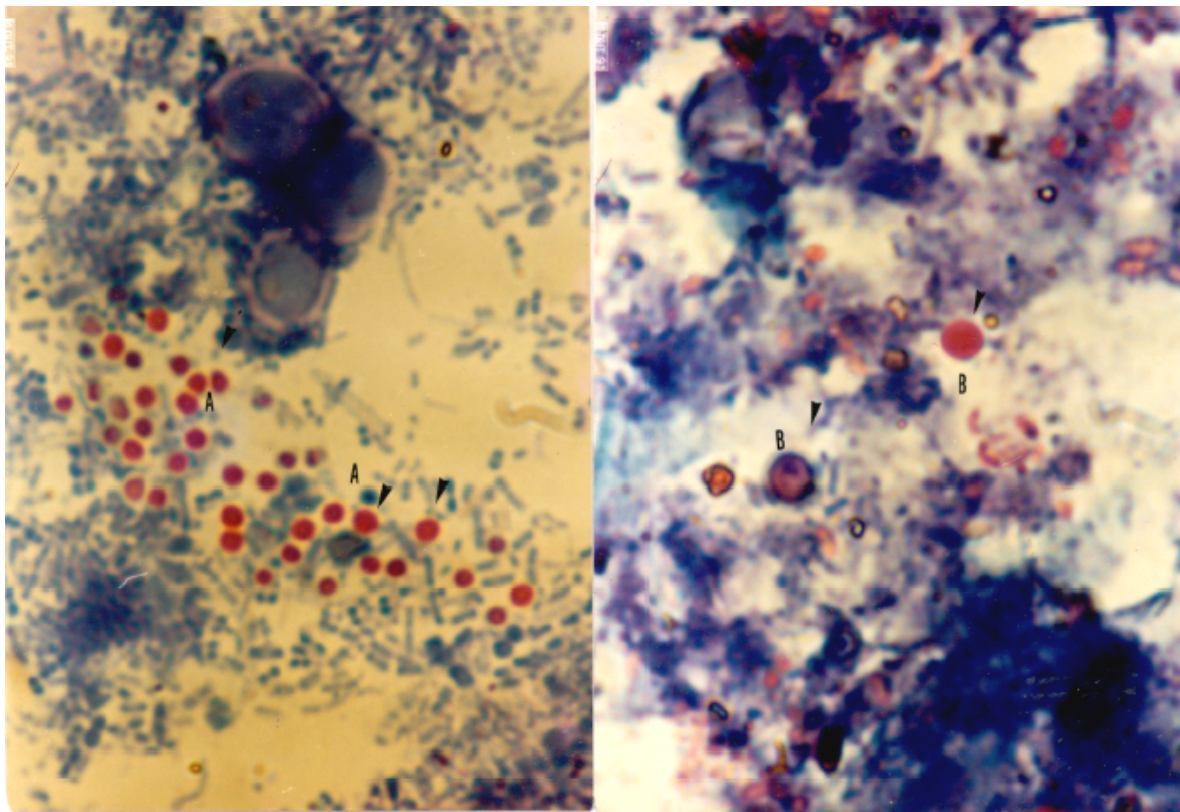


Figura 2 – *Cryptosporidium* sp. Esfregaços de fezes com oocistos de *C. muris* (a) e *C. parvum* (b). Safranina-azul de Metileno 1250X.

de pequenas formas ovóides coradas em vermelho, semelhante àquelas consideradas como corpos de leveduras por ANGUS *et al.* (1981) quando examinou amostras colhidas em bezerros com diarreia de um surto natural.

Bactérias e fragmentos de fungos coraram-se em azul o que permitiu o contraste dos oocistos corados em vermelhos como descrito por BAXBY *et al.* (1984).

4.3. Resultado da incidência de *Cryptosporidium* no total de bezerros examinados.

Da análise do resultado para exame de fezes dos 122 bezerros na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*, constatou-se que 59 tinham idade inferior a 30 dias, destes, 36 (61,02%) foram positivos e 23 (38,98%) negativos. Dos 63 bezerros com idade superior a 30 dias, observou-se que 52 (82,54%) tinham oocistos nas fezes e em 11 (17,46%) não se encontrou oocistos (Figura 3). Quanto a condição clínica, presença ou ausência de diarreia (Figura 4), nos 59 animais examinados, observou-se que 24 (40,68%) tinham diarreia e era positivos para o protozoário e que 11 (18,64%) animais negativos apresentavam a enteropatia diarreica. Dos bezerros sem diarreia, 12 (20,34%) foram positivos para a protozoose e

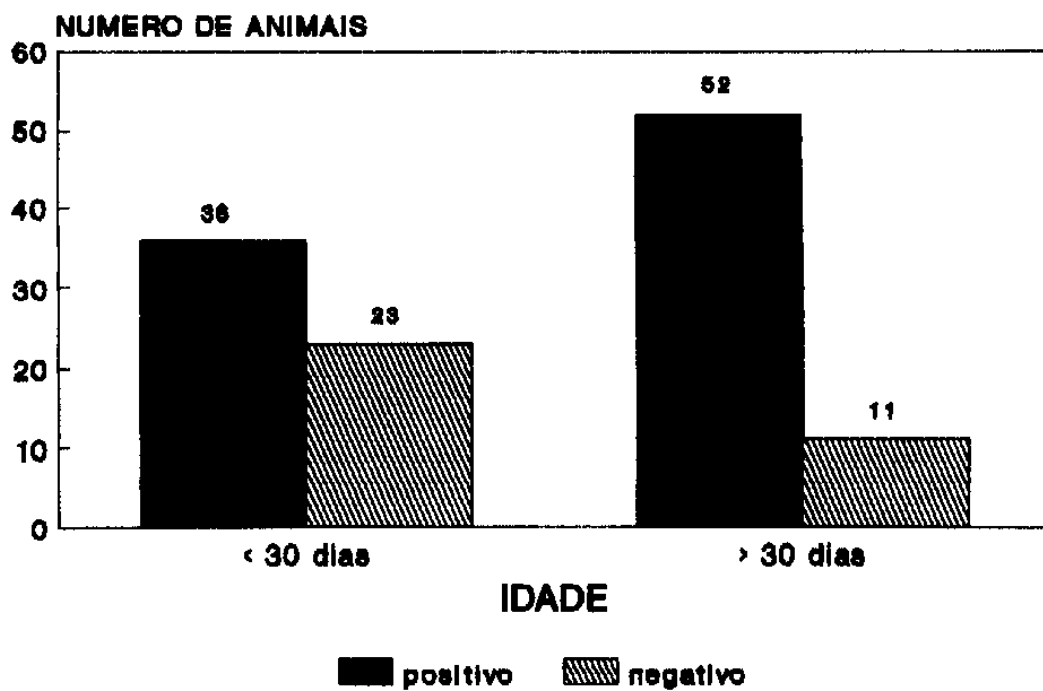


FIGURA 3: Incidência de *Cryptosporidium* sp, encontrados nos bezerros dos três grupos, considerando a idade.

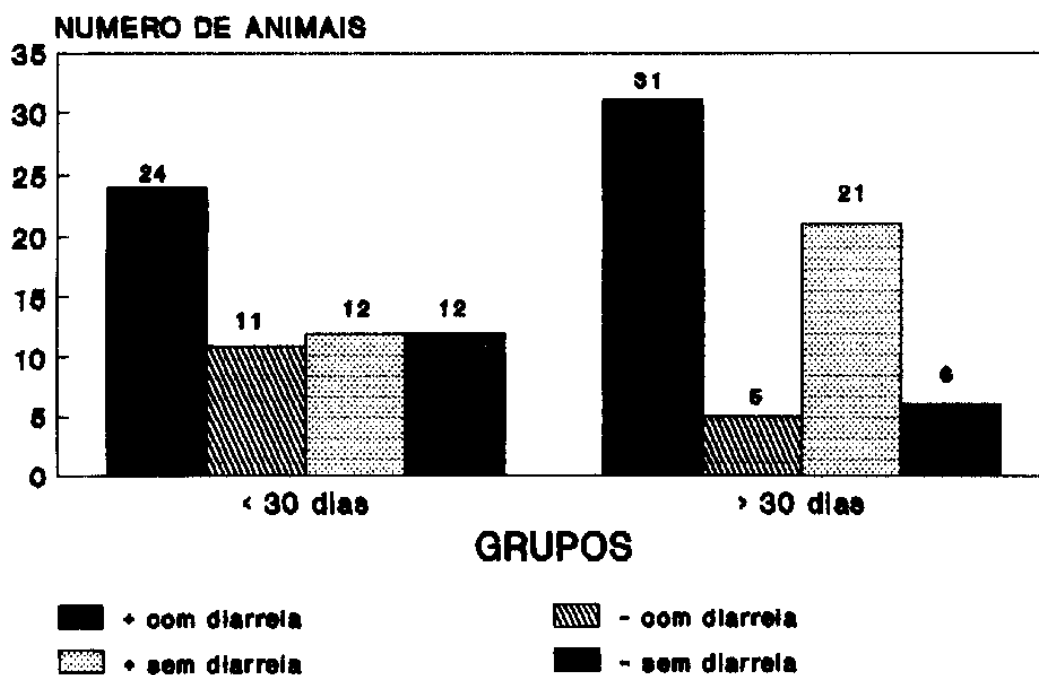


FIGURA 4: Incidência de *Cryptosporidium* sp, considerando a condição clínica, com e sem diarreia nos bezerros dos três grupos.

12 (20,34%) foram negativos.

Em relação aos 63 bezerros com idade superior a 30 dias, observou-se que em 31 (49,21%) dos animais positivos para *Cryptosporidium* a diarreia estava presente e em 5 (7,94%) dos animais diarreicos não foi encontrado oocistos nas fezes. Verificou-se ainda que em 21 (33,33%) dos bezerros sem diarreia, o protozoário foi detectado e em 61 (9,52%) não foi detectado oocistos nas fezes.

4.3.1. Resultados da incidência de *Cryptosporidium* em bezerros do Grupo I.

Dos 40 bezerros examinados neste grupo, observou-se que 20 tinham idade inferior a 30 dias e destes, 5 (55,56%) eram positivos para *Cryptosporidium* e apresentaram diarreia, e em 2 (18,18%) dos animais com diarreia não se observou oocistos nas fezes. Dos animais sem a enteropatia, 4 (44,44%) eram positivo para o coccídeo e 9 (81,82%) eram negativos. Nos 20 bezerros com idade acima de 30 dias, verificou-se que em 9 (50,00%) dos animais diarreicos o protozoário foi confirmado. Quanto aos bezerros sem diarreia, notou-se que 9 (50,00%) eram positivos para *Cryptosporidium* e 2 (100%) eram negativos (Figura 5).

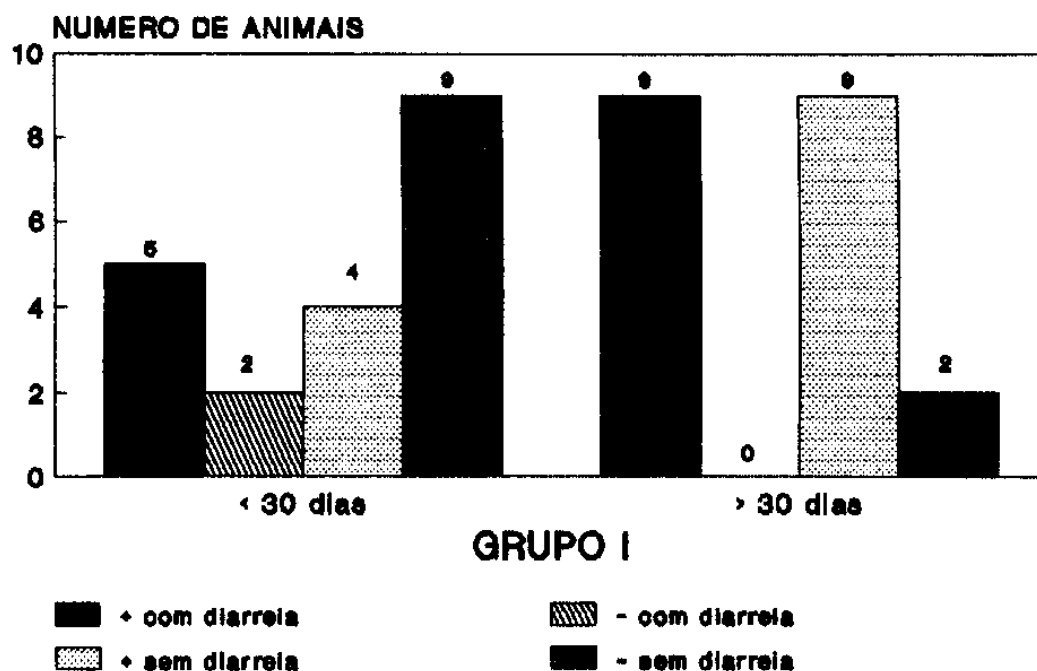


FIGURA 5: Resultados encontrados no Grupo I, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para o oocistos de *Cryptosporidium* sp, e a presença ou ausência de diarreia.

4.3.2. Resultados da incidência de *Cryptosporidium* em bezerros do Grupo II.

Neste grupo, foram examinados 28 bezerros dos quais 16 tinham idade abaixo de 30 dias, e destes, 8 (61,54%) dos animais com diarreia eram positivos para *Cryptosporidium* e 2 (66,67%) eram negativos. Dos bezerros sem diarreia, 5 (38,46%) eram positivos e 1 (33,33%) negativo. Nos 12 bezerros com idade superior a 30 dias foi observado que em 4 (50,00%) animais com enteropatia o protozoário foi detectado e em 2 (50,00%) não se detectou oocistos nas fezes (Figura 6). Dos bezerros sem diarreia, 4 (50,00%) foram positivos e 2 (50,00%) foram negativos para oocistos de *Cryptosporidium*.

4.3.3. Resultados da incidência de *Cryptosporidium* em bezerros do Grupo III.

Na análise dos resultados dos exames realizados nos bezerros do Grupo III, verificou-se que dos 54 animais, 23 apresentavam idade inferior a 30 dias, e destes, 11 (78,57%)

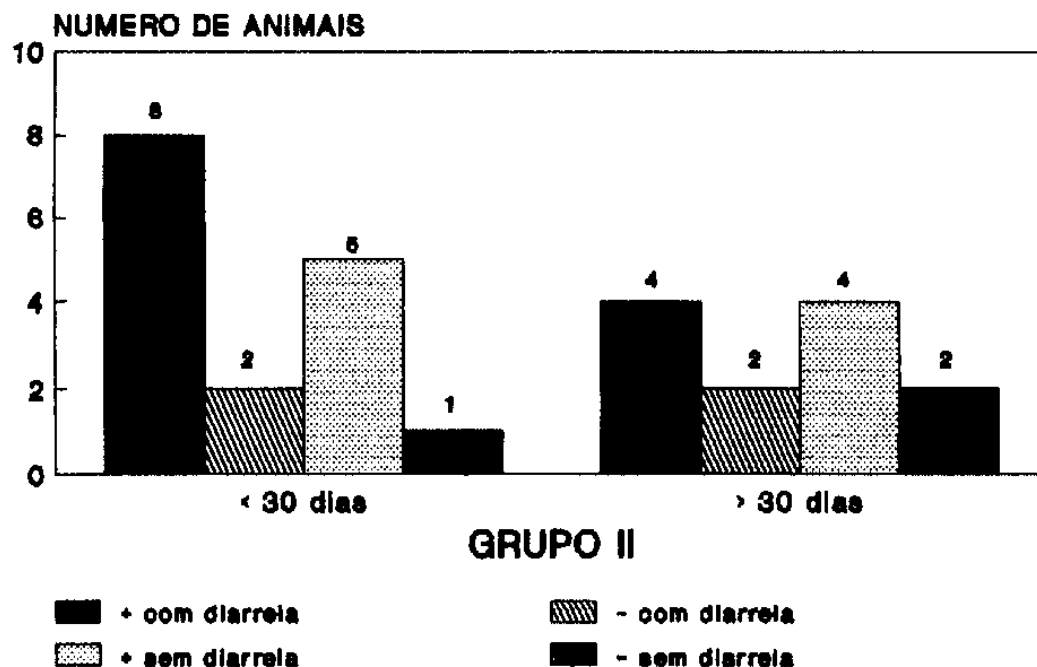


FIGURA 6: Resultados encontrados no Grupo II, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para o oocistos de *Cryptosporidium* sp, e a presença ou ausência de diarreia.

com diarreia eram positivos para o protozoário e 7 (77,78%) eram negativos. Dos bezerros que não apresentaram a enteropatia, em 3 (21,43%) foi detectado oocistos do protozoários nas fezes e em 2 (22,22%) não se detectou. Nos animais com idade acima de 30 dias, em 18 (69,23%) dos bezerros com diarreia a protozoose foi confirmada e em 3 (60,00%) não. Naqueles bezerros que não apresentaram a enteropatia, em 8 (30,77%) o protozoário estava presente e em 2 (40,00%) não se confirmou oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes (Figura 7).

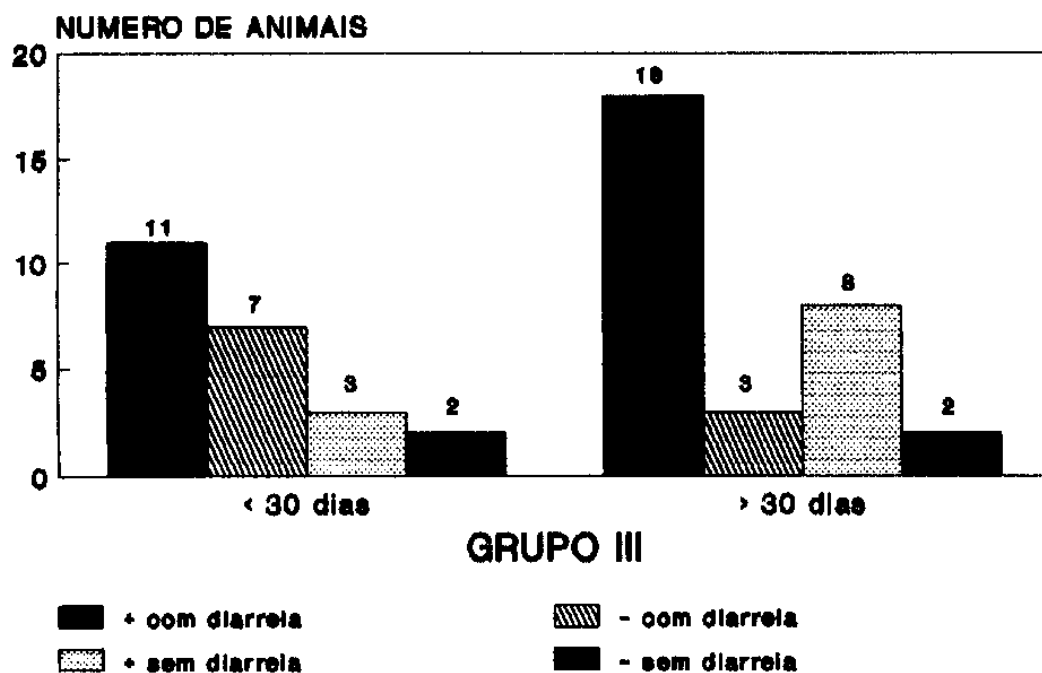


FIGURA 7: Resultados encontrados no Grupo III, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para o oocistos de *Cryptosporidium* sp, e a presença ou ausência de diarreia.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das espécies encontradas.

TIZZER (1907 e 1912) descreveu duas diferentes espécies de *Cryptosporidium* baseando-se na localização e medidas dos diâmetros polar e equatorial dos oocistos por ele isolado. Os oocistos maiores localizavam-se nas glândulas pepticas de camundongos e mediam 7 x 5 um de diâmetros polar e equatorial, respectivamente, sendo proposto o nome de *Cryptosporidium muris* para a nova espécie. Oocistos menores isolados por TIZZER (1912) localizavam-se nas criptas das vilosidades intestinais de coelhos, medindo (4,5-4,0) x (3,0-3,3) um de diâmetro polar e equatorial, sendo caracterizado como *C. parvum* pelo pesquisador.

Embora diferentes técnicas de diagnóstico possam alterar a forma e tamanho dos oocistos, conforme observou FAYER (1986) em seu trabalho de revisão e BOMFIM (1989) ao trabalhar com oocistos de *Cryptosporidium* isolados de

leitões, dos 200 oocistos examinados na presente pesquisa em fezes de bezerros, corados pela Safranina-azul de metileno (S-AM), observou-se duas formas distintas, esféricas ou sub-esféricas com dois tamanhos maiores e menores, resultados estes que corroboram com as observações de TIZZER (1907 e 1912) quando descreveu *C. muris* e *C. parvum* (Tabela 1).

Os resultados encontrados no presente trabalho comprovam as pesquisas de UPTON & CURRENT (1985) que reafirmaram existir duas espécies de *Cryptosporidium* parasitando bezerros. Estes pesquisadores encontraram oocistos maiores medindo 7,4 x 5,6 um de diâmetro polar e equatorial, respectivamente com um índice morfométrico de 1,3. Estas medidas assemelham-se àquelas observados por TIZZER (1907) para *C. muris*. Os oocistos menores observados por UPTON & CURRENT (1985) mediram 5,0 x 4,5 um de diâmetro polar e equatorial com 1,1 de índice morfométrico, dados bastantes próximos daqueles observados por TIZZER (1912) ao descrever *C. parvum*.

ANDERSON (1987) ao diagnosticar oocistos de *Cryptosporidium* nas glândulas gástricas de um bezerro de seis semanas de idade, verificou que estes eram idêntico à espécie *C. muris* de Tizzer (1907), e que eram maiores e mais ovais do que as formas comumente parasitas de intestino delgado de bezerros e outros mamíferos, semelhantes à *C. parvum*, e que dependendo de fatores pré-disponentes causam diarreia profusa.

TABELA 1: Valores médios e erro padrão da média dos diâmetros polar e equatorial dos oocistos de *Cryptosporidium* calculados a partir de 100 oocistos por espécie isolados de bezerros recém-nascidos e corados pela Safranina-Azul de Metileno (S-AM).

ESPÉCIE	DIÂMETRO DO OOCISTO		ÍNDICE MORFOMÉTRICO
	POLAR	EQUATORIAL	
<i>C. parvum</i>	3,45 ± 0,04	3,25 ± 0,03	1,09 ± 0,01
<i>C. muris</i>	6,24 ± 0,14	5,73 ± 0,11	1,09 ± 0,01

BOMFIM (1989) cita os valores $6,39 \pm 0,56 \times 6,22 \pm 0,56$ um de diâmetro polar e equatorial para oocistos de *C. muris* isolados de suínos e corados pela S-AM, estes dados quando comparados aos da Tabela 1 do presente trabalho mostraram-se equivalentes, caracterizando que a técnica usada tem boa margem de segurança para detecção de oocistos nas fezes.

5.2. Discussão sobre os fatores idade, condição clínica com e sem diarreia e infecção por *Cryptosporidium*.

SOBIEH *et al.* (1987) ao estudarem a incidência da Criptosporidiose em bezerros de uma importante bacia leiteira do sul da California, Estados Unidos, observaram que 19% dos bezerros tinham diarreia e destes, 21% foram positivos para *Cryptosporidium*, e que somente 1,9% dos animais sem diarreia foram positivos. Estes pesquisadores relacionaram a incidência da protozoose ao fato de que sendo os animais examinados, procedentes de uma região onde a pecuária explorada é tipicamente leiteira, há uma constante entrada de animais para reposição de rebanhos, associado ao manejo zoonitário inadequado nas granjas leiteiras.

Comparando-se os resultados de SOBIEH *et al.*

(1987), verificou-se que estes foram menores do que os encontrados no presente estudo, onde se examinou bezerros de uma importante bacia leiteira do sul do Estado do Rio de Janeiro onde também é observado constante entrada de animais para reposição de rebanhos, além de fatores relacionados a manejo zoonosológico inadequado como pode ser caracterizado nas propriedades visitadas.

Ao examinar 220 bezerros, MODULO *et al.* (1987), encontraram resultados também inferiores àqueles observados na presente pesquisa, 27,7% de bezerros positivos para *Cryptosporidium*, com diarreia e, 8,3% de animais positivos sem diarreia. Porém os dados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos de TZIPORI *et al.* (1980) quando encontraram 60% de bezerros positivos com diarreia.

As pesquisas de HEINE & BOCH (1981) e GIALLETTI *et al.* (1986) tiveram resultados semelhantes, na primeira observou-se 39,6% de bezerros positivos com diarreia e na segunda 38%, resultados estes menores do que aquele detectados no presente trabalho. Quando HENRIKSEN & KROGH (1985) examinaram bezerros com idade em 4 e 30 dias, encontraram resultados positivo para *Cryptosporidium* em 24,84%, dados também menores dos observados no presente estudo.

MODULO *et al.* (1988) encontraram 26% de bezerros menores que 30 dias com diarreia positivos para *Cryptosporidium* e 23% de bezerros maiores que 30 dias, sem

diarréia também positivos, resultados estes menores quando comparado aos 82,54% de bezerros positivos com idade acima de 30 dias, sem diarréia, encontrados no presente trabalho.

5.3. Análise estatística dos resultados.

Os resultados obtidos (Apêndice 4), mostraram existir diferença entre os grupos, apesar de que quando as médias foram submetidas ao teste de Tukey (Apêndice 5), não ter sido verificada diferença significativa entre elas.

O teste "F" para infecção, evidenciou haver significância entre positivos e negativos, as médias submetidas ao teste "t" mostraram significância (Apêndice 2).

O estudo da condição clínica, com e sem diarréia, pelo teste "F", mostrou significância, e as médias quando submetidos ao teste "t", mostraram-se estatisticamente diferentes.

Na comparação das duas faixas etárias consideradas, ao teste "F", verificou-se significância. As médias testadas pelo teste "t" não mostraram diferença estatisticamente significativa para essas determinações.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos na presente pesquisa, podemos concluir que:

a) os valores médios encontrados para diâmetro polar e equatorial dos oocistos corados pela S-AH, caracterizaram duas espécies do gênero *Cryptosporidium*, *C. muris* e *C. parvum*, e

b) com base na análise dos dados obtidos, em relação aos bezerros examinados, para diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* nos três grupos, o tipo de manejo zoonitário examinado interferiu na incidência desta parasitose, onde, nos bezerros com diarreia, verificou-se a maior incidência de positivos para *Cryptosporidium*, independente do manejo utilizado em cada sistema de criação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B.C. Patterns of shedding of Cryptosporidial oocysts in Idaho calves. J. AM. VET. MED. ASSOC., 178:1982-1984, 1981.
- ANDERSON, B.C. Cryptosporidiosis in Idaho lambs. J. AM. VET. MED. ASS., 181:151-153, 1982.
- ANDERSON, B.C.; DONNDELINGER, T.; WILKINS, R.M. & SMITH, J. Cryptosporidiosis a Veterinary Student. J. AM. VET. MED. ASS., 180:408-409, 1982.
- ANDERSON, B.C. Location of Cryptosporidia: Review of the literature and experimental infections in calves. AM. J. VET. RES., 45:1474-1477, 1984.
- ANDERSON, B.C. Effect of drying on the infectivity of cryptosporidia - laden calf feces for 3 - to 7 - day - old mice. AM. J. VET. RES., 47:2272-2273, 1986.
- ANDERSON, B.C. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. VET. PATHOL., 24:235-238, 1987.

- ANGUS, K.W. *Cryptosporidium* in man, domestic animals and birds: a review. J. R. SOC. MED., 76:62-70, 1983.
- ANGUS, K.W.; TZIPORI, S. & GRAY, E.W. Intestinal lesions in specific-pathogen-free lambs associated with a *Cryptosporidium* from calves with diarrhea. VET. PATHOL., 19:67-68, 1982.
- BERG, I.E.; PETERSON, A.C.; FREEMAN, T.P. Ovine Cryptosporidiosis. J. AM. VET. MED. ASS., 173:1586-1587, 1978.
- BOCH, J.; GOBEL, E.; HEINE, J.; BRANDLER, J. & SCHLDEMER, L. Kryptosporidien-infektion bei haustieren. BERL. MUNCH. TIERARZTL. WSHR., 95:361-367, 1982.
- BOMFIM, T.C.B. do. *Cryptosporidium muris* Izzet, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em suínos. identificação, diagnóstico e alguns aspectos epidemiológicos. Mestrado, UFRRJ, Itaguaí, 117p. 1989.
- BAXBY, D.; BLUNDELL, N. & HART, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. J. HYG. CAMB., 92:317-323, 1984.
- CAMPBELL, I.; TZIPORI, S.; HUTCHISON, G. & ANGUS, K.W. Effect of olisingectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. VET. REC., 111:414-415, 1982.
- CONTREPOIS, P.E. & VALLET, A. Cryptosporidiose et diarrhée neonatale en élevage bovin. POST. VET., 16:47-53, 1984.

- CURRENT, W.L.; UPTON, S.J. & HAYNES, T.B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chickens. J. PROTOZOOL., 33:289-296, 1986.
- CURRENT, W.L. Cryptosporidiosis. J. AM. VET. MED. ASS., 187:1334-1338, 1985.
- CURRENT, W.L.; REESE, N.C.; ERNST, J.V.; BAILEY, W.S.; HEYMAN, M.B. & WEINSTEIN, W.M. Human Cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. NEW ENGL. J. MED., 308:1252-1257, 1983.
- FAYER, R. & UNGAR, B.L.F. *Cryptosporidium* sp. and cryptosporidiosis. MICROBIOL. REV., 50:458-483, 1986.
- FIGUEIREDO, P.C. de. Infeções naturais por Eimeria em bovinos de raças leiteiras no Estado do Rio de Janeiro. Mestrado, UFRRJ. Itaguaí, 83p. 1982.
- GIALLETTI, L.; GRELONI, V.; ROSSAMIGO, E.C. & FIORINI, A. Cryptosporidiosis in some herds in central Italy. ATTI. SOC. VET., 32:751-753, 1986.
- GONSALEZ, M.C.; GOMEZ, E.S. & ALUJA, A.S. Cryptosporidiosis en bovinos lactentes (histopatologia, microscopia eletrônica de transmisión y de barrido). VETERINARIA MEXICO, 14:12-22, 1983.
- HEINE, V.J. & BOCH, J. Kryptosporidien-Infektionen beim Kalbnachweis, Vorkommen und Experimentelle Übertragung. BUL. MÜNCH. TIERARZTL. WSHR., 94:289-292, 1981.

- HEINE, V.J.; FOHLENZ, F.L.; MOON, H.W. & WOODE, D.N. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. J. INFEC. DIS., 150:768-775, 1984.
- HENRIKSEN, S.A. & KROGH, H.V. Bovine cryptosporidiosis in Denmark. I. Prevalence, age distribution and seasonal variation. NORDISK VETERINAERMED, 32:34-41, 1985.
- HOOVER, D.M.; HOERR, R.J.; CARLTON, W.W.; HINSMAN, E.J. & FERGUSON, M.W. Enteric *Cryptosporidium* in an naso tang, *Naso lituratus* block and shetedes. J. FISCH. DIS.; 4:425-428, 1981.
- HOWERTH, E.W. Bovine cryptosporidiosis. J. S. AFR. VET. ASS., 52:251-253, 1981.
- FIBGE. Dados preliminares do Senso Agropecuário, 1990.
- ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriona) from the domestic cat. JAPAN J. PARASITOL., 28:285-307, 1979.
- JERRET, I.V. & SNODGRASS, D.R. Cryptosporidia associated with outbreaks of neonatal calf diarrhea. AUST. VET. J., 57:434-435, 1981.
- JOHN, A.S. & SMITH, D.H. *Cryptosporidium* infection in a calf. J. AM. VET. MED. ASS., 162:731-732, 1975.
- JUNGMANN, R. & HIEPE, T. Ocurrence and diagnosis of cryptosporidiosis in newborn calves. MONATSH. VETERINAERMED., 38:299-300, 1983.

- KLESSIUS, P.H.; HAYNES, T.B. & MALO, L.K. Infectivity of *Cryptosporidium* sp. isolated from wild mice for calves and mice. J. AM. VET. MED. ASS., 182:192-193, 1986.
- LEVINE, N.D. Taxionomy and review of coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa: Apicomplexa). J. PROTOZOOL., 31:94-98, 1984.
- MEUTEN, D.J. & VAN KRUININGEN, H.J. Cryptosporidiosis in a calf. J. AM. VET. MED. ASS., 165:914-917, 1974.
- MODOLO, J.R.; BISPING, W. & KIRPAL, K. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em bezerros com e sem diarréia. REV. BRAS. MED. VET., 2:5-6, 1987.
- MODOLO, J.R.; GONÇALVES, R.C.; KUCHEMBUCK, M.R.C. & GOTTSCHALK, A.F. Ocorrência de Criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu, SP. REV. BRAS. MED. VET., 10:9-10, 1988.
- MOON, H.W. & BEMRICK, W.J. Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. VET PATHOL., 18:248-255, 1981.
- MOON, H.W. & WOODMANSEE, D.B. Cryptosporidiosis. J. AM. VET. MED. ASS., 182:643-646, 1986.
- MORIN, M.; LARIVIERE, S. & LALLIER, R. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. CAN. J. COM. MED., 40:228-240, 1976.
- NAGY, B. & FOHLENZ, J. Die Cryptosporidiose: diagnose und therapie. TIERARZTL. PRAXIS., 10:163-172, 1982.

- NAVIN, R.T. & JURANEK, D.D. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiological and parasitologic review. REV. INFECT. DIS., 6:313-327, 1984.
- NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.L.; HOLSCHER, M.A. & YARDLEY, J.H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. GASTROENTEROLOGY, 70:592-598, 1976.
- O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* infections in man, animals, birds and fish. AUST. VET. J., 62:253-258, 1985.
- PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W. & GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. VET. PATHOL., 8:479-484, 1971.
- PEARSON, G.R. & LOGAN, E.F. Demonstration of cryptosporidia in the small intestine of calf by light transmission and scanning electron microscopy. VET. REC., 103:212-213, 1978.
- PEARSON, G.R.; LOGAN, E.F. & McNULTY, M.S. Distribution of cryptosporidia within the gastrointestinal tract of young calves. RES. VET. SC., 33:228-231, 1982.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental, 11ª edição. Piracicaba, 1985.
- POHJOLA, S.; JOKIPII, A.M.M. & JOKIPILIISA. Sporadic *Cryptosporidium* in a rural population is asymptomatic and associated with contact to cattle. ACTA. VET. SCAND., 22:91-102, 1986.

- POHJOLA, S. & LINDBERG, LARS-AXEL. Experimental Cryptosporidiosis in mice, calves and chicken. ACTA VET. SCAND., 22:80-90, 1986.
- POHLENZ, J.; BEMRICK, W.J.; MOON, H.W.; CHEVILLE, N.F. Bovine Cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the cycle and of the host parante relationship. VET. PATHOL., 15:417-427, 1978a.
- POHLENZ, J.; MOON, H.W.; CHEVILLE, N.F. & BEMIRICK, W.J. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. J. AM. VET. MED. ASS., 122:452-457, 1978b.
- POHLENZ, J. Bovine Cryptosporidiosis. ASSIUT. VET. MED. J., 2:37-41, 1980.
- POWELL, H.S.; HOLSCHE, M.A.; HEALTH, J.E. & BEESLEY, F.F. Bovine cryptosporidiosis (a case report). VET. MED. SMALL. ANIM. CLIN., 21:205-207, 1976.
- REESSE, N.C.; CURRENT, W.L.; ERNEST, J.V. & BAILEY, W.S. Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. AM. J. TROP. MED. HYG., 31:226-229, 1982.
- REYNOLDS, D.J.; MORGAN, J.H.; CHANTER, N.; JONES, P.W.; BRIDGER, J.C.; DBNEY, T.G. & BUNCH, K.J. Microbiology of calf diarrhea in Southern Britain. VET. REC., 112:34-39, 1986.

- RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. BULL. U.S. ARMY. MED. DEP., 8:326, 1948.
- ROSEMBERG, F.J. Estructura social y epidemiologia veterinaria en America Latina. BOL. CENTRO PANAMERICANO FIEBRE AFTOSA, 52:3-23, 1986.
- SANFORD, S.E. & JOSEPHSON, G.K.A. Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. CAN. VET. J., 23:343-347, 1982.
- SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J. COMP. PATHOL., 65:262-266, 1955.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods. Iowa State University, Ames. 6th ed. 1967.
- SNODGRASS, D.R.; ANGUS, K.W.; GRAY, E.W.; KEIR, W.A. Cryptosporidia associated with rotavirus and an *Escherichia coli* outbreak of calf scour. VET. REC., 102:458-459, 1981.
- SNODGRASS, D.R.; ANGUS, K.W. & GRAY, E.W. Experimental cryptosporidiosis in germ-free lambs. J. COMP. PATHOL., 24:141-152, 1984.
- SNODGRASS, D.R.; TERZOLO, H.R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J.D. & SYNGE, B.A. Aetiology of diarrhea in young calves. VET. REC., 112:31-34, 1986.

- SOBIEH, M.; TACAL, J.V.; WILCKE, B.W.; LAWRENCE, W.; AMER EL AHRAF. Investigation of cryptosporidial infection in calves in San Bernardino County, California. J. AM. VET. MED. ASS., 121:816-818, 1987.
- SOULE, E.; PLATEAU, E.; PERRET, C.; CHERMETTE, R. & FETON, M.M. Observation de cryptosporidies chez le poulain. REV. MED. VET., 719-720, 1983.
- TRIFFIT, M.J. Observations on two new species of coccidia parasitic in snakes. Protozoology, 1:19-26, 1925.
- TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. SCIENTIFIC PROC., 5:12-13, 1907.
- TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum*, a coccidium found in the small intestine of common mouse. ARCH. PROTISTENKD., 26:394-412, 1912.
- TZIPORI, S.; CAMPBELL, I.; SHERWOOD, D.; SNODGRASS, D.R. & WHITELOW. An outbreak of calf diarrhea attributed to cryptosporidial infection. VET. REC., 107:579-580, 1980.
- TZIPORI, S. The etiology and diagnosis of calf diarrhea. VET. REC., 108:510-514, 1981.
- TZIPORI, S.; Mc CARTHEY, E.; LAWSON, G.H.K. & ROWLAND, A.C. Experimental infection of piglets with *Cryptosporidium*. RES. VET. SCI., 31:358-368, 1981a.
- TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; GRAY, E.W.; CAMPBELL, I. ALLAN FRANCIS. Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolates from calves. AM. J. VET. RES., 42:1401-1403, 1981b.

- TZIPORI, S.; LARSEN, J.; SMITH, M. & LEUFL, R. Diarrhea in goat kids attributed to *Cryptosporidium* infection. VET. REC., 111:35-36, 1982a.
- TZIPORI, S.; SMITH, M.; MARKIN, T. & HALPIN, C. Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from colfaeces. VET. PATHOL., 11:121-126, 1982b.
- TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in animal and humans. MICROB. REV., 47:84-86, 1983.
- TZIPORI, S.; SMITH, C.; HALPIN, C.; ANGUS, K.W. & SHERWOOD, D. Experimental cryptosporidiosis infection in calves: clinical manifestations and pathological findings. VET. REC., 112:116-120, 1983.
- UPTON, S.J. & CURRENT, W.L. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. J. PARASITOL., 75:625-629, 1985.

APENDICE

APÊNDICE I: Preparo do esfregaço. Técnica de sedimentação em formalina-éter (Método de RITCHIE, 1948).

- 1 - Transferira 3 g de fezes para um tubo de ensaio e complete com solução salina fisiológica, homogeneizar.
- 2 - Passe o conteúdo homogeneizado por uma gaze de quatro dobras molhada.
- 3 - Centrifugue por 2 min. à 2000 rpm.
- 4 - Lave duas vezes em solução salina fisiológica, centrifugando como acima e despresando o sobrenadante, a cada vez.
- 5 - Misture ao sedimento 10 ml de formalina a 10% e deixe fixar por 5 min.
- 6 - Adicione 3 ml de éter sulfúrico, inverta o tubo e agite vigorosamente.
- 7 - Centrifugue a 2000 rpm por 2 minutos.
- 8 - Desprese o sobrenadante. Faça o esfregaço com o sedimento.
- 9 - Se a quantidade de sedimento for insuficiente que dificulte a colheita com a alça de platina para realização do esfregaço, adicione algumas gotas de solução salina fisiológica e misture bem.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. BULL. U.S. ARMY. MED. DEP., 8:326, 1948.

APÊNDICE II: Técnica de coloração pela safranina-azul de metileno.

- 1 - Preparar o esfregaço segundo técnica de RITCHIE.
- 2 - Secar.
- 3 - Fixar rapidamente por aquecimento em bico de Bunsen ou secador de cabelo.
- 4 - Fixar em solução de Metanol clorídrico a 3% (3 ml de HCl em 100 ml de metanol) por 3 a 5 minutos.
- 5 - Lavar em H₂O corrente.
- 6 - Corar com solução de Safranina aquosa a 1% (1 g de safranina + 10 ml de álcool etílico + 90 ml de H₂O destilada).
- 7 - Aquecer a lâmina até a fervura, se necessário adicionar mais solução de safranina.
- 8 - Lavar em água corrente.
- 9 - Cobrir o esfregaço com solução a 1% de azul de metileno, deixar por 30 segundos.
- 10 - Lavar em água corrente.
- 11 - Secar.
- 12 - Examinar com objetiva, de imersão.

APÊNDICE III: Preparação da solução de safranina a 1%.

- 1 - Pesar 1 grama de safranina.
- 2 - Diluir em 10 ml de álcool etílico 96 GL.
- 3 - Completar o volume para 100 ml com água destilada.

APÊNDICE IV: Análise da variância, dos valores transformados, do número de bezerros, com e sem diarreia, nos três diferentes grupos (a), considerando a infecção por *Cryptosporidium* (b), infecção (c), idade (d).

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO
Grupos (a)	2	0,3274**
Infecção (c)	1	4,2204*
Diarreia (d)	1	0,0675**
Idade (e)	1	0,1854**
Erro	18	0,5605

(a) - Grupos segundo a condição de manejo.

(b) - *Cryptosporidium muris* e *C. parvum*.

(c) - Infecção positivo e negativo.

(d) - Presença ou ausência de diarreia.

(e) - Idade menor ou maior de 30 dias.

** - $P < 0,01$.

* - $P < 0,05$.

APÊNDICE V: Contrastes de médias das fontes analisadas.

FONTES		MÉDIAS	TESTE DE TUKEY (5%)	TESTE "t" (5%)
Grupo	III	2,53	ns	
	I	2,20	ns	
	II	2,17	ns	
Infecção	+	2,72		s
	-	2,25		s
Diarreia	Com	2,35		s
	Sem	2,25		s
Idade (dias)	< 30	2,39		ns
	> 30	2,21		ns

s - significativo ($P < 0,05$).

ns - não significativo ($P \geq 0,05$).

Os dados foram transformados para Raiz quadrada de $X + 0,5$.

APÊNDICE VI: Resultados encontrados nos grupos, para presença de oocisto de *Cryptosporidium* sp., considerando a condição clínica de presença ou ausência de diarreia.

GRUPO	NÚMERO DE ANIMAIS	CONDIÇÕES CLÍNICAS	
		COM DIARRÉIA	SEM DIARRÉIA
I	40	16 (40,00%)	24 (60,00%)
II	28	16 (57,14%)	12 (42,86%)
III	54	39 (72,22%)	15 (27,78%)

APÊNDICE VII: Incidência de *Cryptosporidium* sp, encontrados nos bezerros dos três grupos, considerando a idade.

IDADE EM DIAS	NÚMERO DE BEZERROS	<i>Cryptosporidium</i> sp	
		POSITIVOS	NEGATIVO
< 30	59	36 (61,02%)	23 (38,98%)
> 30	63	52 (82,54%)	11 (17,46%)

APÊNDICE VIII: Incidência de *Cryptosporidium* sp, considerando a condição clínica, com e sem diarreia nos bezerros dos três grupos.

IDADE EM DIAS	NÚMERO DE BEZERROS	POSITIVO		NEGATIVO	
		C/DIARRÉIA	S/DIARRÉIA	C/DIARRÉIA	S/DIARRÉIA
< 30	59	24 (40,68%)	12 (20,34%)	11 (18,64%)	12 (20,34%)
> 30	63	31 (49,21%)	21 (33,33%)	5 (7,94%)	6 (9,52%)

APÊNDICE IX: Resultados encontrados no Grupo I, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para oocistos de *Cryptosporidium* sp, e a presença ou ausência de diarreia.

IDADE EM DIAS	NÚMERO DE BEZERROS	POSITIVO		NEGATIVO	
		C/DIARRÉIA	S/DIARRÉIA	C/DIARRÉIA	S/DIARRÉIA
< 30	20	5 (55,56%)	4 (44,44%)	2 (18,18%)	9 (81,82%)
> 30	20	9 (50,00%)	9 (50,00%)	0	2(100,00%)

APÊNDICE X: Resultados encontrados no Grupo II, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para oocistos de *Cryptosporidium* sp e a presença ou ausência de diarreia.

IDADE EM DIAS	NÚMERO DE BEZERROS	POSITIVO		NEGATIVO	
		C/DIARRÉIA	S/DIARRÉIA	C/DIARRÉIA	S/DIARRÉIA
< 30	16	8 (61,54%)	5 (38,46%)	2 (66,67%)	1 (33,33%)
> 30	12	4 (50,00%)	4 (50,00%)	2 (50,00%)	2 (50,00%)

APÊNDICE XI: Resultados encontrados no Grupo III, considerando o número total de animais do grupo, positivos ou negativos para oocistos de *Cryptosporidium* sp e a presença ou ausência de diarreia.

IDADE EM DIAS	NÚMERO DE BEZERROS	POSITIVO		NEGATIVO	
		C/DIARRÉIA	S/DIARRÉIA	C/DIARRÉIA	S/DIARRÉIA
< 30	23	11 (78,57%)	3 (21,43%)	7 (77,78%)	2 (22,22%)
> 30	31	18 (69,23%)	8 (30,77%)	3 (60,00%)	2 (40,00%)