

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE *Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS

(*Comparison between diagnostic methods of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples from cattle*)

Bruna BACCEGA^{1*}; Pedro de Souza QUEVEDO²; Juliana Montelli FENALTI²; Cibele Veleda dos SANTOS¹; Nara Amélia da Rosa FARIAS¹; Elisa Simone Viegas SALLIS¹

¹Dpto de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, S/N, Capão do Leão, RS. CEP: 96.160-000; ²Instituto de Estudos do Trópico Úmido da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará. *E-mail: brubaccega@hotmail.com

RESUMO

Criptosporidiose é uma doença entérica com manifestações clínicas variadas e eventual mortalidade, principalmente em animais jovens, causando prejuízos ao desenvolvimento. Este estudo objetivou comparar técnicas de coloração para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros leiteiros, provenientes dos 22 municípios da região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Amostras fecais foram colhidas diretamente do reto de 359 bezerros de diferentes raças, machos e fêmeas, com até doze meses de idade. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados por meio dos métodos colorimétricos de Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen e visualizados sob microscopia ótica e por fluorescência com coloração de Auramina. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados em 6,69% (24/359) das amostras analisadas. A partir destes resultados pode-se inferir que os quatro métodos colorimétricos, foram eficazes na detecção de *Cryptosporidium* spp., sendo capaz de revelar este parasito mesmo em amostras com reduzido número de oocistos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos para o diagnóstico, apesar do método de fluorescência com coloração de Auramina ter apresentado o melhor resultado em comparação com as técnicas colorimétricas utilizadas neste estudo.

Palavras-Chave: Criptosporidiose, diagnóstico parasitológico, protozoários, coloração de auramina.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is an enteric disease with varied clinical manifestations and eventual mortality, mainly in young animals, causing impairment in development. This study aimed to compare staining techniques for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calf feces from 22 municipalities of the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. Fecal samples were collected directly from the rectum of 359 calves of different breeds, male and female, up to twelve months old. *Cryptosporidium* spp. oocysts were observed using the colorimetric methods of Kinyoun, Safranina and Ziehl-Neelsen and were visualized under optical microscopy and by fluorescence with auramine stain. *Cryptosporidium* spp. oocysts were observed in 6.69% (24/359) of the analyzed samples. From these results it can be inferred that the four colorimetric methods were effective in the detection of *Cryptosporidium* spp., being able to reveal this parasite even in samples

*Endereço para correspondência:
brubaccega@hotmail.com

with a reduced number of oocysts. There was no statistically significant difference between the methods for diagnosis, even though, the Auramine staining fluorescence method presented the best result in comparison with the colorimetric techniques used in this study.

Key words: Cryptosporidiosis, parasitological diagnosis, protozoa, auramina coloration.

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium spp. são reconhecidos causadores da condição denominada criptosporidiose, classificada como doença emergente, responsável por causar diarreia em vertebrados, incluindo bovinos e o homem (FAYER, 2008; YODER *et al.*, 2012; ROBERTSON e CHALMERS, 2013).

A Criptosporidiose bovina foi relatada pela primeira vez no ano de 1971, em bezerros com quadro de diarreia crônica (PANCIERA, 1971). Desde então, a doença tem sido descrita em bovinos em todo o mundo, sendo diagnosticada tanto em rebanhos de bovinos de corte, como de aptidão leiteira (MEIRELES *et al.*, 2011; NAZELHOSSEINI-MOJARAD *et al.*, 2011).

Em bovinos, os bezerros neonatos são mais susceptíveis à infecção com manifestação clínica, cursando com diarreia intensa, elevada morbidade e até a morte (CHAKO *et al.*, 2010). Os animais adultos podem ou não apresentar sinais clínicos, e são considerados fontes de infecção para o ambiente e para o rebanho, sendo geralmente portadores assintomáticos (KHAN *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2011).

Apesar da especificidade de hospedeiro, *Cryptosporidium* spp. podem infectar humanos com sistema imunológico imaturo ou imunossuprimidos (RIBEIRO e KATAGIRI, 2015). Os sinais clínicos e a gravidade da infecção geralmente estão associados à quantidade de formas infectantes ingeridas e ao status imunológico do hospedeiro (BROGLIA *et al.*, 2008; XIAO, 2010).

