

## **Agradecimentos**

À Dra. Elsa Monteiro Grillo e Dr. Luis Gomes por tudo o que me ensinaram, pela boa disposição, pela forma como me acolheram e por todos os bons momentos passados.

À Professora Doutora Isabel Fonseca, por toda a disponibilidade, transmissão de conhecimentos, orientação e fornecimento de documentação fundamentais para a elaboração desta dissertação.

Ao amigo Dr. Mauro Bragança por toda a ajuda prestada no tratamento estatístico deste trabalho, paciência e boa disposição.

Ao Professor Doutor Miguel Saraiva Lima, por toda a documentação fornecida para a elaboração deste trabalho.

Ao Professor George Stilwell por me ter dado a sugestão deste estágio.

À minha família e amigos pelo apoio, paciência e incentivo demonstrados durante todo estes anos de curso e durante todo o período de execução desta dissertação.

# COCCIDIOSES EM VITELOS NA REGIÃO DE MONTEMOR-O-VELHO

## Resumo

A presente dissertação refere-se ao estudo desenvolvido no período entre 5 de Novembro de 2007 e 5 de Maio de 2008, integrado na componente prática do Estágio do Curso de Mestrado Integrado na área de Clínica de Espécies Pecuárias. Foi possível acompanhar uma casuística variada na área da Clínica, Reprodução e Cirurgia de Bovinos, dentro da qual foi escolhido o tema “Coccidioses em vitelos na região de Montemor-o-Velho” para desenvolvimento. Nesta dissertação serão abordados os géneros *Cryptosporidium* e *Eimeria*, parasitas conhecidos por causarem diarreia, mais ou menos grave, especialmente em vitelos.

Foram recolhidas 101 amostras de fezes de vitelos, com idades de dois a 50 dias, distribuídos por 26 explorações na região de Montemor-o-Velho entre 29 de Fevereiro e 28 de Abril de 2008.

Na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*, utilizaram-se as técnicas de esfregaço fecal directo e pela técnica de esfregaço fecal após concentração pelo método de Ritchie, corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Para a pesquisa de oocistos de *Eimeria*, as fezes foram analisadas segundo o método de Willis.

Para obter informação adicional, foi ainda realizado um inquérito nas explorações sobre condições gerais de manejo e instalações, além de outros factores considerados relevantes, como a existência de história de diarreia neo-natal nas explorações, proveniência das águas de abeberamento e existência de cursos de água próximos das explorações.

Os resultados obtidos permitiram detectar a presença de *Cryptosporidium* em 39,6% (40/101) dos vitelos pela técnica de esfregaço fecal e em 40,6% (41/93) dos animais pela técnica de esfregaço fecal após concentração pelo método de Ritchie modificado, com uma sensibilidade de 75% e 85% respectivamente. A presença de oocistos de *Eimeria* verificou-se em 10,8% (11/101) de casos.

Foram identificados como factores de risco de infecção por *Cryptosporidium* a idade e o tipo de piso e paredes dos vitleiros.

Palavras-chave: Coccidioses, vitelos, diarreia, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, Montemor-o-Velho

# COCCIDIOSIS IN CALVES IN THE REGION OF MONTEMOR-O-VELHO

## Abstract

The current dissertation refers to a study developed between November 5<sup>th</sup> 2007 and May 5<sup>th</sup> 2008, as part of the curricular training towards the Integrated Master degree in Veterinary Medicine, in the Farm Animals Medicine field. It was possible to follow diverse clinical cases related to Internal Medicine, Reproduction and Surgery, from which the theme “Coccidiosis in calves in the region of Montemor-o-Velho” was chosen. *Cryptosporidium* and *Eimeria*, parasites known to cause mild and severe diarrhea, mostly in calves, are the two genus mentioned in this dissertation.

Fecal samples (n=101) were collected from calves, aged between 2 and 50 days, from 26 farms in the region of Montemor-o-Velho, between February 29<sup>th</sup> and April 28<sup>th</sup>, 2008.

Presence of *Cryptosporidium* oocysts was evaluated using direct fecal smears and fecal smears after concentration with a modified Ritchie method, stained by a modified Ziehl-Neelsen method. *Eimeria* oocysts were detected in fecal samples using Willis method.

For additional information, an inquiry was performed at the farms to obtain data about general management conditions, calves housing, and other relevant factors such as history of neo-natal diarrhea, source of drinking water and existence of natural water collections nearby.

The obtained results allow to identify the presence of *Cryptosporidium* in 39,6% (40/101) of calves by direct fecal smears technique and in 40,6% (41/101) animals by fecal smear after concentration with a modified Ritchie method, with a sensibility of 75% for the first and 85% for the latter technique. Presence of *Eimeria* oocysts was detected in 10,8% (11/101) of samples.

Considering *Cryptosporidium* infection, age and type of soil and walls of calves sheds were identified as risk factors.

Keywords: Coccidiosis, calves, diarrhea, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, Montemor-o-Velho

## Índice Geral

I.	INTRODUÇÃO.....	1
1.	Caracterização do Concelho de Montemor-o-Velho.....	1
2.	Descrição das actividades realizadas no âmbito da sanidade animal .....	2
3.	Efectivos pecuários pertencentes à área de intervenção da O.P.P. de MMV.....	3
4.	Classificação sanitária do efectivo pecuário de Montemor-o-Velho .....	4
4.1.	Bovinos .....	4
4.2.	Pequenos Ruminantes.....	5
5.	Caracterização das explorações de bovinos leiteiros.....	5
6.	Actividade clínica .....	6
6.1.	Casuística da actividade clínica, especificada por aparelhos/tecidos .....	7
7.	Criptosporidiose .....	15
7.1.	Ciclo biológico.....	16
7.2.	Morfologia dos oocistos .....	17
7.3.	Epidemiologia .....	18
7.4.	Patologia e Patogenia .....	22
7.5.	Sinais clínicos e sintomas.....	23
7.6.	Imunidade.....	24
7.7.	Diagnóstico .....	25
7.8.	Terapêutica.....	28
7.9.	Profilaxia e Controlo .....	29
8.	Eimeriose .....	30
8.1.	Ciclo Biológico.....	31
8.2.	Epidemiologia .....	34
8.3.	Patologia e patogenia .....	35
8.4.	Sinais clínicos e sintomas.....	38
8.5.	Imunidade.....	39
8.6.	Diagnóstico .....	41
8.7.	Tratamento e controlo .....	42
II.	TEMA: Coccidioses em vitelos da região de Montemor-o-Velho.....	45
1.	Objectivos.....	45
2.	Material e métodos .....	45
2.1.	Técnicas laboratoriais utilizadas para o estudo das amostras fecais de vitelos.....	47
3.	Resultados .....	50
3.1.	Caracterização das fezes quanto à consistência.....	50

3.2.	Caracterização dos vitelos quanto à idade.....	50
3.3.	Resultados da pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Eimeria</i> .....	51
3.4.	Caracterização morfológica dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Eimeria</i> spp.....	55
3.5.	Avaliação da sensibilidade das técnicas de diagnóstico utilizadas na pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> (esfregação fecal directo e após concentração pela técnica de Ritchie .....	56
3.6.	Resultados do inquérito efectuado nas explorações em estudo .....	57
4.	Discussão .....	61
5.	Conclusão .....	68
III.	BIBLIOGRAFIA .....	70
IV.	ANEXOS .....	78

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Número total de ruminantes e de explorações, da O.P.P. de MMV.....	3
Tabela 2 - Número de bovinos, de acordo com o grupo etário e a aptidão, da O.P.P. de MMV.....	3
Tabela 3 - Número de Pequenos Ruminantes, jovens e adultos, divididos por espécie e tipo de produção da O.P.P. de MMV.....	4
Tabela 4 – Espécies válidas de <i>Cryptosporidium</i> e respectivos hospedeiros principais.....	5
Tabela 5 – Principais características morfológicas dos oocistos das espécies de <i>Eimeria</i> mais importantes em bovinos.....	31
Tabela 6 – Classificação do nível de infecção das amostras fecais por <i>Cryptosporidium</i> em função do número de oocistos.....	48
Tabela 7 - Classificação do nível de infecção das amostras fecais por <i>Eimeria</i> em função do número de oocistos.....	49
Tabela 8 - Proporções dos resultados positivos e negativos à presença de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> , pela técnica de esfregaço fecal directo (ED) entre os vários grupos etários.....	51
Tabela 9 – Comparação dos resultados da contagem do número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> (em 10 campos aleatórios na ampliação x400) obtidos pela técnica de esfregaço directo, de concentração pelo método de Ritchie modificado e de centrifugação simples (Centrifugação) em 16 amostras.....	53
Tabela 10 – Comparação entre o tipo de piso e paredes dos viteiros e o número e percentagem de amostras positivas pela técnica de esfregaço directo (ED) (n=101).....	60
Tabela 11 – Associação entre os resultados obtidos pela técnica de ED e a proximidade ou não de rios ou ribeiros das explorações.....	60
Tabela 12 – Dados relativos a cada amostra e contagem do número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e de <i>Eimeria</i> encontrados pelas diferentes técnicas usadas.....	79
Tabela 13 – Base de dados relativa ao questionário efectuado nas explorações.....	82
Tabela 14 – Comparação dos resultados positivos e negativos pela técnica de esfregaço fecal directo (ED) dentro dos animais nascidos nos diferentes tipos de maternidades.....	84
Tabela 15 - Comparação dos resultados positivos e negativos nos animais, pela técnica de esfregaço fecal directo (ED) dentro dos diferentes tipos de sistemas de abeberamento.....	84
Tabela 16 - Comparação dos resultados positivos e negativos nos animais, pelo método de Willis, dentro dos diferentes tipos de solos e paredes dos viteiros.....	84
Tabela 17 – Comparação dos resultados positivos e negativos dos animais, pelo método de Willis, dentro dos diferentes tipos de sistemas de abeberamento.....	85

## Índice de gráficos

Gráfico 1 – Percentagem de consultas em cada espécie.....	6
Gráfico 2 – Distribuição da casuística por aparelhos/tecidos.....	7
Gráfico 3 – Classificação das fezes de vitelo quanto à consistência (n= 101).....	50
Gráfico 4 – Distribuição do total de vitelos incluídos no estudo por grupos etários.....	50
Gráfico 5 – Distribuição do número de amostras fecais positivas à presença de oocistos de <i>Eimeria</i> e <i>Cryptosporidium</i> , por grupos etários e por técnicas de diagnóstico.....	51
Gráfico 6 – Distribuição do número de amostras fecais positivas para <i>Cyptosporidium</i> (n=41), classificadas pelo nível de infecção (I a V) e por grupos etários (1 a 5).....	52
Gráfico 7 – Número de amostras fecais positivas para <i>Eimeria</i> , distribuídas pelo nível de infecção e por grupos etários (n=11).....	54
Gráfico 8 – Distribuição dos resultados positivos para <i>Eimeria</i> e <i>Cryptosporidium</i> de acordo com o tipo de fezes (diarreicas e não diarreicas).....	54
Gráfico 9 – Percentagem das maternidades existentes nas explorações em estudo (n=26).....	57
Gráfico 10 – Distribuição dos diferentes tipos de alojamento/contenção nas explorações (n=26).....	58
Gráfico 11 – Distribuição do tipo de abeberamento dos vitelos nas explorações.....	59
Gráfico 12 – Distribuição do tipo de piso dos vitleiros nas explorações.....	59

## Índice de figuras

Figura 1 - Actuação da O.P.P. de Montemor-o-Velho. Recolha de sangue através da veia jugular de ovelha (a). Identificação através da colocação de brinco (b).....	4
Figura 2 – Chanfro de vitela, lacerado por uma motosserra (a) e sutura do mesmo (b).....	9
Figura 3 – Edema facial provocado por reacção alérgica à picada de vespas numa vaca....	9
Figura 4 – Extracção forçada de feto enfisematoso (a). Castração de novilho (b).....	11
Figura 5 –Monstro Onfalosita (a). Parto distócico (feto em apresentação longitudinal posterior) (b).....	11
Figura 6 – Prolapso rectal em porca.....	14
Figura 7 – Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp. (adaptado de Palmateer, 2003).....	16
Figura 8 – Representação esquemática do ciclo biológico de <i>Eimeria</i> spp. (adaptado de <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Eimeria">http://en.wikipedia.org/wiki/Eimeria</a> .....	32
Figura 9 – Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em esfregaços fecais corados pelo método de Ziehl-Neelsen modificado.....	55
Figura 10 – Oocistos de <i>Eimeria</i> spp. pelo método de Willis.....	56

## Índice de abreviaturas e símbolos

< - Menor

> - Maior

Ac – Anticorpo

AcMcl – Anticorpos monoclonais

Ag – Antigénio

BRSV - Vírus Respiratório Sincicial Bovino

BVD – Diarreia Vírica Bovina

ED – Esfregaço fecal directo

EIA – Técnicas imunoenzimáticas

ELIZA – Enzyme-Linked Immunossorbant Assay

et al. – e outros

FISH - Hibridação fluorescente in situ

IBR – Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

Ig – Imunoglobulina

IMS - separação imunogamética

IL – Interleucina

INF- $\gamma$  – Interferão- $\gamma$

mL – mililitro

MMV - Montemor-o-Velho

NK – Natural Killers

NO – Óxido Nítrico

°C – Graus Celsius

OPP – Organização dos produtores pecuários

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

PI-3 - Parainfluenza - 3

PIS – Plano Individual de Saneamento

RFLP – Restriction fragments length polymorphism (Polimorfismo na dimensão de fragmentos)

de restrição)

RPH - Hemaglutinação reversa passiva

rpm – rotações por minuto

RT – reverses transcription

TNF- $\alpha$  – Factor de Necrose Tumoral – $\alpha$

UV – Ultra Violeta

## I. INTRODUÇÃO

A presente dissertação descreve resumidamente as actividades desenvolvidas pela autora no decurso do Estágio do Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, decorrido no período compreendido entre 5 de Novembro de 2007 e 5 de Maio de 2008. Nos primeiros três meses deste período, acompanhei o trabalho da minha Orientadora, Dra. Elsa Monteiro Grillo, e nos meses seguintes acompanhei o Dr. Luís Gomes em toda a sua rotina de Médico Veterinário.

As actividades relatadas foram desenvolvidas na área geográfica do concelho de Montemor-o-Velho e também em alguns concelhos limítrofes, nomeadamente na zona de Cantanhede e Figueira da Foz.

O estágio teve como objectivo a aprendizagem prática na área da Clínica, Reprodução e Cirurgia das Espécies Pecuárias, tendo também acompanhado a intervenção da Organização dos Produtores Pecuários (O.P.P.) da Cooperativa Agrícola do Concelho de Montemor-o-Velho cuja Médica Veterinária Coordenadora e Executora é a Dra. Elsa Monteiro Grillo.

Este trabalho começa com a caracterização da região de Montemor-o-Velho, seguido de uma breve descrição das actividades desenvolvidas onde será exposta a casuística acompanhada.

Por último, será desenvolvido o tema específico “Coccidioses em vitelos na região de Montemor-o-Velho”, onde é feita a revisão bibliográfica, indicados os materiais e métodos apresentados e discutidos os resultados obtidos e respectivas conclusões.

A observação das condições de estabulação e higiosanitárias dos vitelos presentes nas explorações daquela região, propícias ao aparecimento destes parasitas assim como pelo facto, de muitos deles se apresentarem com diarreia, levou à escolha deste tema. Os géneros *Eimeria* e *Cryptosporidium* são os únicos abordados nesta dissertação.

O termo “coccidioses” é aplicado, por norma às infecções causadas por *Eimeria* spp. e termo “criptosporidiose” pelas provocadas por *Cryptosporidium* spp..

### 1. Caracterização do Concelho de Montemor-o-Velho

O concelho de Montemor-o-Velho está situado na Beira Litoral, distrito de Coimbra, região Centro e sub-região do Baixo Mondego. Tem como concelhos limítrofes Cantanhede a Norte, Soure a Sul, Condeixa-a-Nova e Coimbra a Este e Figueira da Foz a Oeste, sendo atravessado no sentido Este-Oeste pelo rio Mondego.

Este concelho situa-se a uma altitude de 5 km acima do nível do mar, ocupando uma área de 228,62 Km<sup>2</sup>, dividida em 14 freguesias: Abrunheira, Arazede, Carapinheira, Ereira,

Gatões, Meãs do Campo, Montemor-o-Velho, Pereira, Santo Varão, Seixo de Gatões, Tentúgal, Verride e Vila Nova da Barca.

A heterogeneidade do relevo origina zonas de diferentes características, o que condiciona tanto a distribuição geográfica como as actividades económicas predominantes. O clima sofre grande influência do oceano Atlântico, conduzindo a níveis elevados de humidade no Inverno e a uma estação seca prolongada nos meses de Verão.

A agricultura continua a ter grande importância, sendo o arroz e o milho as principais culturas produzidas e, no sector animal, a produção de leite e de carne são de grande relevância. A indústria é representada por vários estabelecimentos fabris de pequena e média dimensão e predominam as transformações alimentares, sobretudo panificação e lacticínios. A população do concelho é de 25478 habitantes, apresentando um o baixo nível de escolaridade. Este facto repercute-se no tipo de actividade profissional, onde a grande maioria da população activa está ligada ao sector agrícola e pecuário.

## **2. Descrição das actividades realizadas no âmbito da sanidade animal**

A Organização de Produtores Pecuários (O.P.P.) da Cooperativa Agrícola do Concelho de Montemor-o-Velho (MMV) é a entidade responsável pela sanidade animal do efectivo pecuário pertencente a 12 das 14 freguesias existentes no concelho. Esta O.P.P. cumpre com todas as actividades previstas pelos planos oficiais determinados pela Direcção Geral de Veterinária, para erradicação e/ou controlo das seguintes doenças:

- Bovinos: Tuberculose, Leucose e Brucelose
- Pequenos Ruminantes: Brucelose

A actuação da O.P.P. relativamente ao efectivo bovino traduz-se em:

- Identificação animal com brinco, realizada segundo o estipulado pelos serviços oficiais em todos os animais;
- Rastreio anual, por colheita de amostra de sangue para rastreio serológico, de Brucelose a animais com idade superior a 12 meses e de Leucose Enzoótica Bovina a animais com idade superior a 24 meses;
- Rastreio anual de tuberculose a animais com mais de 24 meses, realizada por injeções intradérmicas de tuberculina aviária e mamífera, na tábua do pescoço (prova de intradermotuberculização). A leitura da prova é feita às 72h após inoculação por inspecção visual e táctil, e medições da espessura da pele. Os animais que na prova intradérmica apresentam resultados duvidosos são submetidos a nova tuberculização após um período mínimo de 42 dias;
- Para além dos rastreios obrigatórios, a O.P.P. de MMV desenvolve outros planos de acção que incidem essencialmente na divulgação e aconselhamento dos produtores, quer através de documentação facultada e de sessões de esclarecimento, quer através de visitas regulares efectuadas às explorações:

- Controlo e profilaxia de mastites assente nos seguintes pontos: fornecimento a preço reduzido, de antibióticos sob a forma de suspensão intramamária para o tratamento no início do período de seca; recolha de amostras de leite e envio ao laboratório para a realização de identificação de agentes, antibiograma e contagem de células somáticas sempre que solicitado pelo produtor ou quando o responsável sanitário o entenda oportuno;
- Controlo de doenças não obrigatórias tais como parasitoses, doenças do tracto reprodutivo, doenças metabólicas e dos cascos, rastreio de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD) e leptospirose;
- Acções de formação para sensibilização dos produtores para a necessidade de melhorarem a qualidade do leite, o bem-estar animal, assim como indicações e esclarecimentos sobre as várias doenças, sobre os cuidados a ter na compra e venda de animais e outras medidas de maneio.

Para o efectivo ovino e caprino as intervenções sanitárias consistem em:

- Identificação de todos os animais através da colocação de brinco;
- Rastreio anual de Brucelose por colheita de sangue, na veia jugular, e consequente diagnóstico serológico. No caso de rebanhos com animais positivos, o rastreio passa a ser realizado segundo o Anexo I do Dec. Lei 244/2000, 27 Setembro;
- Vacinação com Rev 1 das fêmeas de reposição nas explorações com PIS (Plano Individual de Saneamento);
- Desparasitação dos animais com desparasitantes de largo espectro, (normalmente albendazol) e vacinação dos animais contra Agaláxia Contagiosa, Enterotoxémia e Pieira, quando solicitado pelos produtores e sendo-lhes apenas cobrado o custo da medicação

### 3. Efectivos pecuários pertencentes à área de intervenção da O.P.P. de MMV

**Tabela 1** - Número total de ruminantes e de explorações, da O.P.P. de MMV

	Nº animais	Nº explorações
BOVINOS	4115	306
PEQ. RUMINANTES	5928	247

**Tabela 2** - Número de bovinos, de acordo com o grupo etário e a aptidão, da O.P.P. de MMV

BOVINOS	Jovens (< 18 meses)		Adultos	
<b>Leiteiros</b>	♂	142	♂	29
	♀	422	♀	1953
<b>Não leiteiros</b>	♂	359	♂	169
	♀	362	♀	679

**Tabela 3** - Número de Pequenos Ruminantes, jovens e adultos, divididos por espécie e tipo de produção da O.P.P. de MMV

PEQ. RUMINANTES	Jovens (<12 meses)		Adultos	
	♂	♀	♂	♀
<b>Ovinos leiteiros</b>	8	91	92	2918
<b>Ovinos não leiteiros</b>	13	74	147	1839
<b>Caprinos</b>	6	29	62	650

Não existem registos relativos ao efectivo suíno da região, mas a maioria das explorações é do tipo familiar (i.e. com efectivos que variam de 1 a 20 animais), havendo somente em algumas delas, um varrasco que serve de posto de cobrição para as outras. Os leitões produzidos são vendidos com dois meses de idade e são destinados ao consumo em restaurantes da zona da Mealhada e Bairrada.

**Figura 1** - Actuação da O.P.P. de Montemor-o-Velho. Recolha de sangue através da veia jugular de ovelha (a). Identificação através da colocação de brinco (b)



a

b

#### 4. Classificação sanitária do efectivo pecuário de Montemor-o-Velho

##### 4.1. Bovinos

- Brucelose: a totalidade das explorações de bovinos apresenta o estatuto sanitário B4, o que significa que o efectivo é “Oficialmente Indemne”, apresentando serologia negativa nos rastreios que se efectuam anualmente a todos os animais.
- Tuberculose: todas as explorações apresentam-se classificadas como T3 (Oficialmente Indemne), ou seja, todo o efectivo apresenta resultados negativos à prova de intradermotuberculização.
- Leucose Enzoótica Bovina: O estatuto sanitário é L4 (Oficialmente Indemne) para todas as explorações.

## 4.2. Pequenos Ruminantes

A maioria das explorações apresenta-se classificada como “Oficialmente Indemne” (B4). Existe contudo, uma pequena percentagem de efectivos com a classificação “Oficialmente Indemne Suspensa” (B4S), devido ao desconhecimento da proveniência dos animais.

A classificação B3 (Indemne) é atribuída a 48 explorações, 15 das quais com efectivos vacinados com Rev1.

Por último, a classificação “Não Indemne” é atribuída a três explorações; uma delas apresenta o estatuto B2.1 (o que significa que é positiva tanto serologicamente como no isolamento bacteriano *pos mortem*) e as outras duas apresentam estatuto B2 (serologicamente positivas, mas com isolamento bacteriano *pos mortem* negativo).

Realiza-se um rastreio anual a todos os pequenos ruminantes, maiores de seis meses, classificados como “Oficialmente Indemnes” e “Indemnes”. Nos efectivos “Não Indemnes”, fazem-se rastreios consecutivos e vacinação do efectivo de reposição (Programa Sanitário Anual, O.P.P. de Montemor-o-Velho, 2008).

## 5. Caracterização das explorações de bovinos leiteiros

Foram visitadas essencialmente três tipos de explorações: de pequena (< 20 animais), de média (20 – 50 animais) e de grande dimensão (> 50 animais). A raça que predomina é a Holstein-Frísia e o sistema de produção é o intensivo em todas as explorações.

As explorações de pequena dimensão, a grande maioria na região, emprega sistemas de produção simples, com poucas vacas em ordenha (< 20 animais), em estabulação permanente e com camas feitas à base de palha e/ou mato. O pasto, a palha, a silagem de milho e o concentrado constituem a principal base de alimentação, e em média, a produção de leite/vaca/lactação é inferior a 7000 litros. Nas explorações deste tipo que foram visitadas, a inseminação artificial é prática habitual.

No que respeita às de média dimensão, a alimentação é feita com recurso a silagem de milho, concentrado e a pré-mistura e as instalações já apresentam locais de descanso (“cubículos”), separados das manjedouras, com camas feitas de areia ou serradura. As médias de produção leiteira por animal são as melhores (entre 7000 a 8000 litros de leite/vaca/lactação).

As explorações de grande dimensão apresentam efectivos maiores (mais de 50 animais), instalações mais modernas e melhores médias de produção leiteira (entre 8000 a 10000 litros de leite/vaca/lactação). Apresentam maiores investimentos em tecnologia, onde já se justifica e verifica o recurso ao *Unifeed* para alimentar os animais. Nestas explorações a eficácia reprodutiva dos animais geralmente é controlada. Realizam-se diagnósticos de gestação por volta dos dois meses, e também são feitos diagnósticos de infertilidade. Controlam-se índices reprodutivos tais como: intervalo parto-concepção, intervalo entre partos e intervalo parto-1ª inseminação.

A maioria das vacarias apresenta deficiências (especialmente as de pequena dimensão) no que respeita a funcionalidade e concepção arquitectónica onde nalguns casos, os padrões mínimos de higiene e de qualidade da produção leiteira são insatisfatórios. Estes animais permanecem todo o ano nos estábulos, sobre piso de cimento e muitas vezes sem camas, faltam maternidades, vitleiros, parques de exercício, etc. No entanto, não só devido às novas exigências da Comunidade Europeia relativas ao bem-estar animal, verifica-se actualmente, uma modificação da mentalidade de alguns produtores que cada vez mais têm a preocupação de melhorar as instalações das suas explorações.

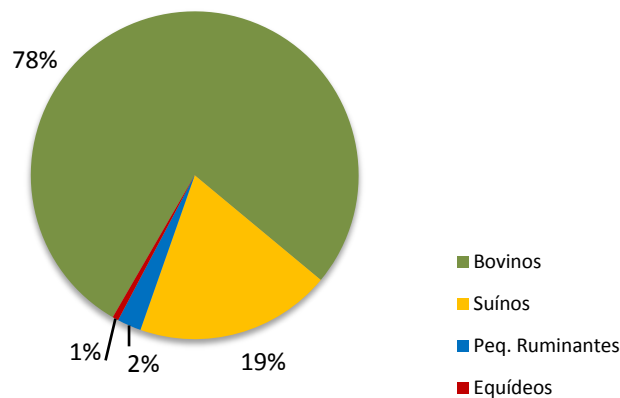
## 6. Actividade clínica

O trabalho de clínica consistia na visita às explorações, quando éramos solicitados por via telefónica, e a maior parte da actividade incidiu sobre a espécie bovina de aptidão leiteira, onde foram contabilizados 526 casos.

Em seguida surge alguma clínica de suínos, mas toda ela em explorações tipo familiar. Foram acompanhados 131 casos nesta espécie.

A clínica de pequenos ruminantes e de equídeos foram as que tiveram menor expressão durante o estágio com 16 e quatro casos observados respectivamente.

**Gráfico 1** – Percentagem de consultas em cada espécie

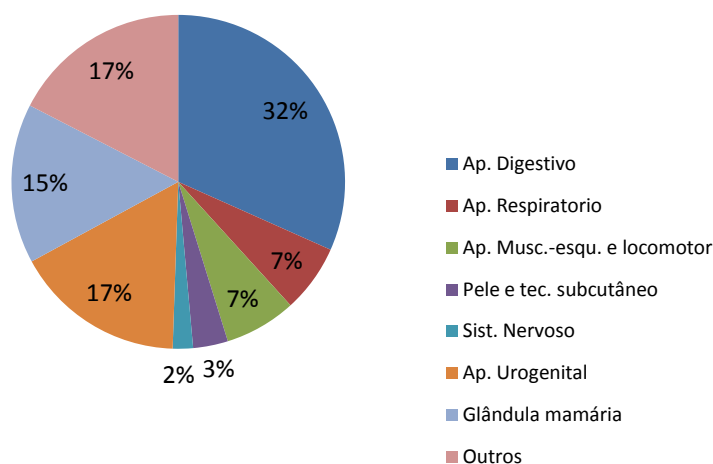


## 6.1. Casuística da actividade clínica, especificada por aparelhos/tecidos

### 6.1.1. Casos acompanhados em clínica de Bovinos

A maioria dos casos acompanhados na clínica de bovinos foi relativa ao aparelho digestivo, aparelho urogenital e à glândula mamária.

**Gráfico 2** – Distribuição da casuística por aparelhos/tecidos



Glândula Mamária	
Caso	Nº
Mastites clínicas	35
- Origem traumática	8
- Colibacilar	15
- Por Corynebacterium spp.	7
- Mastite gangrenosa	2
- Mastite enfisematosa por Clostridium spp	3
Mastites sub-clínicas	15
Hemolactação	8
Ferida na extremidade do teto	8
Obstrução fibrinosa do teto	10
Feridas no úbere por fricção	11

<b>Aparelho digestivo</b>	
<b>Caso</b>	<b>Nº</b>
Indigestão Simples	23
Indigestão por sobrecarga de Rúmen	9
Indigestão Vagal	1
Indigestão láctea em vitelos	10
Diarreia	45
- Vitelos	32
- Adultos	13
Deslocamento de Abomaso (D.A.)	35
- à esquerda (D.A.E.)	24
- à direita (D.A.D.)	8
- com torção parcial	3
Úlceras do Abomaso	1
Torção do Mesentério	2
Reticulo Pericardite Traumática	4
Dilatação do Ceco	3
Anorexia pós-parto	16
Resolução de D.A.	29
- D.A.E.	
- Omentopexia paralombar direita	19
- Abomasopexia paralombar esquerda	1
- Abomasopexia paramediana	1
- D.A.D.	
- Omentopexia paralombar direita	8

<b>Aparelho músculo-esquelético e locomotor</b>	
<b>Caso</b>	<b>Nº</b>
Traumatismos (entorses, luxações, fracturas)	19
- Vitelos	1
- Adultos	18
Poliartrite em vitelos	5
Artrogripose em vitelo	1
Alterações da úngula	14
- Panarício interdigital	8
- Pododermatite traumática	2
- Dermatite digital	4

Pele e tecido sub-cutâneo	
Caso	Nº
Alergia (alimentar, picadas de insectos)	12
Onfalite em vitelo	4
Sutura de chanfro de vitela após corte acidental com motosserra	1
Abcesso de origem traumática	2
- à entrada do peito	1
- na face	1

**Figura 2** – Chanfro de vitela, lacerado por uma motosserra (a) e sutura do mesmo (b)



a

b

**Figura 3** – Edema facial provocado por reacção alérgica à picada de vespas numa vaca



<b>Aparelho Urogenital</b>	
<b>Caso</b>	<b>Nº</b>
Urovagina	21
Pneumovagina	14
Prolapso vaginal	4
Prolapso uterino	2
Partos	31
- Eutócicos	5
- Distócicos	20
- Desproporção feto-materna	11
- Por defeitos de atitude	8
- Por presença de feto enfisematoso	1
- Gemelares	1
- Teratóides (monstro Onfalosita)	1
- Torção uterina	4
- à esquerda	3
- à direita	1
Feto mumificado (identificado por palpação rectal)	1
Episiotomia	1
Episioplastia	1
Indução de parto em gestações prolongadas	4
Castração de novilhos de raça Mertolenga	14

Cerca de 90% do trabalho realizado na clínica de bovinos leiteiros, foi relativo a maneiio reprodutivo. Pela grande carga de trabalho efectuado nesta área durante o estágio, a sua quantificação não foi possível, mas para além do diagnóstico e tratamento das doenças do aparelho genital acima referidas, as actividades realizadas no âmbito do maneiio reprodutivo foram:

- Doenças associadas ao período puerperal, como metrite pós-parto e retenção placentária;
- Diagnóstico de gestação;
- Diagnóstico e tratamento de infertilidade (ovários quísticos, ovários inactivos principalmente por deficiências nutricionais, cios silenciosos, diestros prolongados devido a condições patológicas como metrites e endometrites, falhas de fertilização, detecção de aderências e/ou abcessos no(s) ovário(s) e/ou útero);
- Indução e sincronização da ovulação.

**Figura 4 –** Extracção forçada de feto enfisematoso (a). Castração de novilho (b)



**a**

**b**

**Figura 5 –**Monstro Onfalosita (a). Parto distócico (feto em apresentação longitudinal posterior) (b)



**a**



**b**

<b>Aparelho respiratório</b>	
<b>Caso</b>	<b>Nº</b>
Pneumonia	32
- Vitelos	21
- Adultos	11
Complexo pneumo-entérico em vitelos	5

<b>Sistema Nervoso</b>	
<b>Caso</b>	<b>Nº</b>
Lesão/ruptura do Nervo Obturador	7
Meningite em vitelo	2
Suspeita de Listeriose em vaca	2

<b>Outras</b>	
<b>Caso</b>	<b>Nº</b>
	8
- Distúrbios metabólicos:	4
- Hipocalcémia	5
	3
- Cetose	1
	5
- Cetose nervosa	3
- Síndrome Fígado Gordo	3
- Hipomagnesiémia numa vaca	1
- Acidose Ruminal em vaca	4
- Acidose em vitelo	5
- Anemia por suspeita de hemoparasitas em vaca;	1
- Necropsia em vaca	1
- Descorna de Vitelas e Novilhas	1
	2

### 6.1.2. Casos acompanhados em clínica de Pequenos Ruminantes

Aparelho	Espécie/caso	Nº
<b>Aparelho Genital e glândula mamária</b>	<b>Ovelhas</b>	
	- Prolapso vaginal	2
	- Retenção placentária	1
	<b>Cabras</b>	
	- Cesariana	1
	- Mastite	4
<b>Aparelho Respiratório</b>	<b>Ovelhas</b> Pneumonia	8

### 6.1.3. Casos acompanhados em clínica de Equídeos

Aparelho	Espécie/caso	Nº
<b>Aparelho Digestivo</b>	Cólica	2
<b>Aparelho respiratório</b>	Doença Respiratória Obstrutiva Crónica	2

#### 6.1.4. Casos acompanhados em clínica de Suínos

Aparelho	Espécie/caso	Nº
<b>Aparelho digestivo</b>	Diarreia	55
	- Leitões	30
	- Adultos	25
	Indigestão em adultos	16
<b>Aparelho respiratório</b>	Pneumonia	20
	- Leitões	12
	- Adultos	8
<b>Aparelho Genital e glândula mamária</b>	Síndrome M.M.A. (Mastite Metrite Agaláxia)	17
	Mastite	5
	Parto distócico	2
	Prolapso vaginal	2
	Castração	14
	- Leitões	4
- Varrascos	10	
<b>Aparelho Locomotor</b>	Poliartrite em leitões	6
	Traumatismo nas unhas	4
<b>Doenças infecciosas e doenças infecto-contagiosas</b>	Mal Rubro	2
	Doença dos Edemas	9
	Suspeita de Salmonelose	3
	Sarna	4
<b>Outros</b>	Administração intramuscular de ferro/complexos vitamínicos em leitões	75
	Indução de cio	3
	Prolapso rectal	2

**Figura 6 – Prolapso rectal em porca**



## 7. Criptosporidiose

A criptosporidiose é uma doença parasitária, cujo principal sinal clínico nos vitelos é a diarreia. Esta doença é causada por protozoários do género *Cryptosporidium* estando incluído no Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Sub-classe Coccidia, Ordem Eucoccidiida, sub-ordem Eimeriina, família Cryptosporidiidae (Mora, 1999). As espécies do género *Cryptosporidium*, desenvolvem-se no aparelho digestivo e respiratório de várias espécies de vertebrados, tendo já sido descritas em mais de 170 espécies animais. Actualmente são consideradas 13 espécies válidas e nos bovinos foram identificadas quatro espécies de *Cryptosporidium*: *C. bovis*, *C. parvum*, *C. andersoni* e a muito pouco conhecida *C. deer-like* (Slapeta, 2006).

Apesar da sua importância na sanidade e produção animal, a criptosporidiose é também uma zoonose. Os animais são um dos principais veículos de transmissão da doença para os humanos ao eliminarem nas fezes, oocistos que vão infectar os alimentos e a água de bebida.

**Tabela 4** – Espécies válidas de *Cryptosporidium* e respectivos hospedeiros principais

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro principal</b>
<i>C. andersoni</i>	Bovinos
<i>C. baileyi</i>	Galinha e outras aves
<i>C. hominis</i>	Humanos
<i>C. canis</i>	Cão
<i>C. felis</i>	Gato
<i>C. galli</i>	Aves
<i>C. hominis</i>	Humanos
<i>C. meleagridis</i>	Aves e humanos
<i>C. molnari</i>	Peixes
<i>C. muris</i>	Roedores e outros mamíferos
<i>C. parvum</i>	Ruminantes e humanos
<i>C. wrairi</i>	Porco da Índia
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos e cobras

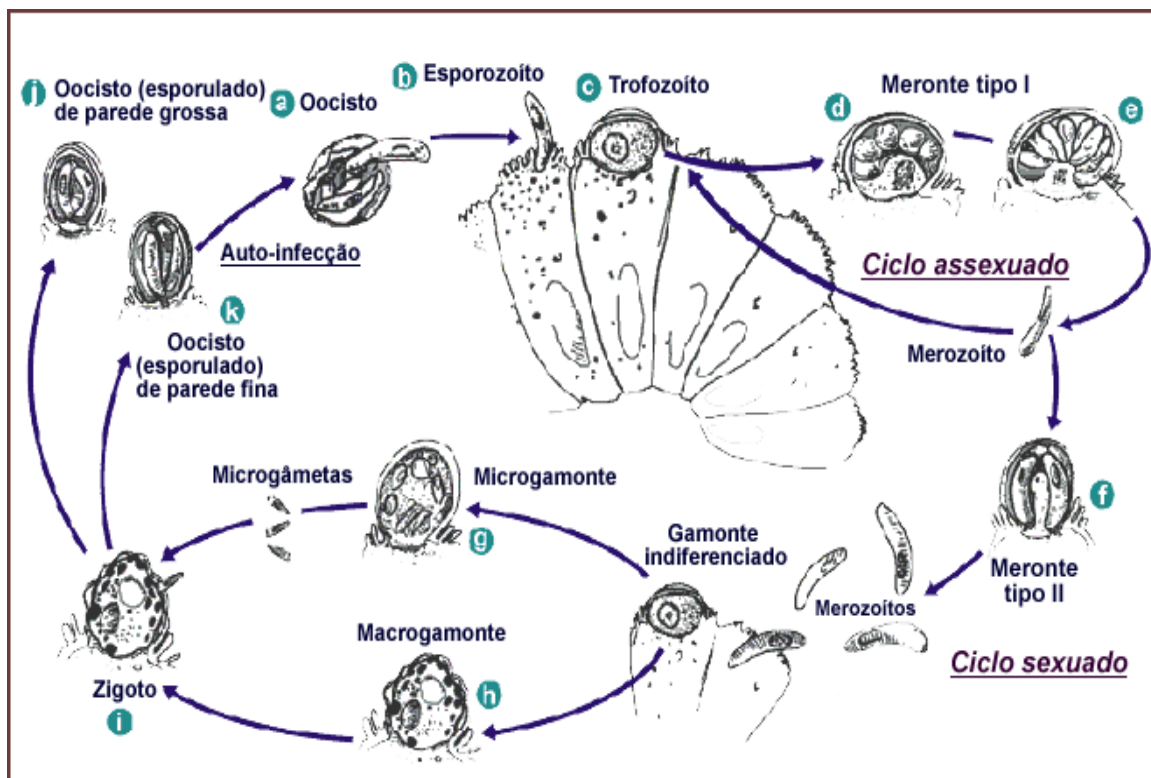
(Xiao, Fayer, Ryan, & Upton, 2004)

## 7.1. Ciclo biológico

O género *Cryptosporidium* tem um ciclo biológico semelhante ao do género *Eimeria* com as seguintes excepções:

- localiza-se dentro da célula do hospedeiro onde as fazes endógenas estão confinadas à superfície apical das células epiteliais;
- o órgão de nutrição situa-se na base do vacúolo parasitóforo, facilitando a entrada de nutrientes através da célula hospedeira e está envolvido por diversas membranas apicais;
- os oocistos contêm esporozoítos nus, isto é, não estão envolvidos num esporocisto;
- os oocistos, quando passam para as fezes, já estão esporulados e logo, são imediatamente infectantes;
- presença de dois tipos de oocistos, uns de paredes finas, responsáveis pelo ciclo auto-infectante e outros de paredes espessas que constituem as formas infectantes no meio ambiente (Pérez-Gordón, 2006; Tzipori et al., 1983).

**Figura 7** – Representação esquemática do ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp (adaptado de Palmateer, 2003)



O ciclo é monoxeno, onde todas as suas fases (sexuadas e assexuadas) ocorrem no mesmo hospedeiro. Nos ruminantes, o ciclo inicia-se com a ingestão de oocistos, seguindo-se o desenquistamento e conseqüente libertação dos quatro esporozoítos no tracto gastrintestinal. A acção da tripsina, dos sais biliares e da temperatura corporal dos mamíferos, provoca a ruptura da membrana do oocisto em pouco tempo (30 a 60 minutos), dando início à fase assexuada – merogonia ou esquizogonia – onde são produzidas duas gerações de merontes (esquizontes) de tipo I e tipo II, contendo no seu interior, oito e quatro merozoítos respectivamente. Os merozoítos do tipo I, amadurecem e libertam-se do vacúolo parasitóforo, infectam novas células epiteliais, podendo originar novas merogonias de primeira geração ou então, formarem merontes de tipo II. A partir dos merozoítos da segunda geração, dá-se início à fase sexual do ciclo, e os micro e os macrogamontes resultantes, fundem-se e formam o zigoto. Os microgamontes contêm no seu interior dezasseis microgâmetas e os macrogâmetas possuem grânulos de polissacáridos na parte basal e corpos formadores da parede na periferia. O microgâmeta flagelado vai-se fundir com o macrogâmeta e forma o zigoto.

Em 80% dos casos formam-se oocistos de parede grossa com 4 esporozoítos no seu interior. São constituídos por uma parede dupla e constituem a forma de resistência no meio ambiente, sendo os responsáveis pela transmissão da doença entre hospedeiros. Os oocistos, imediatamente infectantes no momento em que são excretados para o meio ambiente, estão muito bem adaptados, o que os torna bastante resistentes a todas as alterações ambientais, exceptuando a dessecação e a congelação (Mora, 1999). Os 20% restantes, têm parede fina e são os responsáveis pela auto-infecção do hospedeiros quando se desenquistam no seu interior.

## **7.2. Morfologia dos oocistos**

Os oocistos do tipo *C. parvum* apresentam uma forma oval ou elíptica com uma parede formada por três membranas e duas camadas quitinosas e contêm no seu interior quatro esporozoítos nus, sem esporocisto. Têm um comprimento compreendido entre 4,5-5,4 µm por 4,2-5,0 µm de largura (R. Fayer, Speer, C.A., Dubey, J.P., 1997).

A espécie do género *C. bovis* apresenta oocistos com dimensões muito semelhantes à anterior (4,76-5,35 x 4,17-4,76 µm), enquanto que os oocistos da espécie *C. andersoni* apresenta dimensões bem distintas (6,0-8,1 x 5,0-6,5 µm) (R. Fayer, Santin, & Xiao, 2005; Xiao et al., 2004).

### 7.3. Epidemiologia

A espécie *Cryptosporidium parvum* é um dos agentes etiológicos mais comuns da síndrome de diarreia neonatal em vitelos, sendo também encontrado em muitas outras espécies de mamíferos, incluindo o homem.

Os criptosporídeos apresentam diversos factores biológicos condicionantes da sua epidemiologia:

- O ciclo de vida não necessita de hospedeiro intermediário,
- Natureza ubiquitária capaz de causar infecções cruzadas em múltiplas espécies,
- Oocistos altamente resistentes às condições ambientais,
- Oocistos imediatamente infectantes,
- Alta taxa de multiplicação ( $>10^{10}$ ) em apenas um único hospedeiro,
- Doses mínimas infectantes muito pequenas ( $\leq 10$  a 100 oocistos),
- Actividade refractária a diversos fármacos e desinfectantes.

Os animais mais jovens apresentam maior susceptibilidade à doença e, a mortalidade em recém-nascidos tem sido relatada em muitas espécies animais, afectando principalmente os ruminantes (Radostits, 2007b).

A infecção nos vitelos, normalmente tem início entre a primeira e a quarta semana de idade e a duração da infecção é de cerca de duas semanas. A excreção pode ter início logo aos dois dias de idade, atingindo o seu máximo aos 14 dias de idade (Olson, O'Handley, Ralston, McAllister, & Thompson, 2004).

A distribuição da criptosporidiose nos ruminantes é cosmopolita e autolimitante. Após a infecção, os ruminantes desenvolvem imunidade duradoura (Radostits, 2007b).

Nos Estados Unidos da América, um estudo a nível nacional com 7 369 vitelos pertencentes a 1103 explorações, detectou a infecção em 59,1% (n=652) das explorações e em 22,4% (n=1648) dos vitelos. As explorações onde existiam maternidades múltiplas e as explorações com mais de 100 vacas a produzir leite, foram as que apresentaram um maior número de vitelos infectados (Garber, Salman, Hurd, Keefe, & Schlater, 1994).

Em Portugal, Martins (1997) registou na região de Barcelos uma prevalência global de 12% (30/250) em bovinos com idades compreendidas entre os dois dias e adultos e, Pereira da Fonseca, Mariano e Lopes (1998) registaram uma taxa de infecção de 44% (62/141) em vitelos até aos quatro meses de idade na região de Montemor-o-Novo. Mais tarde, Pereira da Fonseca (2000) obteve uma prevalência global de 23,3% (129/553) de *Cryptosporidium parvum* em gado bovino das regiões Centro e Sul do país. Foi também demonstrada uma prevalência de 3,6% em diversas espécies de ruminantes selvagens pertencentes ao zoo de Lisboa. No ano de 2005, um estudo realizado por Martins et al. (2007) com 183 animais pertencentes a 30 explorações leiteiras em Murtosa, região de Aveiro detectaram uma taxa de infecção de 74,8% (137/183) em animais com idades até 12 semanas, onde as maiores percentagens foram observadas em animais com idades

compreendidas entre sete a 14 dias e 15 a 21 dias, atingindo valores de 89% (56/63) e 90% (35/39) respectivamente.

Um outro estudo, de caracterização molecular de isolados de *Cryptosporidium* de bovinos de Portugal, revelou uma prevalência de 25,4% (74/291) em vitelos e 4,5% (8/176) nos adultos, cuja espécie prevalente era *C. parvum* (Mendonça et al., 2007).

Nos ruminantes domésticos, a principal fonte de contágio para os vitelos, são as fezes excretadas pelos animais neonatos infectados pelas mães e também pelos animais adultos (particularmente se estiverem em alojamentos comuns ou em estabulação permanente).

Outras potenciais fontes de infecção para estes animais são:

- roedores, gatos, cães e animais silvestres infectados,
- vectores como, por exemplo insectos, aves ou seres humanos e
- a contaminação fecal do úbere das vacas, dos alimentos, das águas, das camas, das mangedoras, entre outros (I. Pereira da Fonseca, 2000).

Estudos recentes demonstraram que a infecção por *C. parvum* é mais frequente em vitelos de explorações leiteiras do que em vitelos de explorações de carne em extensivo mas, quando ocorre nestes, o quadro clínico geralmente é mais severo (Ralston, McAllister, & Olson, 2003).

A criptosporidiose apresenta elevada morbidade mas baixa mortalidade. Contudo, no Canadá, registaram-se altos níveis de mortalidade (30%), em vitelos de explorações de carne em extensivo, tendo sido associada com a introdução de vitelos de explorações leiteiras durante a época de nascimentos. Os vitelos introduzidos provavelmente já tinham sido expostos anteriormente à infecção e desenvolvido imunidade, demonstrando assim a fraca imunidade dos animais de carne à criptosporidiose (McAllister, Olson, Fletch, Wetzstein, & Entz, 2005).

Vários estudos demonstraram que existe uma grande quantidade de bovinos leiteiros ou de carne nas explorações a excretar oocistos para a natureza, estando ou não com diarreia. Os animais adultos infectados, são assintomáticos e libertam uma grande quantidade de oocistos para o meio ambiente. No momento do parto, as vacas libertam um maior número de oocistos comparativamente a vacas no período pré-parto e pós-parto. Os neo-natos adquirem imediatamente a infecção, principalmente devido ao elevado número de oocistos excretados pelas mães durante o parto (Faubert & Litvinsky, 2000).

A doença nos humanos é cosmopolita e pode ocorrer em qualquer idade. Em pacientes imunocompetentes, a criptosporidiose manifesta-se como uma enterite aguda auto-limitante, que pode ser acompanhada por dor abdominal, perda de apetite, náuseas, vômitos, perda de peso e por vezes hipertermia, podendo contudo, ocorrer infecções assintomáticas. Por sua vez, em pacientes imunocomprometidos (como no caso de doentes com SIDA), a criptosporidiose pode causar uma infecção oportunista com um quadro clínico mais severo, crónico e por vezes fatal (Tzipori & Ward, 2002; Yoder & Beach, 2007).

Nos Estados Unidos da América, de 2003 a 2005, o número total de casos registados (incluindo imunocomprometidos) de criptosporidiose aumentaram 11,6% de 2003 a 2004 (de 3505 casos para 3911 casos respectivamente), tendo em seguida aumentado 111,4% em 2005 para 8269 casos (Yoder & Beach, 2007).

Em Portugal, existem poucos dados relativos à criptosporidiose humana, mas um estudo desenvolvido por Matos et al. (1998), revelou uma prevalência global de 8% (36/465) em pacientes infectados com VIH, no Hospital de Santa Maria, Lisboa.

A via de transmissão mais comum é a fecal-oral através da ingestão de oocistos excretados nas fezes de animais ou de humanos. Contudo, a doença pode ser transmitida directamente (pessoa-pessoa ou pessoa-animal) ou indirectamente através da ingestão de água ou de alimentos contaminados com oocistos.

A contaminação hídrica é uma importante fonte de transmissão, uma vez que os oocistos podem estar presentes em todo o tipo de águas, tais como rios, lagoas, piscinas, águas residuais e também na água potável. A ausência de tratamento de efluentes urbanos ou pecuários, a ocorrência de ruptura de saneamento básico, entre outros, são responsáveis pela presença de oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais e subterrâneas (R. Fayer, 2004).

Os oocistos de *Cryptosporidium* são extremamente resistentes à maioria dos desinfectantes comumente utilizados e a cloração das águas potáveis não é suficiente para prevenir a infecção (Olson et al., 2004). Apesar de já terem sido documentados casos individuais de enterite por *Cryptosporidium* em humanos, a situação tomou outras proporções quando, em 1994 no Texas, cerca de 2000 pessoas contraíram a doença após terem bebido água clorada.

Em Carrolton, Georgia ocorreram 13 000 casos em 1987 e em 1992 ocorreram 15 000 casos em Jackson Country, Oregon. No ano de 1993, em Milwaukee, Wisconsin, durante a chamada “wet spring” foram registados 400 000 casos (cerca de 25% de pessoas expostas) (MacKenzie et al., 1995).

O parasita *C. parvum*, por ser um organismo ubíquo, apresentar um grande número de reservatórios zoonóticos e ser altamente infeccioso, eleva o risco de qualquer pessoa adquirir esta infecção. Em 1981, foi diagnosticada criptosporidiose em estudantes de Medicina Veterinária, que cuidavam de vitelos infectados com esta doença (Anderson, Donndelinger, Wilkins, & Smith, 1982). As pessoas com elevado risco de infecção são:

- pessoas que contactam com animais infectados,
- pessoas que tenham ingerido águas de recreio (lagos, rios, piscinas, etc) ou água de abastecimento tratada de modo inadequado,
- contacto com pessoas infectadas, como por exemplo, pessoas da mesma família ou do mesmo agregado familiar ou pessoas de instituições de acolhimento,
- viajantes a países com baixas condições higosanitárias (Yoder & Beach, 2007).

A infecção por *C. parvum* foi estudada em muitas espécies de mamíferos e, até à pouco tempo, pensava-se que apenas esta era responsável pela doença nos humanos. Existe uma certa especificidade das espécies de *Cryptosporidium* em relação ao hospedeiro, mas não de uma forma estrita. Estudos recentes indicam que algumas espécies de *Cryptosporidium*, são capazes de passar a barreira da classe dos vertebrados. A espécie *C. meleagridis*, específico do peru, foi isolado em crianças no Uganda e noutros mamíferos tais como ratos e leitões (Tzipori & Ward, 2002). Para além de *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis* e *C. muris*, anteriormente consideradas específicas do peru, do cão, do gato e do murganho respectivamente, a espécie zoonótica mais comum é a *C. parvum* (genótipo bovino). Esta espécie está associada a uma maior intensidade e duração dos sintomas (Olson et al., 2004). Anteriormente pensava-se que o *C. hominis* era uma espécie antropónica até ter sido isolado num dugongo (*Dugong dugong*) (Morgan-Ryan U.M., 2000) e em primatas (Traversa et al., 2004).

Em Portugal, Matos et al. (2004) detectou num total de 40 indivíduos com criptosporidiose, 11 pacientes infectados com *C. hominis*, 22 com *C. parvum*, quatro com *C. meleagridis* e três com *C. felis*.

A espécie *Cryptosporidium andersoni*, que coloniza as glândulas gástricas dos ruminantes, pode afectar uma pequena percentagem de bovinos adultos. Esta espécie foi inicialmente denominada *C. muris* e pensava-se que era a mesma que afectava roedores, mas após ter sido feita a sua distinção geneticamente passou a ter a denominação *C. andersoni* (Lindsay et al., 2000). Esteban e Anderson (1995) verificaram em vacas cronicamente afectadas com esta espécie, uma redução em 13% na produção de leite e que excretavam grandes quantidades de oocistos para o ambiente.

Os oocistos podem sobreviver durante meses em meios líquidos a 4°C e em ambientes conspurcados (com muita matéria orgânica), com humidade elevada e temperaturas amenas. A dessecação torna os oocistos mais susceptíveis, não sobrevivendo a temperaturas superiores a 65°C ou de congelamento (-18°C) (Current & Haynes, 1984; Tzipori, 1983).

Estudos em bovinos, no Ontário revelaram que existe uma maior frequência de casos de criptosporidiose durante os meses de Inverno (Dezembro, Janeiro, Fevereiro), o que poderá estar relacionado tanto com condições ambientais, como a factores relacionados com o tipo de manejo de Inverno dos animais (confinamento, sanidade reduzida, etc) (Sanford & Josephson, 1982).

Em 1993, na zona ocidente dos E.U.A., ocorreu uma elevada taxa de diarreia neonatal e de mortalidade em bovinos de carne, na estação da Primavera (Anderson, 1998). Em todos estes casos, foi isolado *Cryptosporidium*, tendo sido nalguns deles, o único agente encontrado. Altos níveis de stress e de exposição durante várias semanas a solos e a águas infectadas terá contribuído para esta situação. O parasita *Cryptosporidium* e outros

organismos encontraram condições ideais de temperatura e humidade, mantendo-se preservados e concentrados em número muito elevado. Apesar dos esforços para minimizar o stress ambiental ao longo dos anos, continuaram a ser registados casos de diarreia nestas explorações. Anderson (1998) conclui assim que é possível existirem, altas doses infectantes de *Cryptosporidium*, em todas as condições climáticas e estações do ano.

A detecção de oocistos em água potável tornou-se num desafio para encontrar o melhor método para a desinfectar. A cloração da água pelos métodos usuais tem um efeito reduzido, uma vez que os oocistos de *Cryptosporidium*, relativamente a outros agentes enteropatogénicos, são 30 vezes e 14 vezes mais resistentes ao ozono e à cloração respectivamente. A desinfecção por radiação U.V. requer períodos longos de exposição, de pelo menos 150 minutos. A frequência de aparecimento deste organismo em água para consumo humano também indica a ineficácia de métodos habituais de limpeza (como a filtração, floculação, sedimentação e desinfecção) na separação ou inactivação dos oocistos. Relativamente aos métodos químicos de desinfecção, os oocistos de *Cryptosporidium* demonstram uma elevada capacidade de resistência. O hidróxido de amónio a 5% e a formalina a 10% são eficazes se actuarem durante 18 a 24 minutos. O peróxido de hidrogénio elimina a infectividade dos oocistos ao actuar durante 5 a 10 minutos à temperatura ambiente (Mora, 1999).

#### **7.4. Patologia e Patogenia**

As lesões macroscópicas e histológicas são semelhantes a muitas outras provocadas por outros agentes enteropatogénicos, não existindo sinais patognomónicos. Nos ruminantes é comum haver distensão intestinal com gás, contendo material amarelo, mucóide ou aquoso, além de outros sinais inespecíficos, tais como mucosa congestionada, enterite e colite (Kirkpatrick, 1995; I. Pereira da Fonseca, 2001).

Observações histopatológicas revelam atrofia (com encurtamento e fusão) das vilosidades, infiltração da *lamina propria* com células mononucleares ou neutrófilos. O epitélio da mucosa pode surgir com descamação e alguma metaplasia com células epiteliais cubóides.

A porção distal do intestino delgado, por ser a área mais infectada, é também a mais afectada. Também podem ser encontradas áreas de grande infecção no intestino grosso.

A invasão do parasita vai provocar a ruptura do equilíbrio entre a absorção e secreção intestinal. A destruição dos enterócitos leva à atrofia das vilosidades e diminuição das enzimas digestivas presentes na mucosa, originando hiperplasia das criptas com consequente má absorção e má digestão de água e nutrientes. Para além disto, há também uma alteração na permeabilidade do epitélio intestinal, devido a alterações nos pontos de união celular. Mora, Bautista e Vazquez (1999) mencionam que a activação de diversos mediadores da inflamação celular (bradiquininas e prostaglandinas), tem sido relacionada

com a resposta hipersecretora no intestino, assim como o efeito dos sais biliares no cólon, que ao serem absorvidos no íleo, poderão danificar o epitélio do cólon e estimular a secreção de fluidos e electrólitos por activação do AMP cíclico.

A patogenia é mediada pelo excesso de secreção de fluido no lúmen intestinal e incapacidade do cólon em reabsorver água adequadamente, má-absorção por diminuição da área de superfície e má-digestão por alteração das enzimas digestivas no epitélio intestinal.

Ainda não está bem esclarecido se as alterações da mucosa e as alterações bioquímicas são o resultado de factores derivados do parasita, ou da reacção imunológica do hospedeiro (ou combinação dos dois). Tzipori e Ward (2002) mencionam que apesar dos factores imunitários que contribuem para a recuperação dos hospedeiros imunocompetentes não estarem completamente compreendidos, a presença de uma quantidade óptima de linfócitos T CD4 em circulação ou presentes na mucosa intestinal assim como de INF- $\gamma$  (interferão *gamma*) desempenham um papel importante na eliminação do parasita.

## **7.5. Sinais clínicos e sintomas**

### **7.5.1. Nos Bovinos**

Os principais sinais da criptosporidiose são os de enterocolite, sendo os mais conhecidos: diarreia, aumento da frequência de defecação, tenesmo, anorexia, perda de peso e depressão. Em certos casos verifica-se desidratação e a diarreia é descrita como profusa, de cor amarela e aquosa. A consistência das fezes varia entre consistência normal a casos de diarreia profusa com fezes aquosas. Comparativamente a outras infecções que provocam diarreia, a alta mortalidade não é comum na Criptosporidiose, mas se as condições ambientais forem adversas e o manejo inadequado, poderão surgir surtos de elevada mortalidade (Mora, 1999).

Os sinais não são patognomónicos, sendo impossível diferenciar a criptosporidiose de outros agentes enteropatogénicos. É bastante comum haver infecções concomitantes com outros agentes enteropatogénicos (por exemplo, Rotavírus, Coronavírus), tornando a diarreia mais severa e muitas vezes caracterizada por emaciação e morte (Merck & Co., 2005b)

Os bovinos jovens são os mais afectados, visto que o colostro não é eficaz contra a infecção e na maioria dos casos, a diarreia é auto-limitante. Nos adultos, a criptosporidiose geralmente é assintomática e estes animais libertam oocistos para o ambiente durante toda a vida (Anderson, 1998).

Nas infecções naturais, o aparecimento dos sintomas e a eliminação dos oocistos começa na 1ª ou 2ª semana de vida. A duração da diarreia tende a prolongar-se por mais alguns dias em comparação com as diarreias causadas por Rotavírus, Coronavírus ou *Escherichia*

*coli* enterotoxinogénica. Estas, podem ocorrer na mesma altura que ocorre a criptosporidiose, mas apresentam um período de duração mais curto. Casos de diarreia viral que não seja complicada por outros agentes patogénicos, normalmente persistem por três dias a alguns dias, e é comum haver uma boa resposta à fluidoterapia e a terapia electrolítica, quando implementada durante alguns dias. A enorme perda de fluidos devido a diarreia provocada por *E. Coli* enterotoxinogénica leva à rápida depressão e recumbência dos animais, onde o choque hipovolémico e consequente morte podem ocorrer em 12 a 24 horas (Merck & Co., 2005b).

#### 7.5.2. No Homem

O período de incubação da criptosporidiose é de 7 a 10 dias após a ingestão dos oocistos. Nos imunocompetentes, o processo é auto-limitante, manifestando-se sob a forma de diarreia aguda com duração de três a sete dias. Os sintomas mais frequentes são náuseas, febre, dor abdominal e diarreia com elevada frequência de defecção (duas a 10 vezes por dia) (Tapia et al., 2006). A duração e a severidade dos sintomas dependem da acção combinada de vários factores relacionados com o hospedeiro (como por exemplo: idade, situação imunológica e dose infectante do parasita) e com o parasita (origem, espécie/genótipo) (Tzipori & Ward, 2002). As fezes contêm pouca matéria fecal, sendo principalmente constituídas por água e muco e muito raramente sangue e leucócitos. Nos imunodeprimidos, o estado imunitário do paciente vai influenciar a duração e a gravidade da infecção, podendo ser assintomática ou manifestar-se como diarreia aguda, intermitente ou crónica, que poderá levar à morte em pacientes gravemente imunodeprimidos. A presença da infecção está directamente relacionada com a deficiência em linfócitos (< 150/ml) e a actividade dos linfócitos CD4+. Assim, em doentes com SIDA, ou sujeitos a imunossupressão, o quadro clínico torna-se mais severo e prolongado, acompanhado de má-absorção e desidratação grave, com uma frequência de defecação muito elevada (5 a 20 por dia) (A. M. Tapia, Álamo, García, & Casanova, 2006; Tzipori & Ward, 2002). Nestes pacientes, a espécie *C. parvum* pode produzir infecções extraintestinais, afectando, entre outros, o trato respiratório, o pâncreas, fígado e vesícula biliar (A. M. Tapia, Álamo, C. F., García, C. L., Casanova, P. M. , n.d.).

### 7.6. Imunidade

Nos ruminantes, a receptividade à criptosporidiose vai diminuindo à medida que a idade aumenta, sendo os vitelos até às três semanas de idade, os animais que apresentam um quadro clínico mais grave. Verifica-se uma diminuição dos sinais nos animais a partir de um mês de idade.

Nos ruminantes recém-nascidos, a protecção contra agentes enteropatogénicos durante os primeiros dias de vida é mediada localmente por anticorpos colostrais e depois por

anticorpos séricos derivados do colostro, que são secretados para o lúmen intestinal durante o primeiro mês de vida (Riggs, 2002).

O colostro normal é incapaz de proteger os vitelos recém-nascidos contra a infecção. No entanto, utilização de colostro hiperimune, produzido por hiperimunização das mães (através da sua exposição a oocistos/espoozoítos), com altos títulos de anticorpos contra antigénios de *Cryptosporidium* tem influência na redução do número de oocistos excretados e na diminuição do período da diarreia (R. Fayer, Andrews, Ungar, & Blagburn, 1989).

Os anticorpos do tipo IgG, IgM e IgA são os principais envolvidos na imunidade humoral e podem desempenhar um papel importante na protecção contra a reinfeção. O papel destes anticorpos ainda não está totalmente esclarecido embora esteja comprovada a existência de um aumento da resposta secretora, principalmente de IgA no intestino de borregos e vitelos, onde o máximo desta resposta coincide com a diminuição da eliminação de oocistos (Riggs, 1997).

Na imunidade celular, as células T CD4+ e T CD8+, mediadas por diversas citocinas, as quais se destacam pelo seu papel o INF(interferão)- $\gamma$  e a IL (interleucina)-12, têm uma importância central na resistência e na recuperação da infecção (Gookin, Nordone, & Argenzio, 2002)

As células “natural killers” (NK) são um componente importante na resistência inata à infecção. Respostas inespecíficas de granulócitos, macrófagos e outras células inflamatórias, bem como a produção de óxido nítrico (NO) e expressão de mediadores pró-inflamatórios (como por exemplo, TNF(factor de necrose tumoral)- $\alpha$  e IL-8 apresentam igualmente um importante papel no desempenho da resposta inata (Gookin, Nordone, & Argenzio, 2002).

Factores não imunes tais como a idade, o estado nutricional, a presença de infecções intercorrentes, o efeito barreira do muco intestinal e a presença de uma flora intestinal madura estão incluídos na resposta do hospedeiro à doença (I. Pereira da Fonseca, 2000).

## **7.7. Diagnóstico**

O diagnóstico fundamentado na clínica, não é suficiente, uma vez que os sintomas da criptosporidiose são inespecíficos podendo ser atribuídos a diversas doenças. O diagnóstico laboratorial é a única forma de identificar o agente, sendo utilizadas diversas técnicas.

Os métodos convencionais de diagnóstico baseiam-se na detecção de oocistos nas fezes (esfregaços) e incluem a concentração e a coloração diferencial.

O recurso à centrifugação e a técnicas de concentração de oocistos, com o objectivo de facilitar a sua recuperação estão geralmente associados às técnicas de diagnóstico. Técnicas de sedimentação e flutuação, utilizando por exemplo soluções de formalina acetato de etilo, de formalina-éter ou açucaradas, foram desenvolvidas para aumentar a

concentração e a recuperação de oocistos em amostras de grandes volumes. Contrariamente ao que se podia pensar, por vezes há diminuição da sensibilidade do diagnóstico, por se perderam muitos oocistos durante o processo de concentração. Weber et al. (1991) concluíram que muitos dos oocistos ficam presos nas malhas da gaze utilizada para a filtração das amostras (após centrifugação), no método de concentração de Ritchie modificado (Young, Bullock, Melvin, & Spruill, 1979), originando perdas significativas de oocistos.

Os corantes mais usados são aqueles que utilizam as propriedades álcool-ácido-resistentes dos oocistos - safranina-azul de metileno, Ziehl-Neelsen modificado ou Kinyoun, bem como colorações com fluorocromos, onde se utilizam associações de auramina, mepramina, acridina. Os oocistos aparecem com uma cor vermelha num fundo contrastado. Na coloração de Ziehl-Nielsen modificada, os oocistos apresentam-se como estruturas circulares, medindo entre quatro a cinco micrómetros de diâmetro. O seu interior varia entre uma massa amorfa, até formas esporuladas (os esporozoítos) em forma de quarto crescente, coradas em tons de vermelho (Casemore, 1991). A coloração diferencial, tem a desvantagem de ser uma técnica demorada e apresentar especificidades e sensibilidades variadas, bem como a necessidade de um microscopista experiente de modo a evitar erros de identificação. Nem todos os oocistos excretados apresentam álcool-ácido-resistência, podendo surgir alterações de coloração em função da idade, da viabilidade e do estágio de desenvolvimento dos oocistos. O aparecimento nas fezes de substâncias fibrosas ou outras partículas de tamanho semelhante, também com propriedades álcool-ácido-resistentes, interferem na identificação correcta dos oocistos.

As técnicas de coloração negativas com nigrosina, verde brilhante, verde malaquite e merbromida, entre outros, têm a vantagem de permitir fazer a distinção dos oocistos das bactérias e das leveduras que ficam tapadas com a cor de fundo (R. Fayer, Morgan, & Upton, 2000).

As técnicas histológicas usam sobretudo o Giemsa e a hematoxilina-eosina para corar os tecidos, permitindo a detecção de estádios endógenos de desenvolvimento do parasita. A constituição de certos tecidos, fluidos ou produtos de raspagem, dificultam a detecção destes estádios endógenos, recorrendo-se ao uso de corantes com anticorpos monoclonais, microscopia de contraste de fase ou à microscopia electrónica (I. Pereira da Fonseca, 2000). Técnicas imunológicas têm vindo a ser desenvolvidas para a detecção da criptosporidiose, sendo estas mais sensíveis e específicas do que as de microscopia convencional. No diagnóstico serológico destaca-se a técnica imunoenzimáticas (EIA) ELISA pela sua importância em termos epidemiológicos, uma vez que permite a identificação de indivíduos sãos, mas portadores da doença, com a desvantagem de um resultado positivo poder indicar uma exposição anterior ao criptosporídeo. Esta técnica é também utilizada no coprodiagnóstico com sensibilidade de 82,3% e especificidade de 96,7%(Ungar, 1990).

Existem no mercado vários “kits”, usando anticorpos mono e policlonais, para a detecção de oocistos nas fezes e também na água.

A imunofluorescência directa ou indirecta, usando anticorpos monoclonais (AcMc)I com fluoresceína, tem sido amplamente aplicada para a detecção de oocistos nas fezes, água ou em triturados de tecidos animais (Tee, Moody, Cooke, & Chiodini, 1993). Tee et al. (1993) observaram que existe uma maior sensibilidade das técnicas que empregam anticorpos monoclonais comparativamente a outros métodos de rotina.

Foram desenvolvidas por alguns investigadores, técnicas de aglutinação – reacção de aglutinação em látex e hemaglutinação reversa passiva (RPH) – para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes e no intestino (Farrington, Winters, Walker, Miller, & Rubenstein, 1994; Pohjola, Neuvonen, Niskanen, & Rantama, 1986).

As técnicas de biologia molecular, pela sua complexidade e também pela presença de inibidores nas fezes, são inapropriadas para o diagnóstico clínico. No entanto, são as mais sensíveis (detectam 1-10 oocistos/g de fezes) e específicas de todas as técnicas e actualmente as que mais se utilizam são a PCR (“Polimerase Chain Reaction”- reacção em cadeia da polimerase) e PCR – RFLP (PCR – “Restriction fragments length polymorphism” i.e. PCR – polimorfismo na dimensão de fragmentos de restrição). Estas técnicas permitem identificar espécies e génotipos, analisar lotes de amostras de uma só vez, analisar tecidos, realizar estudos retrospectivos de resultados arquivados, e sobretudo caracterizar surtos epidémicos (Morgan et al., 1998; A. M. Tapia et al., 2006). Têm a desvantagem de apresentarem muitos falsos negativos derivados, por exemplo, da contaminação da amostra e da presença de microrganismos não viáveis (R. Fayer, Morgan et al., 2000).

O risco inerente ao consumo de água contaminada por *Cryptosporidium*, levou ao desenvolvimento de metodologias para identificar e controlar este perigo. A água tem de passar por uma operação de concentração, usando métodos como a centrifugação em fluxo contínuo, floculação pelo carbonato de cálcio ou técnicas de filtração com filtros de propileno ou policarbonato, seguida de eluição e por vezes sedimentação. Outras técnicas de filtração são as de fluxo cruzado e de fluxo em vortex. Posteriormente, os oocistos concentrados são separados de microrganismos ou detritos por técnicas de flutuação ou centrifugação em gradientes de densidade, citometria de fluxo ou separação imunogamética (IMS).

A recuperação dos oocistos é afectada por diversos factores, tais como a turbulência ou propriedades físico-químicas da água, reacção de anticorpos com outros microrganismos, perdas durante a centrifugação e/ou filtração.

Os métodos de detecção mais convencionais são baseados na microscopia recorrendo a métodos químicos e imunológicos, como a imunofluorescência. Esta técnica utiliza AcMcI marcados com fluoresceína. A incapacidade de distinção entre espécies de *Cryptosporidium* inofensivas para a saúde pública e *C. parvum* e de distinguir os oocistos vivos dos mortos, são as principais condicionantes destes métodos.

As técnicas de biologia molecular são mais vantajosas relativamente às microscópicas, pela sua maior sensibilidade, possibilidade de tipagem epidemiológica, de análise de muitas amostras em simultâneo e capacidade em determinar a infectividade e viabilidade dos oocistos. A PCR, a PCR – transcrição reversa (RT-PCR), a PCR – RFLP, a cultura de células combinada com PCR (CC – PCR), a hibridização com sondas de oligonucleótidos, hibridação fluorescente *in situ* (FISH), entre outros, são alguns exemplos (R. Fayer, Morgan et al., 2000).

## **7.8. Terapêutica**

### **7.8.1. Nos Bovinos**

Numerosos antiprotozoários e antimicrobianos têm sido experimentados no tratamento específico contra a criptosporidiose sem que nenhum deles tivesse tido o efeito desejado. A razão desta resistência não é conhecida, mas a localização intracelular do parasita no hospedeiro, actua como uma barreira à entrada dos fármacos. As diversas membranas apicais que envolvem o órgão de nutrição deste protozoário têm também um papel nocivo na penetração e na actuação dos fármacos (Tzipori & Griffiths, 1998; Tzipori & Ward, 2002). Drogas como o decoquinato e o sulfato de paramomicina (aminoglicósido) diminuem a excreção de oocistos e melhoram os sinais clínicos da doença (diminuição da frequência e severidade da diarreia) (de Graaf, Vanopdenbosch, Ortega-Mora, Abbassi, & Peeters, 1999; Grinberg et al., 2002). O lactato de halofuginona, um anticoccídico que tem sido utilizado no controlo da coccidiose das aves, foi indicado para a prevenção da criptosporidiose bovina por ter sido demonstrada a sua eficácia na redução da prevalência e intensidade da excreção de oocistos e da severidade dos sinais clínicos (Joachim, Krull, Schwarzkopf, & Dauschies, 2003).

Em Portugal, Martins et al. (2007), demonstraram uma diminuição da excreção de oocistos ao 7º dia e 14º dia num grupo de vitelos tratados com lactato de halofuginona (Halocur®) após a administração de uma dose diária de 120 µg/kg de peso vivo durante 7 dias, comparativamente ao grupo controlo onde houve aumento da excreção de oocistos. Num estudo realizado com 31 vitelos no Canadá, nos 15 animais tratados com lactato de halofuginona (0,1 mg/kg/dia) durante os primeiros sete dias de vida, a excreção de oocistos foi 70% menor, comparativamente ao grupo tratado com placebo (16 vitelos), havendo um atraso de 3,1 dias na incidência de diarreia entre os animais tratados com lactato de halofuginona. Nos vitelos tratados com este fármaco, não ocorreu excreção de oocistos até às duas semanas de vida, enquanto que 12,5% dos vitelos do grupo placebo iniciaram a excreção na primeira semana de vida (Jarvie et al., 2005).

A aminosidina e a nitazoxanida demonstram-se eficazes contra *C. parvum* (Rossignol et al., 1998) e o lasalocid (antibiótico ionóforo) foi recomendado sempre que a terapêutica sintomática convencional falhasse (Luginbühl, 1996).

Os animais afectados deverão ter tratamento de suporte, com fluidos e electrólitos, ambos oral ou parenteralmente, para corrigir a desidratação provocada pela diarreia aguda até que se dê a recuperação espontânea. Em casos de diarreia severa, para além da fluidoterapia, a associação de adsorventes (caulino) e anti-espasmódicos pode ser vantajoso. A nutrição parenteral pode ser considerada para o tratamento de animais valiosos. Para otimizar a digestão e minimizar a perda de peso corporal deverá ser dado leite inteiro de vaca aos vitelos, em pequenas quantidades e várias vezes ao dia e de modo insistente, pois pouco tempo de inapetência é o suficiente para levar um vitelo com diarreia à morte (Radostits, 2007b).

#### 7.8.2. Nos humanos

Terapêutica antiretroviral, em pacientes com SIDA demonstrou melhoria dos sintomas, bem como redução na excreção de oocistos (Tzipori & Ward, 2002). A paramomicina, a azitromicina, o colostro de bovino hiperimune, diclazuril, furazolidona, entre outros, pode desempenhar um papel importante nos doentes imunodeprimidos, melhorando os sintomas ou a resolução aparente da infecção por *C. parvum* (I. Pereira da Fonseca, 2000). Estudos *in vivo* em ratinhos demonstraram que os probióticos podem inibir a infecção através da produção de substâncias nocivas para o desenvolvimento do parasita e, possivelmente oferecer novas medidas terapêuticas para a criptosporidiose. Foster, Matthew, Courtney e Ward (2003) viram reduzida a viabilidade de oocistos de *C. parvum* em mais de 80% e entre 10-37% na presença de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (derivados do intestino humano) respectivamente.

### 7.9. Profilaxia e Controlo

Perante o carácter zoonótico da criptosporidiose e a forte resistência das formas infectantes (oocistos esporulados) no ambiente, a prevenção tem como objectivo minimizar a eliminação de oocistos nas fezes dos animais e/ou a sua transmissão entre eles.

Vitelos imunocompetentes infectados por *Cryptosporidium* spp. conseguem resolver a infecção em cerca de duas semanas e tornam-se resistentes a novas infecções, o que sugere a necessidade de uma resposta imunitária adquirida específica para debelar a infecção (Abrahamsen, 1998).

As boas práticas de manejo são um ponto fulcral para o controlo da doença nas explorações, especialmente se o sistema de produção for intensivo. As medidas higiénicas preventivas, têm como objectivo a destruição dos oocistos do parasita (forma infectante) e a prevenção da sua transmissão entre animais e/ou do ambiente para o hospedeiro (Angus,

1990). São recomendadas as seguintes medidas profiláticas: o nascimento dos animais em ambiente limpo, fornecimento de colostro suficiente aos animais recém-nascidos nas primeiras horas de vida, separação dos animais saudáveis dos doentes, especial atenção à transmissão mecânica da infecção pelo tratador destes animais, prevenir o acesso a roedores e outros animais às explorações e aos armazéns de alimentos, sistema “all-in”/ “all-out”, medidas higiénicas e de protecção do pessoal (Casey, 1991; Lima, 2004).

O colostro bovino hiperimune é capaz de reduzir a severidade da diarreia e o período de excreção de oocistos em vitelos infectados experimentalmente. Esta protecção não está directamente relacionada com os títulos de anticorpos circulantes mas com a presença de elevados títulos de anticorpos específicos anti-criptosporídio no lúmen intestinal durante longos períodos.

A utilização de vacinas tem sido proposta como método de controlo da criptosporidiose nas populações animais, embora as existentes não sejam totalmente eficazes. A produção de vacinas terá de ser baseada na premissa de que a resposta celular do tipo Th2 é a responsável pela eliminação do parasita e pela protecção contra a reinfeccção (Olson et al., 2004). Uma vacina obtida por liofilização de oocistos de *C. parvum* administrada oralmente após o nascimento promoveu protecção parcial (diminuição dos sinais clínicos e da excreção de oocistos) contra a infecção experimental em animais com uma semana de idade. A protecção que esta vacina conferiu contra a infecção natural, não se mostrou suficiente. A possibilidade de uma exposição muito precoce dos animais aos oocistos (nas primeiras horas após o nascimento) em vez de uma semana depois, como na experiência, poderá ter impossibilitado o desenvolvimento de uma resposta imunitária (Harp, 1998). É necessário que as vacinas proporcionem uma resposta imunitária celular logo nos primeiros dias de vida, para que o controlo da infecção nas explorações seja eficaz.

## 8. Eimeriose

São várias as espécies do género *Eimeria*, reconhecidas como agentes causadores de lesões intestinais em animais de criação, particularmente aves, coelhos e ruminantes. O género *Eimeria* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, sub-classe Coccidia, subordem Eimeriina e família Eimeriidae (Argüello, 1999).

Estão descritas mais de 20 espécies distintas de *Eimeria* (Quigley, 2001), e actualmente reconhecem-se 12 espécies válidas nos bovinos na Europa com uma grande variação no que respeita à virulência de cada uma delas. Sob o ponto de vista clínico, as espécies *E. bovis*, *E. zuernii* e *E. alabamensis* são as mais importantes a nível mundial, cujas duas primeiras são as mais patogénicas, podendo causar enterite de moderada a severa ou mesmo letal em vitelos. As outras espécies são consideradas menos virulentas (por exemplo, *E. alabamensis*, *E. ellipsoidalis*) ou raramente associadas com a doença clínica. A espécie *E. alabamensis* tem sido demonstrada de grande importância clínica no seguimento

de mudança para pastagens contaminadas e a *E. ellipsoidalis* pode também causar diarreia (Daugschies & Najdrowski, 2005).

**Tabela 5** – Principais características morfológicas dos oocistos das espécies de *Eimeria* mais importantes em bovinos

Espécies	Dimensões (µm)	Forma	Parede	Esporulação (dias) à temp. Ambiente
<i>E. bovis</i>	23-24 x 17-23 (28 x 20)	Subesféricos alongados	Incolor Micrópilo pouco visível	2-3
<i>E. zuernii</i>	15-22 x 13-18 (18 x 16)	Subesféricos	Incolor Sem micrópilo	2-3
<i>E. alabamensis</i>	13-24 x 11-16 (19 x 13)	Ovóides Piriformes	Incolor Sem micrópilo	4-5
<i>E.ellipsoidalis</i>	20-26 x 13-17 (23 x 16)	Elipsoidais	Incolor Sem micrópilo	3

(Argüello, 1999; BayerHealthCare, 2007)

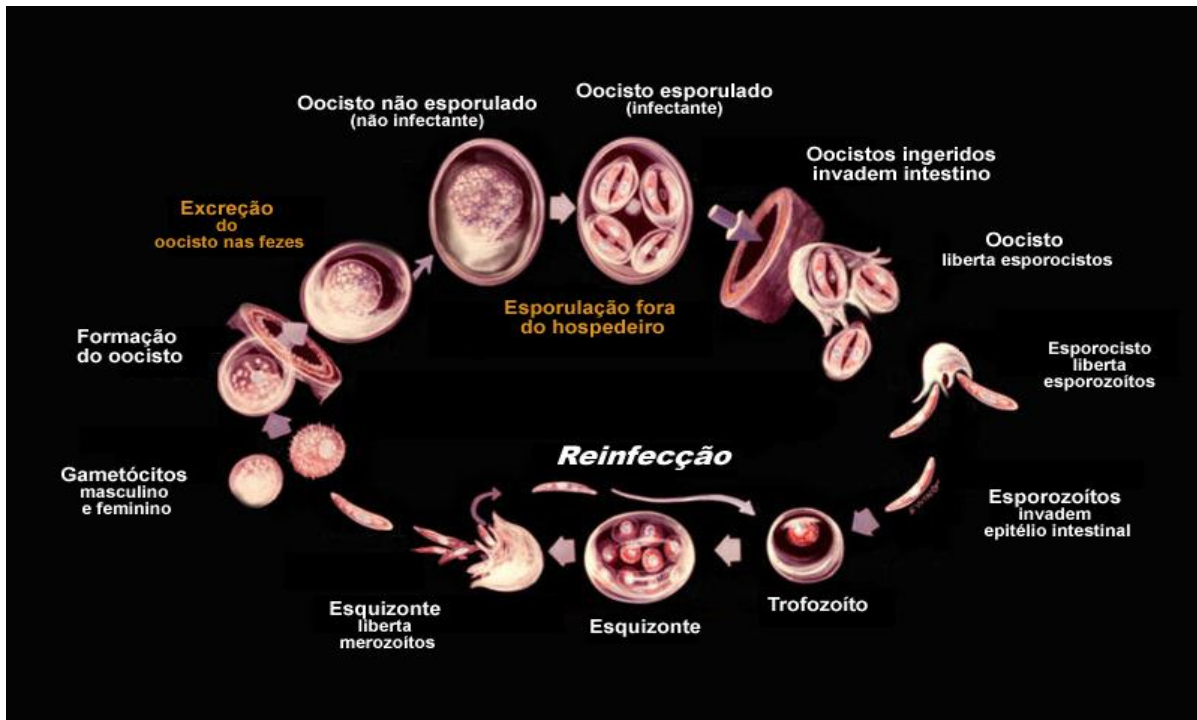
### 8.1. Ciclo Biológico

As coccídias apresentam um complexo ciclo biológico constituído por uma etapa de multiplicação assexuada e outra sexuada, ocorrendo simultaneamente em células hospedeiras diferentes. São parasitas intracelulares obrigatórios de um hospedeiro específico, sendo o oocisto a única forma que ocorre fora do hospedeiro.

A multiplicação sexuada culmina com a formação de oocistos, os quais são libertados nas fezes na forma não esporulada. Mediante condições favoráveis de oxigenação, humidade e temperatura, os oocistos esporulam e tornam-se infectantes (Quigley, 2001). Durante este processo de maturação, o esporoblasto transforma-se em quatro esporocistos contendo cada um deles dois esporozoítos (Merck & Co., 2005a).

Quando os animais ingerem os oocistos esporulados, os esporozoítos são libertados pela acção da bÍlis e tripsina e invadem as células da mucosa intestinal. No seu interior crescem formando o vacúolo parasitóforo e, dentro dele, o esporozoÍto transforma-se em trofozoÍto. Este divide-se assexuadamente (esquizogonia) e forma o esquizonte, que contém no seu interior, um grande número de merozoÍtos. Após ruptura da célula hospedeira, os merozoÍtos invadem novas células e repetem o processo.

**Figura 8** – Representação esquemática do ciclo biológico de *Eimeria* spp. (adaptado de <http://en.wikipedia.org/wiki/Eimeria>)



A 1ª geração de esquizontes apresenta um tamanho maior contendo milhares de merozoítos que vão invadir novas células formando uma 2ª geração de esquizontes, de menor tamanho e com uma menor quantidade de merozoítos (Argüello, 1999). Para a maioria das espécies, o número de gerações de esquizontes intracelulares é, por norma constante, sendo de dois ou três o limite de gerações (Jonstone, 2000).

Os merozoítos libertados nesta 2ª geração invadem novas células hospedeiras e originam as formas sexuais (gametogonia), os gametócitos ou gamontes. A gametogonia é a fase do ciclo que coincide com o início dos sintomas.

O gamonte feminino, aumenta de tamanho, armazena alimento e induz hipertrofia do citoplasma e do núcleo da célula hospedeira, dando origem ao chamado macrogamonte. O gamonte masculino, através de múltiplas divisões nucleares, torna-se multinucleado e cada núcleo é incorporado num microgamonte flagelado (Jonstone, 2000).

A conjugação dos gâmetas origina um zigoto rodeado de uma forte membrana, formando-se o oocisto que vai ser libertado através das fezes, iniciando novamente o ciclo.

8.1.1. Características particulares do ciclo biológico e da patogenezidade das espécies mais importantes de *Eimeria* em bovinos:

Existem provas de o ciclo de certas espécies de *Eimeria*, ser mais complicado do que o descrito anteriormente. Alguns merozoítos, ao abandonarem as células epiteliais podem penetrar noutras células do intestino ou noutros tecidos adjacentes.

***E. bovis*** – é altamente patogénica. As fases assexuadas desenvolvem-se no intestino delgado, com duas gerações de esquizontes, cujos merozoítos presentes no seu interior, provocam a distorção e ruptura das vilosidades. As fases sexuais têm lugar na porção terminal do íleo, ceco e cólon, sendo as responsáveis pela patogenia. O período pré-patente é de 19-22 dias e o patente de 5-26 dias.

***E. zuernii*** – é a mais comum e muito patogénica. Apresenta duas esquizogonias no seu ciclo endógeno, onde a primeira desenvolve-se no íleo e a segunda no ceco e no cólon. As fases sexuadas ocorrem na parte mais posterior do intestino delgado, ceco, cólon e recto. O período pré-patente é de 12-19 dias e o período patente é de 11 dias.

***E. alabamensis*** – apesar de ser considerada uma espécie pouco patogénica, tem sido descrita como sendo capaz de desenvolver coccidiose clínica em animais de pastoreio quando severamente infectados (Dedrickson, 2003). É um parasita intranuclear e crê-se que haja mais do que uma geração de esquizontes. Os esporozoítos penetram no núcleo das células epiteliais das extremidades das vilosidades, e aos 2-8 dias observam-se esquizontes, cada um deles contendo 16 a 32 merozoítos. As fases sexuadas têm lugar no terço posterior do intestino delgado, podendo estender-se ao ceco e cólon nas infecções mais extensas. Tem um período pré-patente de 6-11 dias e um período patente de 13 dias.

***E. ellipsoidalis*** – é moderadamente patogénica. Os esquizontes, com 24 a 26 merozoítos formam-se nas células das criptas do íleo e cólon, mas o número de gerações assexuais é desconhecido. Gamontes e oocistos localizam-se na parte posterior do intestino delgado, especialmente no íleo. O período pré-patente é de 10 dias e o patente de 12 dias.

(Argüello, 1999)

## 8.2. Epidemiologia

As espécies de *Eimeria* são parasitas cosmopolitas e estão presentes em todas as explorações e nos mais diversos sistemas de criação.

Em publicações recentes, o nível de infecção em animais adultos reportado na Polónia, Holanda, E.U.A e África do Sul varia entre 16% a 27%, atingindo um máximo de 57% no caso da Turquia (Arslan, 1998; Cornelissen et al., 1995; R. Fayer, Trout, Graczyk, & Lewis, 2000; Matjia, 2002; Pilarczyk, 2000). No Canadá, na região de Alberta, foi realizado um estudo onde das 131 amostras analisadas, 64,2 % continham uma ou mais espécies de *Eimeria* e 45, 2% continham duas ou mais, tendo associado a presença de *E. bovis* e *E. zuernii* aos sinais clínicos de coccidiose (diarreia severa, disenteria ou tenesmo) (Kennedy & Kralka, 1987). Um estudo multicêntrico aponta valores que variam entre 47% e 100% de explorações positivas na Holanda e França respectivamente. Os valores de *E. bovis* variam entre os 6 e os 38% e de *E. zuernii* entre 2 e 48%. O mesmo estudo revelou em Portugal (33 explorações e 320 animais) a presença de coccídias em 61% (20/33) das explorações. Nestas, dos animais infectados com coccídias, 12,2% estavam infectados com *E. bovis* e 7,2% com *E. zuernii*. Nos Açores verificou-se uma maior predominância de *E.bovis* e no Centro/Sul de Portugal continental verificou-se uma maior predominância de *E. zuernii* (Bushan, 2006).

A coccidiose bovina ocorre principalmente em animais jovens com idades entre 3 semanas e os 6 meses e tem incidência sazonal. A via de infecção é a ingestão de oocistos esporulados. Os oocistos são excretados nas fezes dos animais afectados na forma não esporulada e, sob condições ideais de temperatura e de humidade no ambiente, esporulam. A humidade elevada (70 a 80%) e temperaturas moderadas (entre os 15 e os 27°C) favorecem a esporulação e, os oocistos, podem sobreviver durante vários meses a temperaturas compreendidas de -5 a -8 °C. Temperaturas elevadas (>40°C), a dessecação, ou temperaturas muito baixas (-25° a -19°C) inibem a esporulação (Argüello, 1999; Dauschies & Najdrowski, 2005)

Os bovinos adultos geralmente comportam-se como portadores assintomáticos, estando protegidos por imunidade adquirida em exposições anteriores. Contudo, podem eliminar uma pequena quantidade de oocistos para o ambiente tornando-se numa fonte de infecção para os vitelos. A prevalência em vacas pode ir até 36% e foi relatado o aumento de eliminação de oocistos no período do peri-parto e do pós-parto (Faber, 2002).

O sistema de produção é um factor que influi directamente sobre as características da coccidiose. A elevada densidade populacional nas explorações intensivas, facilita a transmissão da doença, havendo uma grande acumulação de oocistos libertados. As instalações e utensílios usados para a criação de animais (por exemplo bebedouros e/ou manjedouras próximas do chão, facilmente contamináveis com fezes) têm grande importância na epidemiologia da doença. O tipo de alojamento dos animais (por exemplo,

parques comuns) e a falta de higiene das explorações aumentam o risco do aparecimento da coccidiose (Lima, 2004).

O clima e a estação do ano têm uma menor influência sobre a prevalência da eimeriose, comparativamente ao manejo dos animais. Os Verões secos e quentes, assim como a luz solar directa são prejudiciais. Carneiro, Campos, Linhares e Rodrigues (1988) observaram uma maior quantidade de oocistos por grama de fezes em bezerros cruzados, no período seco do ano, atribuindo este facto a uma maior aglomeração dos animais em pequenas áreas com pastagens baixas, levando a uma maior ingestão de oocistos.

No norte dos Estados Unidos e no Canadá, durante os meses de Inverno, é comum o aparecimento de surtos de coccidiose, por *E. zuernii* nas explorações (*winter coccidiosis*) associada ao facto de os animais estarem permanentemente estabulados, na maioria das vezes em grupos. As temperaturas exteriores durante os meses de Janeiro, Fevereiro e Março atingem durante dias consecutivos, valores entre -40°C e -10° C, demasiado baixas para que ocorra a esporulação dos oocistos. As camas, o pêlo dos animais e as quantidades de águas residuais presentes nas irregularidades do piso, proporcionam as condições necessárias de temperatura e humidade para esporulação dos oocistos viáveis presentes no pasto e nas fezes.

As coccídias, podem eliminar milhões de oocistos diariamente, durante o período pré-patente, mantendo-se infectantes durante meses ou mesmo mais de um ano à temperatura de 4°C. Assim, o risco de infecção aumenta rapidamente junto dos vitelos, devido ao alto potencial reprodutivo das espécies de *Eimeria*. A longa permanência do parasita nas explorações leva à contaminação dos pastos, explicando o facto de surgirem casos de doença quando os animais se alimentam de pasto (Argüello, 1999).

O desmame é uma altura crítica para o surgimento da doença. Para além da alteração na alimentação, os animais são na maioria das vezes agrupados tendo de passar por lutas hierárquicas entre eles. Factores de stress ambiental (frio, humidade, calor), fisiológico e social, são considerados imunodepressores e podem precipitar infecções latentes presentes nas explorações.

A forma nervosa da coccidiose, provocada por *E. zuernii* (Fanelli, 1983) é comum no Canadá e norte dos Estados Unidos, ocorrendo com maior frequência durante ou após um período de frio severo no Inverno, onde 30-50% do total de animais susceptíveis estão afectados (Radostits, 2007a).

### **8.3. Patologia e patogenia**

A gravidade da doença está dependente do número de oocistos ingeridos. A ingestão de uma pequena quantidade de oocistos leva ao desenvolvimento de imunidade sem o aparecimento de sinais clínicos de doença. As várias espécies têm hospedeiros específicos

e não existe imunidade cruzada entre elas. Usualmente, os animais estão infectados com várias espécies de coccídias e raramente por uma única espécie (Argüello, 1999; Dauschies & Najdrowski, 2005; Lima, 2004). A severidade da doença está também, dependente da patogenicidade das espécies envolvidas ou da potenciação da patogenicidade de certas espécies inofensivas quando associadas a outras mais ou menos patogénicas. Assim, o efeito de uma infecção por coccídias pode ser exacerbado se diferentes espécies afectam diferentes partes do intestino ao mesmo tempo. De igual modo, infecções concorrentes com outras doenças ou agentes, como helmintes, bactérias, e vírus podem contribuir para o aumento da severidade da doença. Nos verdadeiros surtos de coccidiose, as espécies que predominam são as mais patogénicas, *E. bovis* e/ou *E. zuernii*, e ocasionalmente *E. alabamensis* (principalmente em animais alimentados com pastagem contaminada). Marshall, Catchpole, Green e Webster (1998) observaram o início da excreção de oocistos de várias espécies de *Eimeria*, incluindo *E. bovis* e *E. zuernii*, em vitelos com 3 semanas de idade e uma vez que o período pré-patente destas duas espécies é de mais de 2 semanas, conclui-se que a infecção ocorreu imediatamente após o nascimento.

Todos os estádios de desenvolvimento do ciclo de vida das espécies de *Eimeria* têm lugar no intestino, e o início dos sinais clínicos coincide com a gametogonia. A agressão causada pelo parasita que se multiplica rapidamente e as modificações induzidas pelas formas em desenvolvimento provoca alterações no intestino.

A gravidade das lesões depende do grau de agressão tecidual de cada espécie e do número de oocistos esporulados ingeridos. Uma única administração de 50 000 oocistos de *E. bovis*, induz o aparecimento de diarreia, enquanto que 100 000, podem resultar em diarreia hemorrágica grave em vitelos que nunca tenham tido contacto com a doença (Dauschies, Akimaru, & Burger, 1986). A destruição celular intestinal provocada por esta espécie é devida principalmente, aos estádios sexuais que possuem uma enorme capacidade reprodutora, levando ao aparecimento de extensas lesões na mucosa intestinal com consequente desprendimento de fragmentos de mucosa e hemorragias podendo ser visualizados nas fezes restos de tecidos e sangue (Friend & Stockdale, 1980; Lima, 2004).

As células das vilosidades, ao serem destruídas, são substituídas por células provenientes das criptas e das áreas adjacentes. A *lamina propria* contrai-se e reduz o tamanho das vilosidades. A hiperplasia do epitélio das criptas e a atrofia das vilosidades reduz o número de células absorventes, comprometendo a digestão e absorção dos nutrientes. O aumento do tempo de permanência dos alimentos no lúmen intestinal e a diminuição de enzimas digestivas vai favorecer a fermentação bacteriana, com consequente aumento da osmolaridade e passagem de fluidos para o intestino, causando diarreia. A

hipersecreção devido a hiperplasia das criptas pode provocar um aumento de hormonas

inibidoras do apetite no sangue, como a colcistoquinina ou a somatostatina (Nielsen, 1982; Titchen, 1982).

Dependendo da severidade das lesões, a diarreia originada pode variar de tipo catarral a diarreia hemorrágica. Num modelo experimental desenvolvido por Dauschies et al. (1986) a digestibilidade dos nutrientes e balanço de azoto parece não terem sido afectados durante uma infecção por *E. bovis*, exceptuando dois animais com diarreia hemorrágica grave que temporariamente apresentaram uma digestibilidade reduzida de proteína e valores reduzidos de azoto plasmático. Concluiu-se assim, que o facto de a maioria das lesões provocadas pela coccidiose sub-clínica por *E. bovis* estarem localizadas no intestino grosso, não afecta a função digestiva do intestino delgado.

Alterações da concentração de proteínas e electrólitos no plasma sanguíneo são uma consequência da diarreia e geralmente ocorre um aumento do potássio e diminuição do cloro, sódio e proteínas. Uma infecção provocada por  $9,6 \times 10^6$  esporocistos de *E. zuernii* em vitelos demonstrou uma diminuição do sódio plasmático, do cloro, do número de eritrócitos, do volume celular, da hemoglobina e das proteínas plasmáticas. