

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Cryptosporidium spp. EM BEZERROS (*BOS TAURUS* E
BOS INDICUS) DA REGIÃO CENTRO-OESTE DE MINAS
GERAIS**

Roberto César Araujo de Lima

Médico Veterinário

JABOTICABAL

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Cryptosporidium spp. EM BEZERROS (*BOS TAURUS* E
BOS INDICUS) DA REGIÃO CENTRO-OESTE DE MINAS
GERAIS**

Roberto César Araújo de Lima

Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Sérgio Ferraud

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL

2013

L732o Lima, Roberto César Araujo
Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* ssp.
em bezerros (*Bos taurus* e *bos indicus*) da região Centro-Oeste de
Minas Gerais, Brasil / Roberto César Araujo Lima. – – Jaboticabal,
2013
xv, 57 p. : il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Alvimar José da Costa

Coorientador: Antonio Sergio Ferraudo

Banca examinadora: Kátia Denise Saraiva Bresciani, Claudio
Alessandro Massamitsu Sakamoto, Welber Daniel Zanetti Lopes,
Gilson Pereira de Oliveira

Bibliografia

1. *Cryptosporidium andersoni*. 2. *Cryptosporidium ryanae*. 3.
Bovinos. 4. Minas Gerais I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.91:636.2

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROBERTO CÉSAR ARAUJO DE LIMA, filho de Milton Ferreira de Lima e Cleonice Medeiros Araujo de Lima, nasceu em 10 de Junho de 1978 na cidade de Campina Grande, Paraíba. Concluiu o ensino médio em 1998, formando-se em Técnico em Agropecuária pelo Colégio Agrícola “Vidal de Negreiros”, na cidade de Bananeiras – PB. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande no ano de 2000, tendo-o concluído no ano de 2004 e, durante tal período, realizou estágios nas áreas de extensão rural e parasitologia veterinária. Ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no ano de 2007 concluído-o em fevereiro de 2009, no mesmo ano e na mesma faculdade ingressou no doutorado.

ALGUNS PENSAM EM COISAS QUE JÁ OCORRERAM
EU, SONHO COM COISAS QUE NUNCA ACONTECERAM

BERNARD SHAW

In memoriam: Meu Pai Milton Ferreira de Lima
Minha Mãe Cleonice Medeiros Araujo de Lima
Minha esposa Rejane de Paula Tomé
Por acreditarem sempre em mim

DEDICO

In memoriam: meus Avós;
Aos meus Irmãos e sobrinha;
Meus familiares: Tios e Tias;
Aos meus Amigos;

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Alvimar José da Costa, pelo apoio, confiança e pela oportunidade dada em concretizar um grande sonho com contribuições incalculáveis.

Prof. Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani por contribuir intensamente em todas as etapas da tese, por ter sido fundamental na concretização deste sonho.

Ao Prof. Carlos Noriyuki Kaneto, pela parceria, carinho e alegria, abrindo o Laboratório de Parasitologia para o armazenamento e processamento das amostras.

Aos professores do departamento de ciências exatas, Prof. Dr. João Ademir de Oliveira, Prof. Dr. Antonio Sérgio Ferraud e especialmente o Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, ajudando-me incessantemente com os resultados estatísticos.

Aos pós graduandos: Monally Aquino, Anaiza Zucatto; Milena Viol, Luiz Silveira Neto, Breno Cruz e Sandra Valéria, em todas as etapas das análises.

Aos alunos de graduação em medicina veterinária Bruno César, Edvânia Nunes, Marcos Fonseca, Thárssio Dinelli e Samuel Bottrel, ajudaram na colheita e processamento das amostras.

Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira acreditando sempre na concretização de um sonho, mesmo que muitos já descreditavam, mesmo que muitos já diziam que não tinha jeito, mesmo que muitos já diziam não.

A todos os funcionários e colegas do Departamento de Pós-Graduação em Medicina Veterinária FCAV/UNESP, foram solícitos e sensibilizados em todas as etapas de meu doutorado.

Aos funcionários e alunos da UNESP/ Araçatuba, pelo apoio e ajuda prestada, em especial a Cleonice e a Gilmara.

Aos membros da república Casa Verde (RKV), pela alegria companheirismo, apoio técnico e social, foram verdadeiros amigos.

E finalmente, a Rejane de Paula Tomé, pelo apoio, carinho e compreensão neste caminho árduo que foi trilhado.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	Xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos gerais.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 DIAGNÓSTICO DA CRIPTOSPORIDIOSE	22
3.1.1 Métodos parasitológicos diretos.....	22
3.1.2 Métodos imunológicos.....	22
3.1.3 Métodos moleculares.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. LOCAIS E PERÍODO.....	24
4.2. ANIMAIS UTILIZADOS.....	24
4.3. COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	26
4.3.1 Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> pela coloração negativa de Verde Malaquita.....	27
4.3.2 Caracterização molecular.....	27
4.3.2.1 Reação de Nested-PCR para amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	28
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5. RESULTADOS	30
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Localização da cidade de Formiga – MG.....	24
FIGURA 2. Animais Sem Raça Definida (SRD).....	25
FIGURA 3. Animais da Raça Nelore.....	26
FIGURA 4. Bezerra da Raça Holandesa.....	27
FIGURA 5. Aspecto microscópico de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp em esfregaços fecais de bezerros corados em coloração negativa de verde malaquita (setas).....	30
FIGURA 6. Amplificação intensa na eletroforese em triplicata para realização do sequenciamento de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	31
FIGURA 7. Quantificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp em amostras positivas (técnica de contraste negativo de verde malaquita) oriundas de bovinos mantidos em três sistemas de criação no município de Formiga – Minas Gerais, Brasil.....	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp em rebanhos bovinos no mundo.....	20
TABELA 2 - Caracterização molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp em rebanhos bovinos no mundo	21
TABELA 3 - Distribuição de positividade de <i>Cryptosporidium</i> spp pela técnica de contraste negativo com verde malaquita de acordo com a as propriedades estudadas.....	32
TABELA 4 - Ocorrência da infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp, diagnosticada pela técnica de contraste negativo com verde malaquita e pela Nested PCR de acordo com as variáveis: grupo racial, sexo, idade, escore, aleitamento e consistência fecal.....	33
TABELA 5 - Distribuição das espécies de <i>Cryptosporidium</i> de acordo com a faixa etária dos animais.....	34

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS (*BOS TAURUS* E *BOS INDICUS*) DA REGIÃO CENTRO-OESTE DE MINAS GERAIS

RESUMO

A criptosporidiose é uma enfermidade de veiculação hídrica, possui como agravante a dificuldade de prevenção da contaminação ambiental e ausência de medidas terapêuticas eficazes. Com acentuada importância na bovinocultura, ocasiona inflamação e atrofia das vilosidades intestinais resultando em perda da superfície de absorção. O presente estudo teve como objetivo caracterizar molecularmente a infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros do Município de Formiga, região Centroeste de Minas Gerais. Um total de 300 amostras de fezes de bezerros holandeses, nelore e sem raça definida, foram avaliadas pela técnica de coloração contraste negativo de verde malaquita e por meio da reação de *nested*-PCR para amplificação de fragmentos de DNA da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico. Ocorrência de 5,33% (16/300) pelo verde malaquita e 4,66% (14/300) pela PCR foram observadas, sendo que por meio da caracterização molecular foram identificadas as espécies *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium ryanae*. Os bezerros infectados apresentavam baixa eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Não houve sendo que não houve relação da positividade com todas as variáveis estudadas. No sequenciamento foi encontrado as espécies de *C. andersoni* e *C. ryanae*, inclusive parasitando bezerros em faixas etárias, não relatadas na literatura. Estas duas espécies de *Cryptosporidium*, caracterizados molecularmente (*Nested*-PCR), no presente estudo, são descritas pela primeira vez parasitando bovinos do estado de Minas Gerais, Brasil.

Palavras-Chave: Bovinos, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium ryanae*, e Minas Gerais.

**OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CALVES IN
Cryptosporidium spp. (BOS TAURUS AND BOS INDICUS) IN SOUTH-WEST OF
MINAS GERAIS**

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a waterborne disease, has as aggravating the difficulty of preventing environmental contamination and the absence of effective therapeutic measures. With pronounced importance to the cattle, causes villous atrophy and inflammation resulting in loss of intestinal absorption surface. The present study aimed to characterize molecularly infection by *Cryptosporidium* spp. calves in the City of Formiga, Midwest region of Minas Gerais. A total of 300 stool samples from Holstein calves, and Nelore breed were evaluated by negative contrast staining of malachite green and through the reaction of nested-PCR for amplification of DNA fragments of the 18S subunit of the RNA gene ribosomal. Occurrence of 5.33% (16/300) for malachite green and 4.66% (14/300) were observed by PCR, and by molecular characterization were identified species *Cryptosporidium andersoni* and *Cryptosporidium ryanae*. Calves infected had lower elimination of *Cryptosporidium* spp. There was no positive relationship with all the variables. Sequencing were found in the species *C. andersoni* and *C. ryanae*, including parasitizing calves in age, not reported in the literature. These two species of *Cryptosporidium*, molecularly characterized (nested PCR), the present study describes for the first time parasitizing cattle in the state of Minas Gerais, Brazil.

KEY-WORDS: Cattle, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium ryanae* and Minas Gerais.

1. INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos intracelulares obrigatórios, pertencentes ao filo Apicomplexa e capazes de se desenvolver nas microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal de hospedeiros vertebrados como mamíferos, aves, répteis, peixes, e anfíbios (XIAO et al., 2004).

A criptosporidiose humana se caracteriza por diarreia, desidratação, má absorção e perda de peso Tzipori e Ward (2002). Infecções autolimitantes podem ocorrer em indivíduos imunocompetentes Al-Braiken et al. (2003). Em pacientes imunocomprometidos, esta enfermidade geralmente apresenta evolução para a forma crônica e subsequente óbito (ABRAHAMSEN et al., 2004).

Nos imunossuprimidos, a infecção é frequentemente crônica, ou até letal (XIAO et al., 2004). Assim, a importância desta doença é traduzida não só pelo potencial zoonótico de algumas espécies, como também pela perda econômica que esta infecção pode promover (OLSON et al., 2004).

Séria enfermidade de veiculação hídrica tem como agravante a dificuldade de prevenção da contaminação ambiental e ausência de terapias eficazes (Dillinghama et al., 2002), sendo incluída na iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde, com estreita relação a populações de baixo poder aquisitivo, precárias condições de saneamento básico e qualidade da água consumida (SAVIOLI et al., 2006).

A partir da década de 80, o protozoário *Cryptosporidium* tem sido considerado um importante agente etiológico de diarreia, no contexto da medicina humana e veterinária Sréter e Varga (2000); Ashbolt (2004); Xiao et al. (2004). Em seres humanos, adquiriu ainda, enorme importância em saúde pública, após o surgimento do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (XIAO; FAYER, 2008; FAYER, 2010).

Algumas características particulares distinguem esse gênero de outros coccídeos, como a localização que ocupam na célula do hospedeiro, a capacidade de auto-infecção e sua resistência a muitos antiparasitários. Os oocistos são altamente resistentes em condições ambientais e a ação de produtos químicos, o que é atribuído à sua parede que consiste de uma

complexa barreira protetora formada por uma dupla camada de matriz lipoproteica e carboidratos (PLUTZER; KARANIS, 2009).

Os métodos convencionais para o diagnóstico desta infecção incluem as técnicas de microscopia de imunofluorescência, testes imunoenzimáticos (ELISA) usando anticorpos não específicos e esfregaços fecais com corantes ácidos rápidos, como Ziehl-Neelsen ou fucsina-carbólica, que exigem tempo e experiência do observador, visto que os oocistos são dificilmente visualizados, apresentam dimensões diminutas e não contém esporocistos (FAYER, 2010).

Com relação aos métodos diagnósticos de rotina supracitados, vale ressaltar que oocistos e outros estágios evolutivos do gênero *Cryptosporidium* são muito pequenos e por vezes muito semelhantes, em suas características morfológicas e de coloração, às leveduras, fungos e outras estruturas presentes em amostras fecais, o que pode resultar em diagnósticos falso-positivo. Em casos em que há poucos oocistos em amostras fecais, ou dúvidas quanto ao diagnóstico, é recomendado que este seja confirmado por meio da combinação dessas técnicas, ou de preferência, utilizando técnicas mais específicas como a PCR (MEIRELES, 2010).

Além disso, somente a biologia molecular é capaz de identificar as espécies ou genótipos do referido gênero, o que é relevante do ponto de vista de saúde pública e animal (FAYER, 2010).

Cryptosporidium parvum, é um importante agente etiológico de diarreia em ruminantes recém-nascidos O'Handley e Olson (2006), com reconhecido potencial zoonótico (Xiao e Feng, 2008). A espécie bovina pode também ser infectada pelo *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ryanae* e *Cryptosporidium andersoni* (FAYER et al., 2008; SANTIN et al., 2008; XIAO, 2010, ROBINSON et al., 2012).

Na literatura brasileira, devido ao alto custo de técnicas moleculares, os métodos de microscopia são os mais utilizados para o diagnóstico de rotina de infecções por *Cryptosporidium* spp. Em virtude da variação genética entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, é de fundamental importância a caracterização molecular de isolados em nosso país (MEIRELES, 2010).

Devido à escassez de trabalhos sobre caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp em bezerros, no estado de Minas Gerais, Brasil e pela inexistência de um estudo comparativo da ocorrência deste protozoário em

grupos raciais de grande importância econômica (leite e carne) realizou-se a presente pesquisa.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivos gerais

Determinar a ocorrência e caracterizar molecularmente *Cryptosporidium* spp em bezerros do Centroeste de Minas Gerais, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

Demonstrar a intensidade do parasito na região estudada e verificar a importância da infecção.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1907, Ernest Edward Tyzzer, detectou com ineditismo, *Cryptosporidium muris* em glândulas gástricas de camundongos. Posteriormente este mesmo pesquisador evidenciou o *Cryptosporidium parvum*, em células do intestino delgado desta mesma espécie animal (TYZZER, 1912).

Quanto à posição taxonômica, este parasito está classificado na Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1984; XIAO; FAYER, 2008).

Bezerros de aptidão leiteira e de corte mantidos em confinamento são mais acometidos por *C. parvum*, sendo rara a ocorrência em bezerros criados extensivamente (MARTINS-VIEIRA et al., 2009).

O gênero *Cryptosporidium* foi isolado pela primeira vez em bovinos, com oito meses de idade, que apresentou debilidade, diarreia crônica associada a lesões patológicas leves como atrofia das vilosidades intestinais (PANCIERA et al., 1971).

Angus (1987) verificou que um bezerro infectado pode eliminar mais de 1010 oocistos por dia, em períodos de quatro a 14 dias, confirmando seu importante papel na contaminação ambiental.

Quando o *Cryptosporidium* é o único agente determinante de diarreia, a letalidade é baixa, mas em associação com outros agentes infecciosos, de acordo com o grau de imunidade e do estado nutricional do hospedeiro, a taxa de óbitos pode ser consideravelmente alta (CHERMETTE & BOUFASSA-OUZROUT, 1988).

Os resultados dos inquéritos epidemiológicos de criptosporidiose em bovinos são muito variáveis, mas de modo geral apresentam a morbidade elevada. Kirkpatrick (1985), revisando dezenas de trabalhos sobre o assunto, encontrou taxas de ocorrência entre 10 e 85%, com uma média de 25% de bezerros infectados por este coccídeo.

Os bovinos neonatos são mais suscetíveis à infecção clínica, sendo os adultos geralmente assintomáticos ou com manifestações clínicas de pouca gravidade O'Donoghue (1995). Por sua vez, Maldonado-Camargo et al. (1998),

observaram que bezerros com 15 dias de idade possuíam as maiores taxas de infecção.

A patogenia e o quadro clínico da doença podem ser influenciados por vários fatores que incluem entre eles idade, competência imunológica do indivíduo infectado e a associação com outros patógenos (RADOSTITS et al., 2000).

Em bezerros nas primeiras semanas de vida, o *C. parvum*, é o enteropatógeno mais comumente encontrado em episódios de diarreia, enterite e mortalidade (SANFORD & JOSEPHSON, 1982, HEINE et al., 1984, RADOSTITS et al., 2000) de até 30% (OLSON et al., 2004).

O ciclo se inicia com a eliminação de oocistos já esporulados nas fezes de animais infectados (DUBEY et al., 1990). As espécies de *Cryptosporidium* possuem um ciclo de vida monoxeno muito semelhante ao de outros coccídeos da subordem Eimeriorina, composto por seis estágios de desenvolvimento no organismo hospedeiro: excistação, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede do oocisto e esporogonia (XIAO; CAMA, 2006).

A infecção por *Cryptosporidium* pode causar inflamação e atrofia das vilosidades intestinais resultando em perda da superfície de absorção, desequilíbrio no transporte de nutrientes e consequentemente comprometimento na produtividade animal (THOMPSON et al., 2008).

Em relação á caracterização molecular, Thomaz et al. (2007) classificaram nove amostras de oocistos de *Cryptosporidium* provenientes do estado de São Paulo, sendo oito *C. parvum* e uma *C. bovis*, (espécie não zoonótica).

Huber et al. (2007) identificaram a espécie *C. parvum* em bezerros de um a 14 dias de vida em fazendas no estado do Rio de Janeiro. Como também, CARDOSO et al. (2008), observaram uma ocorrência de 4,9% em bovinos até dois meses de idade com *C. parvum* e de 0,1% em vacas com *C. andersoni* em fazenda leiteira no município de Caçapava, São Paulo – Brasil.

Animais adultos e desmamados são acometidos principalmente por *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*, já os bezerros em lactação são infectados por *C. parvum* e considerados como os maiores reservatórios desta espécie, que apresenta alto potencial zoonótico (FAYER et al., 2000; XIAO; FENG, 2008).

Fayer, Santín, Trout, (2008) descreveram a espécie *C. ryanae* n. sp. previamente identificada como *Cryptosporidium* genótipo cervo, sendo semelhante ao *C. bovis* e *C. parvum* mas de menor tamanho, com uma período pré patente de 11 dias e o período patente de 15 em 15 dias, prevalente em bovinos mundialmente. Alguns desses genótipos foram nomeados espécies quando informações suficientes a respeito de sua morfologia, biologia e características genéticas foram esclarecidas (XIAO; FAYER, 2008).

Khan et al. (2010) identificaram pela PCR, a espécie *C. ryanae* em (2,5%) dos bezerros antes do desmame e em (2,77%) após o desmame e *C. andersoni* em 1,38% antes e 2,94% após o desmame, em bezerros de criações leiteiras na Índia. Como também, Maikai, et al. (2011) verificaram pela PCR uma ocorrência de 4,1% de *C. ryanae* e 2,5% de *C. andersoni* e 1,5% com infecção mista. Importante notar que neste caso, houve correlação significativa entre raça, localização do rebanho, manejo e consistência das fezes em bezerros na Nigéria.

De 113 amostras fecais, Murakoshi, et al. (2012) verificaram uma ocorrência de 23 (20%) de amostras positivas, sendo 15 (13%) *C. bovis*, seis (5%) para *C. ryanae* e dois (2%) infecção mista, sugerindo que essas espécies estão distribuídas no Japão, mas com baixa frequência. Venu, et al., (2012) verificaram uma ocorrência de 39 (60,94%) para *C. andersoni* e 18 (28,13%) com *C. ryanae* em 64 amostras submetidas a PCR-RFLP em bezerros de criações leiteiras do Sul da Índia.

Atualmente, são reconhecidas 22 espécies do referido coccídio, das quais duas têm sido encontradas em peixes, uma em anfíbios, duas em répteis, três em aves e 14 em mamíferos e ainda, mais de 40 genótipos adaptados a diversos hospedeiros (MARTINEZ; ÁGUILA; LINARES, 2011; BERILLI et al., 2012).

A ocorrência e a caracterização molecular de criptosporidiose em rebanhos bovinos é descrita em várias regiões geográficas, com prevalências variáveis, descritos na Tabela 1 e 2.

Tabela 1 - Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos bovinos no mundo.

Autor e Ano	País	Técnica de diagnóstico	Nº de positivos / total de animais	Ocorrência (%)
(GARCIA & LIMA, 1993)	Brasil	SFA	85/305	27,87
(GARCIA & LIMA, 1994)	Brasil	SFA	51/262	19,46
(GARBER, et al., 1994)	EUA	RIFI	652/1103	59,10
(EDERLI et al., 2004)	Brasil	ZNM	90/211	43,60
(FEITOSA, et al., 2004)	Brasil	SFA	19/131	14,50
(FAYER et al., 2006)	EUA	PCR	68/571	11,90
(CASTRO-HERMIDA, et al., 2007)	Espanha	RIFI	32/379	8,44
(DEL COCO et al., 2008)	Argentina	ZNM	48/280	17,14
(PAUL et al. 2008)	Índia	PCR	138/457	38,10
(COKLIN, et al., 2009)	Canadá	RIFI	11/183	60,10
(FERREIRA, 2009)	Brasil	ELISA	30/319	9,40
(PLUTZER & KARANIS, 2009)	Hungria	RIFI	32/79	40,50
(FAYER et al., 2010)	EUA	PCR	168/819	20,51
(KHAN et al., 2010)	Índia	ELISA	21/180	11,66
(DIXON et al., 2011)	Canadá	RIFI	29/45	64,44
(FOLLET, et al., 2011)	França	PCR	100/142	70,42
(MUHID et al., 2011)	Malásia	PCR	65/240	27,08
(WANG et al., 2011)	China	SFA	104/1315	7,90
(SAFAVI, et al., 2011)	Iran	ZNM	58/112	51,80
(SILVA – JUNIOR, et al., 2011)	Brasil	ZNM	77/356	21,62
(BUDU-AMOAKO et al., 2012)	Canadá	IFD	123/739	16,64

ELISA: Ensaio de Enzima Imunoabsorvente; FCS: Flutuação em Cloreto de Sódio;
 RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; IFD: Imunofluorescência Direta;
 PCR: Reação em Cadeira da Polimerase; SFA: Sheather Flutuação em Acúcar;
 ZNM: Ziehl-Neelsen Modificado.

Tabela 2 - Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos bovinos no mundo.

Autor e Ano	Estado / País	Técnica de diagnóstico	Marcador genético	Espécies / Ocorrência (%)
(CARNEIRO et al., 1995)	GO – Brasil	SFA + ZNM	NE	<i>C. parvum</i> (12,02)
(PENA, KASAI, GENNARI, 1997)	SP - Brasil	SFA	NE	<i>C. muris</i> (17,3)
(ENEMARK et al., 2002)	Dinamarca	N-PCR	rDNA	<i>C. andersoni</i> (28) <i>C. parvum</i> (16,7)
(FAYER, et al., 2006)	EUA	N-PCR	18S rRNA	<i>C. andersoni</i> (5,1) <i>C. bovis</i> (4,2) <i>C. deer like</i> (1,8) <i>C. parvum</i> (0,7) <i>C. suis</i> (0,2)
(COKLIN, et al., 2007)	Canadá	N-PCR	16S rRNA	<i>C. parvum</i> (21,7) <i>C. bovis</i> (1,4)
(THOMAZ, et al., 2007)	SP - Brasil	N-PCR	18S rRNA	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
(FAYER, et al., 2008)	EUA	N-PCR	18S rDNA – HSP 70	<i>C. ryanae</i>
(KESHAVARZ, et al., 2009)	Iran	N-PCR	18S SSU rRNA	<i>C. parvum</i> (13,6) <i>C. andersoni</i> (3,3) <i>C. bovis</i> (1,47)
(ONDRACKOVÁ, et al., 2009)	República Checa	N-PCR	SSU rRNA GP 60	<i>C. andersoni</i> (4,1) <i>C. bovis</i> (0,2) <i>C. parvum</i> (0,1)
(ALMEIDA, et al., 2010)	SP - Brasil	N-PCR	18S rRNA	<i>C. parvum</i> (45)
(OLIVEIRA, et al., 2010)	SP - Brasil	N-PCR	18S rRNA – GP 60	<i>C. parvum</i> (3,57) <i>C. ryanae</i> (1,02) <i>C. andersoni</i> (0,51) <i>C. bovis</i> (0,51)
(SEVÁ, et al., 2010)	SP - Brasil	N-PCR	SSU rRNA	<i>C. andersoni</i> (3)
(KVAC, et al., 2011)	República Checa	N-PCR	SSU rRNA GP 60	<i>C. parvum</i> (18,26) <i>C. andersoni</i> (2,8) <i>C. bovis</i> (0,4)
(MEIRELES, et al., 2011)	SP – Brasil	N-PCR	18S rRNA – GP 60	<i>C. andersoni</i> (1,02) <i>C. bovis</i> (0,51) <i>C. parvum</i> (3,57) <i>C. ryanae</i> (1,02)
(NG, et al., 2011)	Austrália	N-PCR	18S rRNA	<i>C. bovis</i> (7,69) <i>C. ryanae</i> (4,12) <i>C. parvum</i> (3,84)
(NG, et al., 2012)	Austrália	N-PCR	18S rRNA	<i>C. parvum</i> (43,36) <i>C. bovis</i> (14,79) <i>C. ryanae</i> (7,14)
(SILVERLAS, et al., 2013)	Suécia	N-PCR	18S rRNA	<i>C. parvum</i> (25,31) <i>C. bovis</i> (0,76)

N-PCR: Nested Reação em Cadeira da Polimerase; NE: Nada Existente.

SFA: Sheather Flutuação em Açúcar; GO: Goiás.

ZNM: Ziehl-Neelsen Modificado; SP: São Paulo.

3.1 DIAGNÓSTICO DA CRIPTOSPORIDIOSE

3.1.1 Métodos parasitológicos diretos

Os métodos parasitológicos diretos empregados são: coloração por Kinyoun (Ma e Soave, 1983) Ziehl-Neelsen modificado (Henriksen e Pohlenz, 1981), safranina azul de metileno (Baxby, Blundell e Hart, 1984), técnica de centrífugo-flutuação em solução de Sheather (Current, 1990) coloração negativa de verde-malaquita (ELLIOT, MORGAN e THOMPSON, 1999). Embora úteis esses métodos apresentam baixa sensibilidade e/ou especificidade, principalmente quando existem poucos oocistos na amostra (MORGAN et al., 1998).

Dessa forma, a identificação da espécie, se baseada apenas em critérios morfométricos, pode ser pouco discriminatória (MORGAN et al., 1998). Oocistos de *Cryptosporidium* são muito pequenos (4-8 μm), com uma pequena variação dimensional ou mesmo indistinguíveis entre as diferentes espécies, sem esporocistos e de difícil visualização (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; FALL et al., 2003).

Os métodos tradicionalmente utilizados para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, consistem na detecção direta do parasito por meio de microscopia óptica. No entanto, as características morfológicas para uma correta identificação dessas formas infectantes são insuficientes, sendo que o diagnóstico, baseado apenas nesses métodos não é confiável e relativamente demorado (FALL et al., 2003). Estas podem ser melhor visualizadas pela microscopia óptica de campo claro ou de contraste de fase (XIAO; FENG, 2008). Muniz-Neta, et al. (2010), verificaram que a técnica de Ziel-Neelsen Modificado (ZNM), apresentou melhores resultados do que a técnica de contraste de fase.

3.1.2 Métodos imunológicos

Como métodos imunológicos, oocistos fecais podem ser detectados pela reação de imunofluorescência direta (Bialek et al., 2002); (Jex et al., 2008) e teste imunoenzimático (ELISA) (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000;

JEX et al., 2008; SILVA et al., 2003; KUHNERT-PAUL et al., 2012). Estes métodos apresentam vantagens sobre o diagnóstico parasitológico direto, em relação a sensibilidade e especificidade destas técnicas (ZIMMERMAN; NEEDHAM, 1995; JOHNSTON et al., 2003).

Alguns testes imunoenzimáticos são capazes de detectar a infecção em animais que ainda não estão eliminando oocistos nas fezes (pré-patente) (Smith e Nichols, 2010), outra vantagem é que podem ser empregados de maneira rápida para triagem de um grande número de animais (GARCIA et al., 2003), como limitações tanto das técnicas imunológicas quanto dos métodos parasitológicos diretos, é que não existe a possível de se determinar a espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* envolvidos na infecção.

3.1.3 Métodos moleculares

Dada a limitação na detecção de espécies de *Cryptosporidium* a partir dos métodos diretos e imunológicos, o diagnóstico baseado em técnicas moleculares, como a PCR e suas variantes, seguida de sequenciamento automático de ácidos nucleicos, oferece uma alternativa eficiente para a diferenciação desses organismos (JEX et al., 2008).

Muitos *loci* têm sido utilizados, como o codificador da fração 18S, actina Sulaiman, (Lao e Xiao, 2002), proteína do choque térmico - HSP-70 (Morgan et al., 1998), proteína da parede do oocisto - COWP (Spano et al., 1997) e glicoproteína GP-60 (PENG et al., 2001; PENG et al., 2003). Este último tem demonstrado um elevado grau de polimorfismo entre isolados de espécies de *Cryptosporidium*, com identificação de diversos subgenótipos e subtipos (PLUTZER; KARANIS, 2009).

Técnicas moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade (Jex et al., 2008); (Morgan et al., 1998), no entanto, devido ao elevado custo, quando comparada às outras técnicas de detecção de oocistos, esse método não tem sido rotineiramente utilizado em laboratórios de diagnóstico (MEIRELES, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais e período

As 300 amostras foram colhidas em sete fazendas provenientes do município de Formiga, região Centro-Oeste de Minas Gerais – Brasil durante o mês de julho de 2012 (FIG. 01). Este município apresenta aproximadamente uma área de 1.502 Km² com uma população de 65.064 habitantes, altitude de 820 metros, temperatura média de 21,8°C, índice pluviométrico anual de 1272 mm, uma densidade demográfica de 43,36 (hab/Km²), distante 195 km da capital Belo Horizonte, com um rebanho de bovinos aproximado de 73 mil cabeças em criações em diversos sistemas de criação e diferentes raças e aptidões (leite, carne, mista) (IBGE, 2012).

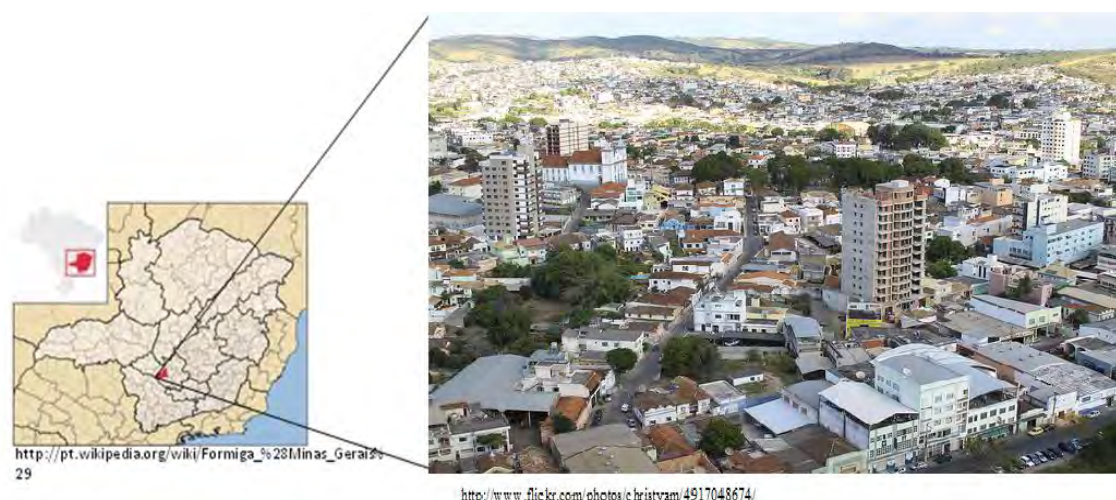


FIGURA 1. Localização da cidade de Formiga – MG.

4.2 Animais utilizados

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPESA - Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda. Protocolo número PP 061/2012. está de acordo com o disposto na Lei Federal nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Lei AROUCA). O referido cumpriu, também, as exigências da Resolução n. 879, de 15/02/2008 do CFMV; Decreto 6.899, de 15/07/2009; Resolução Normativa n.1, de 09/07/2010 do CONCEA; "Princípios Éticos na Experimentação Animal"

Um total de 300 bezerros, de ambos os sexos, com 15 dias a 12 meses de idade foram selecionados aleatoriamente. Estes pertenciam a diferentes

padrões raciais, sendo 100 holandeses, 100 sem raça definida (SRD) e 100 nelores.

Os animais sem raça definida (SRD) (FIG. 2) eram provenientes de criações pequenas com rebanho de 10 a 50 animais, de pecuária familiar, com baixa tecnificação sem assistência médico-veterinário e com utilização de medidas sanitárias precárias, sem vermifugação periódica e vacinação (anti-rábica, anti-clostridioses, entre outros). Os bezerros eram desmamados após 12 meses de idade, quando as vacas cessavam a produção ou entravam em trabalho de parto, o sistema de criação adotado era o semi-intensivo, com baixa suplementação de concentrado proteico e com pastagens diversificadas entre nativas e Braquiarão (*Brachiaria brizantha*). As propriedades foram identificadas pelas letras de A, B, C, D e E, sendo coletados todas as amostras dos bezerros pertencentes as mencionadas localidades.



FIGURA 2. Animais Sem Raça Definida (SRD).

Os animais da raça nelore (FIG. 3) eram criados no sistema extensivo com pasto de Braquiarão (*Brachiaria brizantha*) e *Panicum maximum* cultivar Tanzânia, fontes de água nas vertentes das águas de furnas e desmamados aos oito meses de idade, sendo acompanhados diariamente com os peões, inseridos em um rebanho em torno de 2000 animais em diferentes faixa etárias, com finalidade de cria e recria. A propriedade foi identificada pela letra F, foi coletado proporcionalmente $\frac{1}{4}$ de um total de 400 animais do rebanho desta

fazenda, sendo 100 amostras dos animais que passaram pelo brete e continham fezes.



FIGURA 3. Animais da Raça Nelore.

As bezerras holandesas (FIG. 4) eram de grande propriedade, com uma produção de leite de 7 mil litros diariamente, com adoção de tecnificação, recebendo monitoração de médicos veterinários semanalmente, mineralização, vermifugação e vacinações periódicas, com boa adoção de práticas sanitárias, em criação intensivas, onde os animais eram desmamados aos três meses de idade e divididos por faixa etária em quatro piquetes. Após o período de aleitamento, eram suplementados com concentrado proteico e energético e complementado com silo de milho, pasto de capim tifton (*Cynodon* spp.) e água *ad libitum* de poços semi-artesianos, sendo incluídas para reprodução após os 18 a 24 meses. A propriedade foi identificada pela letra G, sendo coletadas 25 animais de cada lote, entre os quatro lotes. Sendo a propriedade tinha aproximadamente 400 bezerras, totalizando em seu rebanho 1800 animais.



FIGURA 4. Bezerra da Raça Holandesa.

4.3 Colheita e processamento das amostras

Cada amostra fecal com aproximadamente 10g de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais e avaliadas quanto à consistência, sendo classificadas como não diarreicas (sólidas e semissólidas) ou diarreicas (aquosas). Posteriormente, foram armazenadas em sacos plásticos, acondicionadas em caixas de isopor mantidas em refrigeração sendo levadas ao Laboratório de Parasitologia do Centro Universitário de Formiga – UNIFOR-MG, onde foram divididas em duas alíquotas, uma destinada à análise pelo método de verde malaquita, armazenadas em potes coletores universais contendo dicromato de potássio 2,5% e a outra foi congelada “in natura” a -20°C até a execução da técnica de *nested-PCR*.

4.3.1. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* pela coloração negativa de Verde Malaquita.

Para a realização da técnica de coloração negativa de Verde Malaquita, as amostras contendo dicromato de potássio foram filtradas em tamis de plástico descartável contendo uma gaze com oito camadas, sendo o seu conteúdo transferido para tubos de ensaio cônicos de 50 mL, com acréscimo de água com Twin a 1% até 32,5 mL e completado a 40 mL com éter de petróleo PA. Após homogeneização, foi feita a centrifugação a 3000 rpm por 8

minutos, desprezando-se o sobrenadante, sendo adicionados 15 mL da solução de água Twin a 1%, com centrifugação a 2400 rpm por cinco minutos, com mais duas repetições até o sobrenadante apresentar-se límpido. Este foi desprezado e, com uma gota do sedimento (25µL) e uma gota de verde de malaquita a 5% (25µL), foi realizada coloração negativa com verde malaquita (ELLIOT; MORGAN; THOMPSON, 1999). As lâminas foram observadas ao microscópio óptico em aumentos de 400 e 1000 vezes.

4.3.2. Caracterização molecular

A Reação em Cadeira pela Polimerase tipo nested (nested-PCR), seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados, foi realizada em todas as amostras que foram positivas à microscopia. Para tanto, a alíquota de fezes “in natura”, armazenada em -20°C foi descongelada e filtrada em tamis de plástico descartável contendo gaze.

Após filtração o conteúdo foi transferido para tubos de ensaio cônicos e centrifugado a 4000 rpm por cinco minutos para sedimentação fecal, eliminando-se ao término o sobrenadante, o sedimento foi acrescido de água/éter e após homogeneização, foi centrifugado a 3000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, com oocistos, foi submetido ao “kit” de extração de DNA genômico “QIAamp DNA Stool Mini Kit” (Qiagen®), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante, com exceção da incubação à 99° C após diluição dos oocistos em tampão ATL e eluição do DNA em 50 µL. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

4.3.2.1. Reação de Nested-PCR para amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp.

Para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico foi utilizada a técnica de Nested-PCR com os primers 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' e 5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3' para a reação primária, com 1325 pares de base (pb) e 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' e 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' para a reação secundária (826-840 pb). Esta técnica permitiu a amplificação de fragmentos de DNA de todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* conhecidos. Para realização das seguintes condições de reação, foi preparada

uma solução com volume final de 25 μ L contendo: 2,5 μ L de tampão para PCR 10 x, 2,5 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase, 200 μ M de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nM de cada oligonucleotídeo (primer) e 5 μ L de DNA alvo. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94°C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação por 45 segundos a 94°C, 45 segundos de anelamento a 55°C e 60 segundos de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por 7 minutos (XIAO et al., 2000).

4.4 Análise estatística

A análise estatística descritiva foi efetuada por meio do cálculo de porcentagem e estatística inferencial pelo Teste Qui-Quadrado para verificar associação entre os resultados dos métodos de diagnóstico empregados e as variáveis estudadas. O nível de significância adotado foi de 5% e as análises estatísticas foram efetuadas empregando o programa SAS, 1996 (“Statistical Analysis System”). O Teste de McNemar e o coeficiente de concordância Kappa foram utilizados para avaliar a concordância entre as técnicas de coloração negativa com verde malaquita e PCR (BRAILE; GODOY, 1999).

5. RESULTADOS

A ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp foi de 5,3% (16/300) e 4,66% (14/300) utilizando-se as técnicas de contraste negativo de verde malaquita (Figura 5) e Nested - PCR (Figura 6) respectivamente. Utilizando-se o teste Qui – quadrado com nível de significância de 5%, verifica-se que não houve diferença estatística quanto ao padrão racial, sistemas de criação, aleitamento, faixa etária, escore corporal e consistência fecal, comparando os percentuais de infecção por *Cryptosporidium* spp, obtidos pelas duas técnicas supracitadas. Pelo teste de McNemar observou-se associação entre as técnicas estudadas e pelo Kappa houve alta concordância (Kappa = 0,93), sendo este valor significativamente diferente de zero pelo teste z (Tabela 4). Sendo demonstrado nesta pesquisa que houve uma relação entre os métodos de Contraste Negativo e PCR, pois a maioria das amostras positivas na técnica de triagem confirmaram com o teste subsequente.

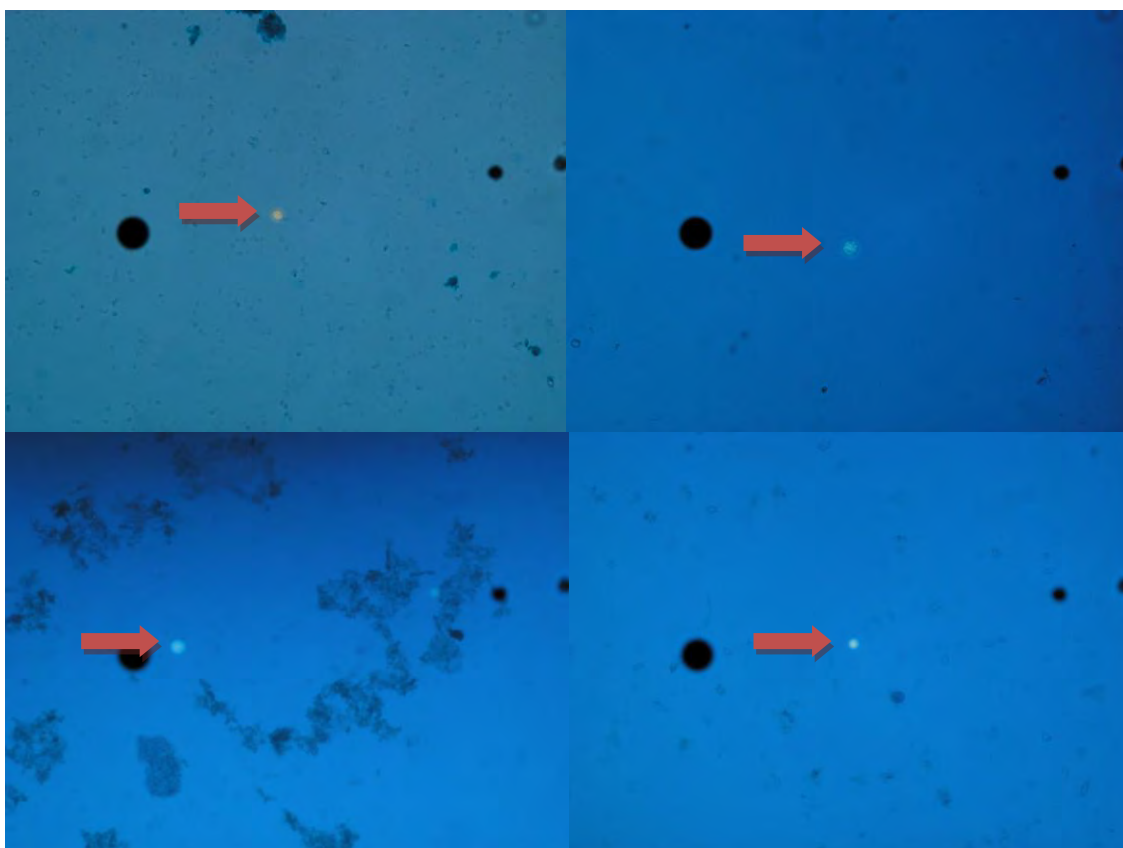


FIGURA 5. Aspecto microscópico de oocistos de *Cryptosporidium* spp em esfregaços fecais de bezerros corados em coloração negativa de verde malaquita (setas).

Nove amostras apresentavam amplificação intensa na eletroforese (Figura 6). Posteriormente foi realizada a triplicata e o encaminhamento do material para realização do sequenciamento. Em seis amostras foi diagnosticado *C. ryanae*, sobretudo em bezerros nas faixas etárias de dois a oito meses de idade, em todos os grupos raciais estudados (SRD, Holandesa e Nelore). Em três amostras diagnosticou-se *C. andersoni*, oriundas apenas nos bezerros (SRD), entre seis e oito meses de idade. As outras cinco amostras positivas não foram amplificadas, sendo os parasitos classificados como *Cryptosporidium* spp (Tabela 5).



FIGURA 6. Amplificação intensa na eletroforese em triplicata para realização do sequenciamento de *Cryptosporidium* spp

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp foram identificados e quantificados, apesar da escassez dos mesmos. Dez amostras positivas apresentavam apenas uma forma evolutiva de *Cryptosporidium* por lâmina (Figura 8).

Das sete propriedades rurais estudadas, cinco apresentaram bovinos positivos para a presença *Cryptosporidium* pela técnica de contraste negativo com verde malaquita, sendo três animais SRD, uma Nelore e a outra em bezerros holandeses (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição de positividade de *Cryptosporidium* spp pela técnica de contraste negativo com verde malaquita, de acordo com as propriedades estudadas.

Propriedades	Grupos raciais	<i>Cryptosporidium</i> spp		Total
		Positivos	Negativos	
A	SRD	1	35	36
B	SRD	1	16	17
C	SRD	3	28	31
D	SRD	0	7	7
E	SRD	0	9	9
F	Nelore	3	97	100
G	Holandês	8	92	100
TOTAL		16	284	300

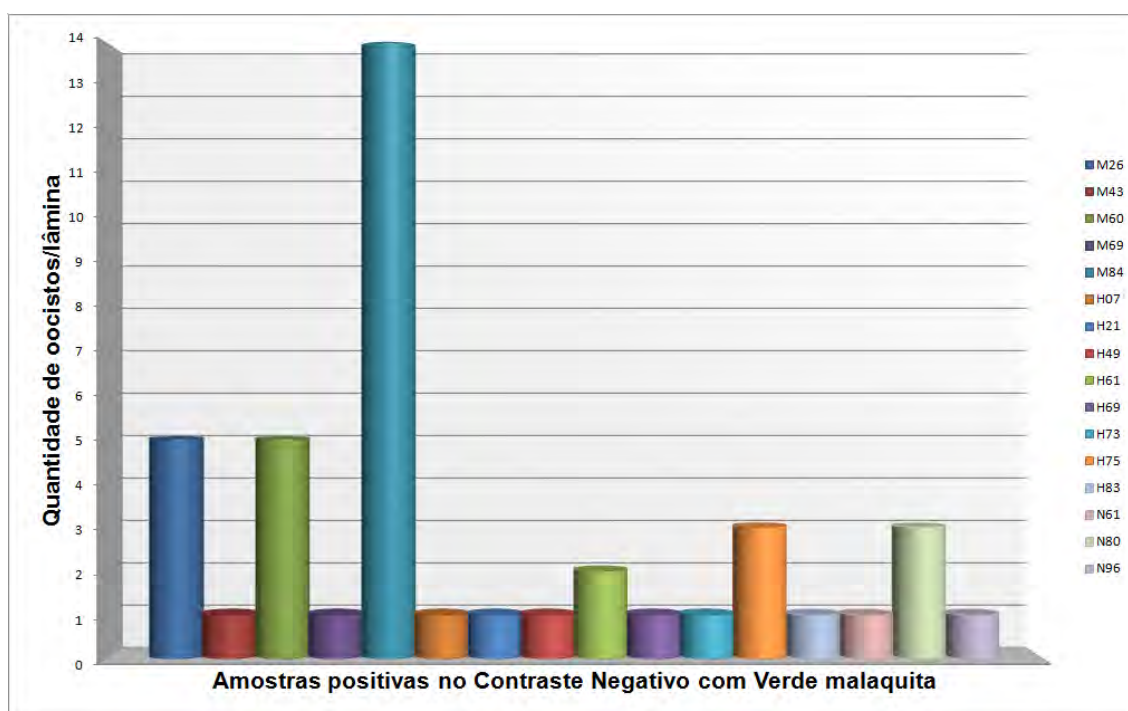


FIGURA 7. Quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp em amostras positivas (técnica de contraste negativo de verde malaquita) oriundas de bovinos mantidos em três sistemas de criação no município de Formiga – Minas Gerais, Brasil.

Tabela 4 – Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp, diagnosticada pela técnica de contraste negativo com verde malaquita e pela Nested PCR de acordo com as variáveis: grupo racial, sexo, idade, escore, aleitamento e consistência fecal.

Variável	Categoria	Nº de bovinos	Técnicas				Valor de p teste χ^2
			CNVM		PCR		
			Positivo	%	Positivo	%	
Grupo racial	SRD	100	5	5,00	5	5,00	0,2852 ⁽¹⁾
	Nelore	100	3	3,00	2	2,00	
	Holandês	100	8	8,00	7	7,00	0,2409 ⁽²⁾
Idade (meses)	0,5 – 2	62	2	3,22	2	3,22	0,4794 ⁽¹⁾
	3 – 4	55	4	7,27	3	5,45	
	5 – 6	64	5	7,81	5	7,81	
	7 – 8	50	3	6,00	3	6,00	
	9 – 10	50	1	2,00	0	0,00	
	11 – 12	19	1	5,26	1	5,26	
Escore Corporal (1 – 5)	2,0	9	0	0,00	0	0,00	0,8978 ⁽¹⁾
	2,5	68	4	5,88	4	5,88	
	3,0	115	6	5,21	5	4,34	
	3,5	55	0	0,00	0	0,00	
	4,0	53	6	11,32	5	9,43	
Aleitamento	Com	160	8	5,00	8	5,00	0,7836 ⁽¹⁾
	Sem	140	8	5,71	6	4,28	0,7698 ⁽²⁾
Consistência	Diarreica	7	1	14,28	1	14,28	0,5516 ⁽¹⁾
	Não diarreica	293	15	5,11	13	4,43	0,4642 ⁽²⁾
Sexo	SRD M	45	1	2,22	1	2,22	0,2038 ⁽¹⁾
	SRD F	55	4	7,27	4	7,27	
	Nelore M	55	0	0,00	0	0,00	
	Nelore F	45	3	6,66	2	4,44	
	Holandês F	100	8	8,00	7	7,00	

(1) Malaquita; (2) PCR; **M**: machos; **F**: Fêmeas

CNVM: Contraste Neg. Verde Malaquita; PCR: Reação em cadeia da polimerase; Nº: Número de animais examinados; $p \geq 0,05$: Não significativo; $p < 0,05$: Significativo estatisticamente

Tabela 5. Distribuição das espécies de *Cryptosporidium* de acordo com a faixa etária dos animais.

Faixa etária (meses)	Nº	Raças	Espécies de <i>Cryptosporidium</i>^a (Nº animais)
0,5 – 2	62	Holandesa	<i>C. ryanae</i> (2)
3 – 4	55	SRD	<i>C. ryanae</i> (1)
		Holandesa	<i>Cryptosporidium</i> spp. (3)
5 – 6	64	Nelore e SRD	<i>C. ryanae</i> (2)
		Holandesa	<i>Cryptosporidium</i> spp. (2)
		SRD	<i>C. andersoni</i> (1)
7 – 8	50	Nelore	<i>C. ryanae</i> (1)
		SRD	<i>C. andersoni</i> (2)
9 – 10	50	Nelore	<i>Cryptosporidium</i> spp. (1)
11 – 12	19	Holandesa	<i>Cryptosporidium</i> spp. (1)
Total	300		<i>C. ryanae</i> (6)
			<i>Cryptosporidium</i> spp. (5)
			<i>C. andersoni</i> (3)

a – A identificação das espécies foi realizada apenas em amostras que apresentaram amplificação do DNA.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo utilizando-se o método de coloração negativa verde malaquita, foram inferiores aos registrados por Ederli et al. (2004) que observaram 42,65% de bezerros positivos para *Cryptosporidium* spp em 211 amostras de fezes colhidas de bovinos da microrregião de Campos dos Goytacazes, norte do estado do Rio de Janeiro. Del Coco, et al. (2008) diagnosticaram Criptosporidiose em 17,14% dos 57,1% dos bovinos portadores de diarreia. Todos os bezerros infectados tinham até 14 dias de vida, verificaram ainda, que os animais que apresentaram muco nas fezes eram os que eliminavam maior quantidade de oocistos, comprovaram, mais uma vez, a importância da Criptosporidiose como causa de diarreia em neonatos, sobretudo com a presença de muco, constituindo assim, uma importante fonte de contaminação da água e do solo na Argentina.

Safavi et al. (2011) encontraram uma positividade em bezerros de 51,8%, sendo que 21,4%, estavam diarreicos e 78,6% sem diarreia. Os maiores percentuais de infecção foram diagnosticados em bezerros com oito a 14 dias de idade, seguindo nos bezerros mais jovens de um a sete dias de vida, revelando assim que o maior risco de infecção ocorre na segunda semana de vida e que o pico de excreção de oocistos em bezerros com diarreia foi seis vezes maior do que em animais não diarreicos.

Silva-Junior et al. (2011) diagnosticaram uma positividade para *Cryptosporidium* spp de 21,62% em bezerros de sete a 21 dias de idade, com grande quantidade de eliminação de oocistos. Os principais fatores de riscos foram: permanência na cama por mais de 12 horas após o nascimento, fornecimento de colostro após as sete horas de vida, primeiro fornecimento de água e concentrado entre 1 a 7 dias de idade, manutenção de instalações coletivas próximas aos currais e com piso composto por pasto.

Garcia e Lima (1993) examinando 305 amostras fecais de bezerros diagnosticaram 85 positivas para criptosporidiose, sendo 61 animais com diarreia e 24 não diarreicos. Dos 220 animais negativos, 133 apresentavam diarreia e 87 sem diarreia. Demonstraram que o *Cryptosporidium* spp é frequente em bezerros até 60 dias de idade e está amplamente distribuído nas propriedades de bovinos leiteiros de Minas Gerais, além de verificarem que a

presença de oocistos pode ocorrer em animais sem diarreia. Garcia e Lima (1994) diagnosticaram 19,46% de bezerros positivos para *Cryptosporidium* spp, verificaram ainda, que este coccídio é comum em propriedades leiteiras do município de Pará de Minas – MG; em bezerros até 60 dias de idade, distribuídos em diferentes faixas etárias.

Não foi possível correlacionar significativamente a frequência de oocistos em bezerros lactentes com a presença de diarreia, nem tão pouco com as práticas de manejo como cura de umbigo, ingestão de colostro, tempo de permanência do bezerro junto com sua mãe e sistemas de criação citados. Todos os autores anteriormente citados utilizaram para diagnóstico a técnica Ziehl-Neelsen modificado. Tal fato impossibilita comparações com os resultados obtidos no presente estudo.

Pelo Nested - PCR, objetivando-se a caracterização molecular, observou-se uma quantidade menor de amostras positivas, comparado ao teste de triagem citado anteriormente. Estes resultados corroboram com os obtidos por KHAN, et al. (2010); FENG, et al. (2012); MURAKOSHI, et al. (2012). Por outro lado, tais resultados diferiram daqueles registrados por FAYER, et al. (2006); PAUL, et al. (2008); FAYER, et al. (2010); FOLLET, et al. (2011); MUHID, et al. (2011). Normalmente observa-se um número inferior de animais positivos, principalmente quando os mesmos apresentam uma maior faixa etária (FAYER et al., 2010).

Dos vários fatores de risco analisados, nenhum deles apresentou correlação com a positividade para *Cryptosporidium* spp. Na análise da variável raça, o sistema de criação foi avaliado, uma vez que as raças tinham manejo estabelecido em criações extensivas para os nelores, criação semi-intensiva para os “Sem Raça Definida” e, intensiva para as bezerras holandesas. Esta ausência de correlação com a criptosporidiose contrasta com os resultados obtidos por Almeida et al. (2010); Khan et al. (2010) e Almeida, Oliveira e Texeira (2008) verificaram que o sistema de criação intensivo e a raça são fatores preponderantes para maior ocorrência desta coccidiose.

No aleitamento foi verificado que não houve diferença entre desmamados e aleitados, não havendo relação com a positividade. A idade dos animais segundo Brook et al. (2008) e Cardoso et al. (2008) foi o principal fator de risco, ocorrendo a enfermidade principalmente em animais mais novos,

associado a consistência das fezes e a profundidade da cama para os bezerros. No presente estudo nenhuma correlação foi detectada entre manejo e idade dos bezerros. Possivelmente, fatores de riscos (água, idade, localização, raças, idade, manejo e nutrição) estejam associados a ocorrência desta parasitose em determinadas propriedades com altos níveis de contaminação ambiental.

Dentre os animais positivos apenas um apresentava fezes com diarreia, os demais apresentavam fezes não diarreicas, sugerindo que a positividade para *Cryptosporidium* spp, não teve correlação com a consistência das fezes e que estes bezerros são portadores e potenciais transmissores desta enfermidade. Estes resultados vem ao encontro dos achados de Ederli et al. (2004) que diagnosticaram diarreia em (8,06%) dos animais e dentre eles apenas 11,76% apresentavam positivos para *Cryptosporidium* spp, ou seja, 88,24% das amostras eram negativas. No entanto, 46,4% dos bezerros que apresentavam fezes normais estavam positivos e 53,6% estavam negativos, bezerros assintomáticos, porém positivos para criptosporidiose, mantinham a contaminação ambiental e, conseqüentemente, transmitiam a infecção para animais sensíveis, principalmente os neonatos.

No estudo realizado por Feitosa et al. (2004) verificou-se que animais positivos da raça holandesa apresentavam fezes normais (69,8% e 73,7% pelos testes de ELISA e Sheather, respectivamente), pertencentes a região de Araçatuba, estado de São Paulo. Castro-Hermida et al. (2007) detectaram em bovinos de 3 a 12 anos de idade, uma ocorrência de 8,4% de *Cryptosporidium* spp e verificaram que bovinos saudáveis, nesta faixa etária, são possíveis fontes de contaminação.

Cardoso et al. (2008) observaram em bezerros de um dia a 12 meses de idade um total de 849 animais examinados, uma ocorrência de 0,1% para *C. andersoni* e 0,6% para *C. parvum*. Observaram, ainda, que todos os bovinos positivos estavam assintomáticos, pertenciam ao município de Caçapava, estado de São Paulo.

Na maioria das vezes a ausência de sintomas propicia a persistência deste protozoário no ambiente, como foi verificado no presente estudo o registro de baixos níveis de eliminação de oocistos no momento da colheita.

As espécies *C. ryanae* e *C. andersoni* foram identificadas em diferentes faixas etárias, a primeira espécie encontrada em bezerros com dois a oito meses de idade, sendo a segunda, diagnosticada seis e oito meses de idade, fato inédito na literatura consultada. *C. ryanae* é citada na literatura em bezerros de uma semana até cinco meses de vida (Fayer et al., 2008), tais bovinos excretavam uma pequena quantidade de oocistos por grama de fezes.

Meireles et al. (2011) realizaram um estudo em bezerros leiteiros no Noroeste do estado de São Paulo, identificando diversas espécies de *Cryptosporidium*: *C. ryanae*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. parvum* em animais com até 30 dias de vida. Ng et al. (2011) verificaram a presença de *C. ryanae* em bezerros de até quatro meses de idade, em cinco fazendas na Austrália (raça Angus). Em outro estudo, (Ng et al., 2012) detectaram 9,8% de *C. ryanae* em bezerros com idade inferior a dois meses. Por outro lado, Ferreira (2009) verificou positividade (*C. ryanae*) apenas em animais acima de 14 semanas.

Em contraposição, no presente estudo, *C. andersoni* foi encontrado apenas em bezerros de seis a oito meses, todos Sem Raça Definida. Resultados semelhante foram descritos por Enermark et al. (2002) que diagnosticaram o *C. andersoni* em animais com idade inferior a dois meses até dois anos de idade. No entanto, a maioria dos autores Kvac et al. (2011); Meireles et al. (2011); Sevá et al. (2010); Keshavarz et al. (2009); Ondraclová et al. (2009) e Fayer et al. (2006); relatam a presença de *C. andersoni* em bezerros com idade variando de uma semana à cinco meses.

Apesar do pequeno número de amostras positivas, notou-se que o *Cryptosporidium* spp estar presente em propriedades de diferentes tamanhos, grupos raciais e sistemas de criação diversificados na região Centro Oeste de Formiga – MG. Resultados estes, semelhantes aos encontrados por Fayer et al. (2006) que verificaram a presença de *Cryptosporidium* em 13 de 14 fazendas estudadas, como também, relatam que a colheita de uma única amostra pode subestimar a infecção por esse protozoário, além de inferiram que quanto mais velhos forem os animais menor será a ocorrência e a diversificação de espécies.

Pela visualização de oocistos em lâminas, verificou-se uma baixa quantidade de parasitas. Tal achado foi, também, detectados por (IGARASHI et al., 2002) que diagnosticaram em média, cinco oocistos de *Cryptosporidium*

spp por lâmina em bovinos de corte. Semelhantemente, Feitosa et al. (2008) utilizando a técnica de Sheather Flutuação em Açúcar e contagem em câmara de Neubauer, verificaram uma pequena eliminação de oocistos do referido protozoário em bezerros acima de 15 dias de idade.

De acordo com Meireles (2010) e Morgan et al. (1998) a visualização de oocistos por microscopia é importantíssima para o diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium*, sendo preferencialmente empregada devido ao alto custo das técnicas moleculares. Tais técnicas moleculares devem ser executadas, mediante a eliminação de pequena quantidade de oocistos nas fezes ou, ainda, quando o diagnóstico coprológico for duvidoso.

7. CONCLUSÕES

Os bezerros do município de Formiga, região Centroeste de Minas Gerais, apresentaram baixa ocorrência e baixo nível de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp nas fezes.

Nenhuma correlação foi verificada entre positividade e as variáveis estudadas.

Pela caracterização molecular (Nested – PCR) foram diagnosticadas as espécies *C. andersoni* e *C. ryanae*, presentes em faixas etárias não relatadas na literatura.

As duas espécies de *Cryptosporidium* supracitadas são descritas, pela primeira vez, parasitando bovinos no estado de Minas Gerais, Brasil.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, M. S.; TEMPLETON, T. J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J. E.; ZHU, G. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, New York, v. 304, n. 5669, p. 441-445, 2004.

AL BRAIKEN, F. A.; AMIN, A.; BEECHING, N. J.; HOMMEL, M.; HART, C. A. Detection of *Cryptosporidium* amongst diarrhoeic and asymptomatic children in Jeddah, Saudi Arabia. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Leeds, v. 97, n. 5, p.505–510, 2003.

ALMEIDA, A. J.; OLIVEIRA, F. C. R.; TEXEIRA, C. S. Risco relativo da infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* em bezerros bovinos no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, supl. 1, p. 243-248 2008.

ALMEIDA, A. J.; OLIVEIRA, F. C. R.; FLORES, V. M. Q.; LOPES, C. W. G. Risk factors associated with the occurrence of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p. 1325-1330, 2010.

ANGUS, K. W. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. **In Practice**, Houston, v. 9, p. 47-49, 1987.

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, Shannon, v. 198, p. 229-238, 2004.

BAJER, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. **Parasitology Research**, Secaucus, v. 104, n. 1, p. 1–17, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-008-1179-x>>.

BAKER, S. J. S.; KAMALESH, M. G. V.; EARMONTH, J.; FRENCH, N. A tale of two parasites: the comparative epidemiology of cryptosporidiosis and giardiasis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 137, n. 11, p. 1-10, 2009.

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

BERN, C.; MARTINES, J.; ZOYSA, I.; GLASS, R. I. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 70, n. 6, p. 705-714, 1992.

BERRILLI, F.; D'ALFONSO, R.; GIANGASPEROD, A.; MARANGI, M.; BRANDONISIO, O.; KABORÉ, Y.; GLÉ, C.; CIANFANELLI, C.; LAURO, R.; DI CAVE, D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: Occurrence and evidence for environmental contamination. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 106, n. 3, p. 191-195, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.12.005>>.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 43, n. 4, p. 283-288, 2002.

BLANCO, M. A.; IBORRA, A.; VARGAS, A.; NSIE, E.; MBÁ, L.; FUENTES, I. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Equatorial Guinea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 103, n. 12, p. 1282-1284, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.02.016>>.

BRAILE, D. M.; GODOY, M. F. **Cálculos estatísticos for Windows V.1.8**. Rio Preto: Braile Biomédica, 1999. Software.

BROOK, E.; HART, C. A.; FRENCH, N.; CHRISTLEY, R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 46–52, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.003>>.

BHAT, S. A.; JUYAL, P. D.; SINGLA, L. D. Prevalence of cryptosporidiosis in neonatal buffalo calves in Ludhiana District of Punjab. **India Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 7, n. 6, p. 512- 520, 2012.

BUDU-AMOAKO, E.; GREENWOOD, S. J.; DIXON, B. R.; BARKEMA, H. W.; MCCLURE, J. T. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* on beef farms and water sources within the vicinity of the farms on Prince Edward Island, Canada. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 184, n. 1, p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.027>>.

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

CARNEIRO, J. R.; RODRIGUES, N.; LIMA, J. D.; EVAGELISTA, P. L. Prevalência de *Cryptosporidium parvum* em bezerros procedentes da microrregião de Goiânia-GO. **Revista Patologia Tropical** Goiânia, v. 24, n. 2, p. 255-267, 1995.

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

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

COKLIN T.; FARBER J. M.; PARRINGTON, L.; DIXON B. R. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 4, p. 297–305. 2007.

COKLIN T.; UEHLINGER F.D.; FARBER J. M.; BARKEMA H. W.; O'HANDLEY R. M.; DIXON B. R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 3-4, p. 323-236, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.096>>.

CORSO, P. S.; KRAMER, M. H.; BLAIR, K. A.; ADDISS, D. G.; DAVIS, J. P.; HADDIX, A. C. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 4, p. 426–431, 2003.

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

DEL COCO, V. F. D.; CÓRDOBA, M. A.; BASUALDO, J. A. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 158, n. 1-2, p. 31-35, 2008.

DILLINGHAMAA, R. A.; LIMAB, A. A.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, Isses les Moulineaux, v. 4, n. 10, p. 1059-1066, 2002.

DIXON, B.; PARRINGTON, L.; COOK, A.; PINTAR, K.; POLLARI, F.; KELTON D.; FARBER, J. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175; n. 1-2, p. 20-26, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.032>>.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Ed.). **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 95-103.

EDERLI, B.; CARVALHO, C. B.; SALES, L. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 45-48, 2004.

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 45, n. 3, p. 139-142, 1999.

ENEMARK, H. L.; AHRENS, P.; LOWERY, C. J.; THAMSBORG, S. M.; ENEMARK, J. M. D.; BILLE-HANSEN, V.; LIND, P. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterization. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107, n. 1-2, p. 37-49, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00083-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00083-3)>.

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

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experiment Parasitology**, Cambridge, v. 124, n. 1, p. 90-97, 2010.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, London, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00135-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00135-1)>.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 156, p. 191–198. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.024>>.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; DARGATZ, D. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 3–4, p. 187–192, 2010.

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

FEITOSA, F. L. F.; SHIMAMURA, G. M.; ROBERTO, T.; MEIRELES, M. V.; NUNES, N. M.; CIARLINI, P. C.; BORGES, A. S. Prevalência da criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 189-193, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n1/a29v34n1.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2012.

FEITOSA, F. L. F.; SHIMAMURA, G. M.; ROBERTO, T.; MENDES, L.C.N.; PEIRÓ, J.R.; FÉRES, F.C.; BOVINO, F.; PERRI, S.H.V.; MEIRELES, M. V. **Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarréia em bezerros**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 28, n.10, p. 452- 456, 2008.

FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; SOUSA, M. I. L.; ATHAYDE, A. C. R. **Frequência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros da mesorregião do sertão paraibano.** Disponível em: < www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/894.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2012.

FENG, Y.; KARNA, S. R.; DEAREN, T. K.; SINGH, D. K.; ADHIKARI, L. N.; SHRESTHA, A.; XIAO, L. Common occurrence of a unique *Cryptosporidium ryanae* variant in zebu cattle and water buffaloes in the buffer zone of the Chitwan National Park, Nepal. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 185, n. 2-4, p. 309–314, 2012.

FERREIRA, M. G. **Prevalência dos principais enteropatógenos em bezerras da fase de aleitamento em explorações leiteiras semi-intensivas de duas bacias leiteiras do estado de minas gerais.** 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FOLLET, J.; GUYOT, K.; LERUSTE, H.; FOLLET-DUMOULIN, A.; HAMMOUMA-GHELBOUN, O.; CERTAD, G.; DEI-CAS, E.; HALAMA, P. *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. **Veterinary Research**, London, v. 42, p. 116, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-42-116>>.

GARBER, L. P.; SALMAN, M. D.; HURD, H. S.; KEEFE, T.; SCHLATER, J. L. Potential risk factor for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. **Journal Animal Veterinary Medicine Association**, Chicago, v. 205, n.1, p. 86-91, 1994.

GARCIA, A. M.; LIMA, J. D. Frequência do *Cryptosporidium* em bezerros lactentes de rebanhos leiteiros de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 2, p. 193-198, 1993.

GARCIA, A. M.; LIMA, J. D. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (M.G.) e sua relação com práticas de manejo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 23-28, 1994.

GARCIA, L. S.; SHIMIZU, R. Y.; NOVAK, S.; CARROLL, M.; CHAN, F. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 1, p. 209–212, 2003.

HEINE, J.; POHLENZ, J. F. L.; MOON, H. W.; WOODE, G. N. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 150, n. 5, p. 768-775, 1984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/150.5.768>>.

HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl–Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Denmark, v. 22, n. 3-4, p. 594–596, 1981.

HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T. C. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; BELLO, A. R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 65-74, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**: 2011. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

IGARASHI, M.; KAWASAKI, P. M.; TAMEKUNI, K.; VIDOTTO, O. Criptosporidiose em bovinos corte da região de Londrina, norte do Paraná. XI In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., 2012, Maringá – PR. Disponível em: <www.ppg.uem.br/Docs/pes/eaic/XI_EAIC/.../11-0667-0.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2012.

JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium*: biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 4, p. 304-317, 2008.

JOHNSTON, S. P.; BALLARD, M. M.; BEACH, M. J.; CAUSER, L.; WILKINS, P. P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 623-626, 2003.

KESHAVARZ, A.; HAGHIGHI, A.; ATHARI, A.; KAZEMI, B.; ABADI, A.; MOJARAD, E.N. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 3-4, p. 316–318, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.008>>.

KHAN, S. M.; DEBNATH, C.; PRAMANIK, A. K.; XIAO, L.; NOZAKI, T.; GANGULY, S. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 171, n. 1-2, p. 41–47, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.008>>.

KIRKPATRICK, C.E. *Cryptosporidium* infection as cause of calf diarrhea. *Vet Clin North Am: Food Animal Practice*, Philadelphia, v. 1, n.3, p. 515-528, 1985.

KUHNERT-PAUL, Y.; BANGOURA, B.; DITTMAR, K.; DAUGSCHIES, A.; SCHMÄSCHKE, R. Cryptosporidiosis: comparison of three diagnostic methods and effects of storage temperature on detectability of cryptosporidia in cattle faeces. **Parasitology Research**, Secaucus, v. 111, n. 1, p. 165-171, 2012.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2813-6>>.

KVAC, M.; HROMADOVA, N.; KVETONOVA, D.; ROST, M.; SAK, B. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: Absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 177, n. 3-4, p. 378–382. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.048>>.

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

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 147, n. 5, p. 824–828, 1983.

MAIKAI, B. V.; UMOH, J. U.; KWAGA, J. K. P.; LAWAL, I. A.; MAIKAI, V. A. CAMA, V.; Xiao, L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 3-4, p. 241–245, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010>>.

MALDONADO-CAMARGO S.; ATWILL E. R.; SALTIJERAL-OAXACA, J. A.; HERRERA-ALONSO, L. C. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. in Holstein-Friesian dairy calves in central Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 36, p. 95-107, 1998.

MARTÍNEZ, L. N.; DEL AGUILA, C.; LLINARES, F. J. B. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enferm Infecc. Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 29, n. 2, p. 135–143, 2011.

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

MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. *Revista Brasileira de Parasitologia*, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 197-204, 2010.

MEIRELES, M. V.; OLIVEIRA, F. P.; TEIXEIRA, W. F. P.; COELHO, W. M. D.; MENDES, L. C. N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. *Parasitology Research*, Secaucus, v. 109, p. 949–951, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2336-1>>.

MELONI, B. P.; THOMPSON, R. C. A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 82, n. 5, p. 757-762, 1996.

MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 36, n. 4, p. 995–998, 1998.

MUHID, A.; ROBERTSON, I. N. G.; J.; RYAN, U. Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia. *Experimental Parasitology*, Maryland Heights, v. 127, n. 2, p. 534–538, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.015>>.

MUNIZ NETA, E. S.; SAMPAIO, D. C.; GALVÃO, G. S.; MUNHOZ, A. D. 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 Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 201-204, 2010.

MURAKOSHI, F.; XIAO, L.; MATSUBARA, R.; SATO, R.; KATO, Y.; SASAKI, T.; FUKUDA, Y.; TADA, C.; NAKAI, Y. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in grazing beef cattle in Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, n. 1-2, p. 123-128, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.011>>.

NG, J.; YANG, R.; MCCARTHY, S.; GORDON, C.; HIJJAWI, N.; Ryan, U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 176, n. 2-3, p. 145 –150, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.056>>.

NG, J. S. Y.; EASTWOOD, K.; WALKER, B.; DURRHEIM, D. N.; MASSEY, P. D.; PORIGNEAUX, P.; KEMP, R.; MCKINNON, B.; LAURIE, K.; MILLER, D.; BRAMLEY, E.; RYAN, U. Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in northern New South Wales. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 130, n. 4, p. 437–441, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.014>>.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Internacional Journal for Parasitology**, London, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

O'HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Maryland Heights, v. 22, n. 3, p. 623-643, 2006.

OLIVEIRA, F. P. **Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp em bezerros leiteiros da região noroeste do estado de São Paulo.** 2010. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2004.

ONDRACKOVÁ, Z. O.; KVAC, M.; SAK, B.; KVETONOVA, D.; ROST, M. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 141-144, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.035>>.

PANCIERA, R. J.; THOMASSEN, R. W.; GARNER, F. M. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, Amsterdam, v. 8, p. 479-484, 1971. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/0300985871008005-00610>>.

PAUL, S.; CHANDRA, D.; RAY, D. D.; TEWARI, A. K.; RAO, J. R.; BANERJEE P. S.; BAIDYA, S.; RAINA, O. K. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* isolates in India. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 1-2, p. 143-146, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.044>>.

PENA, H. F. J.; KASAI, N.; GENNARI, S. M. *Cryptosporidium muris* in dairy cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 73, n. 3-4, p. 353-355, 1997.

PENG, M. M.; MATOS, O.; GATEI, W.; DAS, P.; STANTIC-PAVLINIC, M.; BERN, C.; SULAIMAN, I. M.; GLABERMAN, S.; LAL, A. A.; XIAO, L. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Hoboken, v. 48, suppl., p. 28-31, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00442.x>>.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 3-4, p. 187-199, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.003>>.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças causadas pelos protozoários. In:_____. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 25, p. 1156-1194.

ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhoea. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v 14, n. 11, p.1800–1802, 2008.

SAFAVI, E. A.; MOHAMMADI, G. R.; NAGHIBI, A.; RAD, M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection in some dairy herds of Mashhad (Iran) and its association with diarrhea in newborn calves. **Comparative Clinical Pathology**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 103-107, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00580-010-0956-y>>.

SANFORD, S. A.; JOSEPHSON, G. K. A. Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves protozoal disease. **Canada Veterinary Journal**, Ottawa, v. 23, n. 12, p. 243-347, 1982.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to two years of age. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, p. 15–23, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.018>>.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT. **User's Guide**, version 6.11. v. 2, Cary, 1996. p. 842.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 5 p. 203-208, 2006.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 4, p. 249-253, 2010.

SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1097-1099, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000800022>>.

SILVA-JÚNIOR, F. A.; CARVALHO, A. H. O.; ROCHA, C. M. B. M.; GUIMARÃES, A. M. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 8, p. 690-696, 2011.

SILVERLAS, C.; BOSAEUS-REINECK, H.; NÄSLUND, K.; BJÖRKMAN, C. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves. **International Journal for Parasitology**, London, v. 43, n. 2, p. 155-161, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.009>>.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; MCLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D. P.; CRISANTI, A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiology Letter**, Chichester, v. 150, p. 209–217, 1997.

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

SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 2, p. 388-394, 2002.

THOMAZ, A.; MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 4, p. 291–296, 2007.

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

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

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, New York, v. 23, n. 3, p. 487–511, 1910.

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

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, Issy les Molineaux, v. 4, n. 10, p. 1047–1058, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01629-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01629-5)>.

VENU, R.; LATHA, B. R.; BASITH, S. A.; RAJ, G. D.; SREEKUMAR, S.; RAMAN, M. Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Southern states of India. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 188, n. 1-2, p. 19-24, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.025>>.

WANG, R.; WANG, H.; SUN, Y.; ZHANG, L.; JIAN, F.; QI, M.; NING, C. E.; XIAO, L. Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 3, p. 1077–1082, 2011.

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

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis In: ORTEGA, Y. R. **Foodborne parasites**. New York: Springer, 2006. p. 108.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology, London**, v. 38, p. 1239-1255, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.006>>.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 309-323, 2008.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 72–97, 2004.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A. A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5492-5498, 2000.

ZIMMERMAN, S. K. I.; NEEDHAM, C. A. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 7, p. 1942–1943, 1995.