Portadores assintomáticos de criptosporidiose merecem atenção devido a essa doença ser uma zoonose e haver a possibilidade de indivíduos atuarem como fontes de contaminação e dispersão do agente no ambiente, favorecendo sua transmissão (CHAKO *et al.*, 2010). A infecção dos hospedeiros ocorre pela ingestão de oocistos, que são eliminados juntamente com as fezes de portadores, na forma infectante. Os oocistos são resistentes às condições ambientais podendo permanecer viáveis por longos períodos (3 meses 25-30 °C) (GRACZYK *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2008). A transmissão geralmente está associada ao contato com animais e/ou por meio da contaminação alimentar ou hídrica (CHALMERS *et al.*, 2011; RYAN *et al.*, 2014).

Vários métodos foram desenvolvidos para o diagnóstico de criptosporidiose, sendo os mais tradicionalmente utilizados na detecção direta do parasito por observação microscópica (FALL *et al.*, 2003). Entretanto, os profissionais da área de diagnóstico laboratorial convivem com as divergências entre a eficiência dos diferentes métodos coparassitológicos para a detecção de oocistos *Cryptosporidium* spp. (FEITOSA *et al.*, 2004).

As técnicas colorimétricas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. comumente empregadas são Kinyoun e Ziehl-Neelsen, as quais podem ser feitas após a

*Endereço para correspondência:
brubaccega@hotmail.com

fixação de esfregaços de fezes frescas ou preservadas (DE CARLI,1994). Além dessas, a coloração empregando Safranina de azul de metileno é considerada rápida, simples e apresenta um bom contraste para a detecção de oocistos (BAXBY *et al.*,1984). Entretanto, Rodrigues *et al.* (2016) ao utilizarem os métodos de Safranina e Ziehl-Neelsen, na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de 152 bezerros, encontraram maior positividade pela técnica de Ziehl-Neelsen. No estudo de Mirhashemi *et al.* (2015) provaram que Kinyoun pode ser uma ferramenta confiável para amostras de fezes.

No entanto, essas técnicas podem apresentar baixa sensibilidade e resultados falso-positivos. A fluorescência por coloração de Auramina tem mostrado maior sensibilidade e especificidade do que os métodos convencionais na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (XIÃO e HERD, 1993).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os resultados obtidos pelos métodos colorimétricos em esfregaço de fezes, corados pelas técnicas de Kinyoun, Safranina, Ziehl-Neelsen e pela fluorescência de coloração por Auramina, para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros leiteiros da região sul do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise comparativa entre os diferentes métodos de coloração foram coletadas amostras fecais de 359 bezerros com até um ano de idade, de 68 propriedades leiteiras, distribuídas em 22 municípios da região sul do Rio Grande do Sul.

Com auxílio de luva de palpação retal as fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais, devidamente contidos em curral com brete dimensionado para bovinos. O material foi acondicionado em sacos plásticos, identificado e mantido sob refrigeração entre 4 e 10 °C, até seu processamento. Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, em 06/06/2016, sob o protocolo 23110.001818/2016-73.

As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, por meio dos Métodos de coloração de Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen e por fluorescência pela coloração de Auramina.

Os métodos utilizados seguiram o protocolo estabelecido por Rey (1991). Método de Ritchie (1948) modificado por Young (1979), baseado na concentração por sistema de centrifugo sedimentação em Acetato de etila.

Após a coleta das amostras, de cada uma delas foram pesadas quatro gramas de fezes, transferindo-as para um Becker, acrescentando-se 10 mL de água destilada. Após homogeneização, o material foi filtrado em quatro camadas de gaze dobrada e transferido para tubos de ensaio e centrifugados a 300 rads/s por três minutos. Este procedimento foi repetido de três a quatro vezes. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 2 mL de solução de formol a 10% e três mililitros de acetato de etila.

Para a análise desse material, centrifugaram-se as amostras formolizadas por 10 minutos a 300 rads/s, descartando-se o sobrenadante. O sedimento obtido foi utilizado para a confecção dos esfregaços.

*Endereço para correspondência:
brubaccega@hotmail.com

De cada sedimento obtido nesse procedimento, foram confeccionadas três lâminas para cada método, através de esfregaços fecais, e coradas pelas técnicas de coloração de Auramina “O” Fenicada (Henderson *et al.*, 1942), Kinyon (MOURA e OLIVEIRA, 1985), Ziehl-Neelsen (Garcia *et al.*, 1983) e Safranina (BAXBY *et al.*, 1983). As três lâminas confeccionadas foram observadas ao microscópio óptico, com exceção das destinadas a técnica de coloração por Auramina “O” Fenicada, que foram visualizadas ao microscópio de fluorescência.

Para a confirmação do diagnóstico, foi utilizado um microscópio óptico (1000x) com ocular contendo micrometria dos elementos diagnosticados. Todas as técnicas foram previamente testadas em amostras positivas. Para a realização dos métodos, sempre se utilizou um controle positivo, cedido pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Rio Grande.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 359 amostras fecais foram coletadas no estudo, das quais 24 (6,69%) apresentaram positividade para oocistos de *Cryptosporidium* spp., nos quatro métodos colorimétricos utilizados.

O procedimento de Auramina permitiu a observação de oocistos em 10,61% das amostras (n=38), seguido do método de coloração de Safranina, que detectou 6,96% (n=25) casos positivos. Os métodos de Kinyon e Ziehl-Neelsen apresentaram o mesmo resultado, detectando oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 24 amostras fecais (6,69%).

Tabela 01: Comparação entre os métodos colorimétricos para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos.

MÉTODOS	NEG	POS
AURAMINA	321(89,39%)	38(10,61%)
KINYOUN	335(93,31%)	24(6,69%)
SAFRANINA	334(93,04%)	25(6,69%)
ZN	335(93,31%)	24(6,69%)

N% = Número, NEG = negativo, POS = positivo, ZN = Ziehl-Neelsen

No presente trabalho, dentre as técnicas utilizadas, o método de fluorescência com coloração de Auramina, mostrou-se mais sensível para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de fezes de bezerros.

A positividade de *Cryptosporidium* spp., observada nos métodos de Kinyon e Ziehl-Neelsen foi de 6,69% do total de amostras analisadas. Números superiores foram encontrados em São Paulo com 9,43% de prevalência, utilizando o método de Sheather (RIBEIRO *et al.*, 2000). Os resultados encontrados em São Paulo, utilizando a técnica de Sheather, são semelhantes aos descritos por Langoni *et al.* (2004) em Minas Gerais, empregando a técnica de ELISA, com 9,2% de bovinos infectados pelo protozoário.

*Endereço para correspondência:
brubaccega@hotmail.com

Utilizando RT-PCR a prevalência encontrada no estado do Paraná foi de 8,3% (MACEDO, 2014).

Tais levantamentos epidemiológicos evidenciam que existem vários métodos de detecção de *Cryptosporidium* utilizados por pesquisadores. Entretanto, Brook *et al.* (2008) afirmam que nenhuma técnica é 100% sensível e específica (TAYLOR e WEBSTER, 1998).

Em análise comparativa entre PCR e a coloração de Ziehl-Neelsen, os resultados de positividade observados por Cunha *et al.* (2002) foram de 10,12% e 9,3%, respectivamente. Não justificando, segundo os autores, o emprego da técnica de maior custo.

No presente estudo, a coloração com Auramina propiciou uma melhor visualização dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., que apresentavam diferentes tonalidades de amarelo a esverdeado brilhante em microscópio fluorescente, considerando-se uma técnica de eleição para ser utilizada em laboratórios para triagem de amostras, como mencionado por Quadros e Araújo (2003). Segundo esses autores, o método de coloração de Auramina permite rastrear a lâmina com objetiva de 40x, possibilitando uma visualização mais rápida em todos os campos.

Cumprе salientar que no presente estudo, das 38 amostras fecais positivas para o patógeno pela Auramina, 14 amostras foram positivas somente nesse método, sendo que nas outras técnicas de coloração o resultado dessas amostras foi negativo. Deve ser feita a ressalva de que alguns autores citam que o método de coloração pela Auramina pode apresentar resultados de falso-positivo, principalmente quando realizado por pessoas com pouco treinamento (QUADROS e ARAÚJO, 2003).

Métodos colorimétricos (Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen) são adequados para detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, por apresentarem relativa facilidade no preparo das soluções, além de exigir apenas equipamentos básicos, existentes na maioria dos laboratórios que realizam o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias.

Mesmo com o avanço das técnicas imunológicas e moleculares para o diagnóstico de parasitoses, as técnicas de diagnóstico coproparasitológicos continuam sendo muito empregadas, pela praticidade, sensibilidade e baixo custo (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Entretanto, o preparo do esfregaço e a coloração, requerem muitas etapas e tempo, o que dificulta sua utilização em larga escala. Ainda, a sensibilidade dos métodos pode ser diminuída em amostras contaminadas com grande quantidade de leveduras ou baixa concentração de oocistos nas fezes. Por isso, para a correta identificação dos oocistos ao microscópio óptico, é necessário treinamento e experiência do examinador (KEHL *et al.*, 1995; IGNATUS *et al.*, 1997; FAYER *et al.*, 2000).

As técnicas de Kinyoun, Safranina e Ziehl-Neelsen permitem a visualização dos oocistos que apresentam diferentes tonalidades de róseo-avermelhado e, os esporozoítos observados na maioria dos oocistos. Essas técnicas mostraram-se eficazes para o diagnóstico de criptosporidiose, porém, evidenciou-se a necessidade da utilização simultânea de pelo menos duas técnicas, conforme descrito por outros autores (NETA *et al.*, 2010).

*Endereço para correspondência:
brubaccega@hotmail.com

A coloração pelo método de Auramina apresenta maior afinidade para os oocistos de *Cryptosporidium* spp., do que os que utilizam fucsina de Ziehl-Neelsen, demonstrando ser esse método mais vantajoso quando comparado com o de Ziehl-Neelsen.

A sua leitura através da técnica de Auramina se torna mais rápida, e por apresentar facilidade na técnica e na leitura dos resultados, além de maior clareza na visualização dos oocistos, pelo contraste dos mesmos, brilhando contra um fundo escuro, reduzindo a fadiga do observador e aumentando a acurácia do exame, sendo, portanto, a técnica de eleição para ser utilizada diante de um grande número de amostras ou para estudos epidemiológicos, como método de triagem para exclusão de amostras falso-positivas (DIAZ-LEE *et al.*, 2015).

Sobre as vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas atualmente, deve-se mencionar que a principal vantagem de Ziehl-Neelsen, Kinyoun e Safranina são o seu baixo custo e praticidade, visto que as lâminas coradas por estes reagentes podem ser armazenados por muito tempo, ao contrário da fluorescência por coloração de Auramina, em que a duração da coloração, dura em torno de 72 h (BROOK *et al.*, 2008).

Como desvantagem, as colorações de Ziehl-Neelsen, Kinyoun e Safranina, requerem maior tempo para visualizar cada lâmina no microscópio ótico (MUÑOZ *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que para o método de Auramina é necessário a utilização de um microscópio de fluorescência, o que nem sempre está disponível em laboratórios e, também, a fluorescência de fundo da amostra pode representar um problema de leitura em esfregaços corados com essa coloração se o espécime tem uma grande quantidade de detritos fecais (BROOK *et al.*, 2008). No presente estudo, não foram encontradas tais dificuldades, para a realização das colorações, bem como, a leitura das lâminas, para o diagnóstico de criptosporidiose.

CONCLUSÕES

O método de fluorescência com coloração de Auramina demonstrou ser mais efetivo na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros. Sendo nas condições estudadas, eleito o método para triagem de amostras em estudos epidemiológicos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi realizado com o apoio do Código de Financiamento 001 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F.A.P.; WILSMANN, C.G.F.; TEIXEIRA, M.C. In: *Enfermidades parasitárias por protozoários em pequenos animais/organização*, Cláudia de Mello Ribeiro. 1ª ed., Rio de Janeiro: Rubio, 2015. 168p.

*Endereço para correspondência:
brubaccega@hotmail.com

ARROWOOD, M.J. Diagnosis. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Fayer R. 1^a ed., CRC Press, New York, 1997. 576p.

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, v.93, p.317-323, 1983.

BAXBY, D.; HART, C.A.; BLUNDELL, N. Shedding of oocysts by immunocompetent individuals with cryptosporidiosis. The Journal of Hygiene, v.95, p.703-709, 1985.

BOWMAN, D.D.; LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: veterinary and public health importance. Experimental Parasitology, v.124, p.121-127, 2010.

BROGLIA, A.; RECKINGER, S.; CACCIÓ, S.M.; NÖCKLER, K. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. Veterinary Parasitology, v.154, p.8-13, 2008.

BROOK, E.; HART, C.A.; FRENCH, N.; CHRISTLEY, R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. Veterinary Parasitology, v.152, p.46-52, 2008.

CHAKO, C.Z.; TYLER, J.W.; SCHULTZ, L.G.; CHIGUMA, L.; BEERNTSEN, B.T. Cryptosporidiosis in people: It's not just about the cows. Journal of Veterinary Internal Medicine, v.24, p.37-43, 2010.

CHALMERS, R.M.; SMITH, R.; ELWIN, K.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; GILES, M. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004–2006. Epidemiology and Infection, v.139, p.700-712, 2001.

DA CUNHA, M.J.R.; SILVA, M.B.O.; ARANTES, V.M.; CURY, M.C. Comparação da eficácia do Ziehl-Neelsen e da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para o diagnóstico do *Cryptosporidium* spp. em bovinos e suínos provenientes da região de Uberlândia. In: Anais do XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2009, Foz do Iguaçu. 2009.

DAS, G.; CHANGKIJA, B.; SARKAR, S.; DAS, P. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* isolates in bovine population in Kolkata and characterization of new bovine genotypes. Research in Veterinary Science, v.91, p.246-250, 2011.

DE CARLI, G.A. Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas –Métodos e Técnicas. 1^a ed., Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1994. 313p.

DIAZ-LEE, A.; MOLINA, R.; DOUGNAC, C.; MERCADOB, R.; RETAMALA, P.; FREDESA, P. Sensibilidad analítica de técnicas de tinción tradicionales y una técnica molecular para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. aislados de bovinos en muestras de agua: estudio preliminar. Archive Medicine Veterinary, v.47, p.91-96, 2015.

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

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

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplex: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, v.156, p.191-190, 2008.

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

GARCIA, L.S.; BRUCKNER, D.A.; BREWERT, T.C.; SMINITZU, R.Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *Journal Clinical of Microbiology*, v.18, p.185-190, 1983.

GRACZYK, T.K.; MAJEWSKA, A.C.; SSCHWAB, K.J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends in parasitology*, v.24, p.55-59, 2008.

HENDERSON, H.J.; SPAULDING, E.H.; GAULT, E.S. Demonstration of globi and leprosy bacilli by fluorescence microscopy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.50, p.91-2, 1942.

IGNATIUS, R.; EISENBLATTER, M.; REGNATH, T.; MANSMANN, U.; FUTH, U.; HAHN, H.; WAGNER, J. Efficacy of different methods for detection of low *Cryptosporidium parvum* oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimens-Eur. *Journal Clinical Microbiology Infections Diseases*, v.16, p.732-6, 1997.

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, p.41-47, 2010.

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

LANGONI, H.; LINHARES, A.C.; AVILA, F.A.; SILVA, A.V. DA; ELIAS, A.O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, p.313-319, 2004.

MACEDO, R. Detecção e caracterização molecular de picobirnavirus em fezes de bezerros naturalmente infectados. 65p. (Dissertação) Paraná, Universidade Federal do Paraná, 2014.

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*, v.109, p.949-951, 2011.

MIRHASHEMI, M.E.; ZINTL, A.; GRANT, T.; LUCY, F. E.; MULCAHY, G.; DE WAAL, T. Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Experimental Parasitology*, v.151, p.14-20, 2015.

MOURA, H.; OLIVEIRA, L.M. *Cryptosporidium*: parasito de imunocomprometidos. *Revista Brasileira Patologia Clínica*, v.21, p.198-201, 1985.

MUNDIN, M.J.S.; SOUZA, L.M. DE; MUNDIM, A.V.; MORAIS, R.N. Frequência de oocistos de *Cryptosporidium* sp em fezes de bezerros criados sob condições naturais no município de Uberlândia, analisadas por quatro métodos laboratoriais. *Veterinária Notícias*, v.1, p.33-36, 1995.

MUNÕZ, P.; FREDES, F.; DIAZ-LEE, A.; MERCADO, R.; OZAKI, L. Deteccion de *Cryptosporidium* spp. em terneras de lecherias de la Region Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular. *Archive Medicine Veterinary*, v.43, p.111-116, 2011.

NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E.; HAGHIGHI, A.; TAGHIPOUR, N.; KESHAVARZ, A.; MOHEBI, S.R.; ZALI, M.R.; XIAO, L. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Veterinary Parasitology*, v.179, p.250-252, 2011.

NETA, E.S.M.; SAMPAIO, D.C.; GALVÃO, G.S.; MUNHOZ, A.D. Oocistos de *Cryptosporidium* (Apicomplexa: cryptosporidiidae) em bovinos leiteiros de uma área endêmica na Microrregião de Ilhéus-Itabuna, Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.32, p.75-78, 2010.

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

QUADROS, R.M.D.; ARAÚJO, F.A.P. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp. Tyzzer, 1907 detectada pelo método de imunofluorescência através da técnica de coloração da auramina em bovinos em propriedades rurais do município de Lages (SC), Brasil. *Revista de Ciência Agro veterinária*, v.2, p.68-73, 2003.

QUADROS, R.M.D.; MARQUES, S.M.T.; AMENDOEIRA, C.R.; SOUZA, L.A.; AMENDOEIRA, P.R.; COMPARIN, C.C. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl-Neelsen staining methods. *Parasitologia Latinoamericana*, v.61, p.117-120, 2006.

REY, L. *Parasitologia*. 2ªed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.1991. 731p.

RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H.; JEREZ, J.A.; LEITE, D.S.; FERREIRA, F.; GENNARI, S.M. Identification of enteropathogens from buffalo calves with and without diarrhoea in

the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.37, p.34-39, 2000.

RIBEIRO, C.M.; KATAGIRI, S. Criptosporidiose. *In: Enfermidades parasitárias por protozoários em pequenos animais/organização*, Cláudia de Mello Ribeiro, 1ª ed., Rio de Janeiro: Rubio, 2015. 168p.

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

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

RODRIGUES, R.D.; GOMES, L.R.; SOUZA, R.R.; BARBOSA, F.C. Comparação da eficiência das colorações de Ziehl-Neelsen modificado e Safranina modificada na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida, Cryptosporidiidae) a partir de amostras fecais de bezerros de 0 a 3 meses. Ciência Animal Brasileira, v.17, n.1, p.119-125, 2016.

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

SILVERLAS, C.; EMANUELSON, U.; VERDIER, K.; BJORKMAN, C. Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. Preventive Veterinary Medicine, v.90, p.242-253, 2009.

TAYLOR, M.A.; WEBSTER, K.A. Recent advances in the diagnosis in livestock of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Giardia* and other protozoa of veterinary importance. Research and Veterinary Science, v.65, p.83-193, 1998.

TEIXEIRA, W.F.P.; COELHO, W.M.D.; NUNES, C.M.; MEIRELES, M.V. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in calf fecal samples by direct immunofluorescence assay. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.20, n.4, p.269-273, 2011.

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

XIAO, L.; HERD, R.P. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. Veterinary Parasitology, v.55, p.257-62, 1993.

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

YODER, J.S.; WALLACE, R.M.; COLLIER, S.A.; BEACH, M.J.; HLAVSA, M.C. Cryptosporidiosis surveillance United States, 2009–2010. CENTERS FOR DISEASE, C.; PREVENTION. The Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries, v.61, p.1-12, 2012.

Ciência Animal, v.30, n.1, p.36-46, 2020.

YOUNG, K.H.; BULLOCK, S.L.; MELVIN, D.M.; SPRUILL, C. L. Ethyl Acetat as a substitute for Diethyl e Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Tecnique. Journal Clinical Microbiology, v.10, p.852-853, 1979.

*Endereço para correspondência:
brubaccega@hotmail.com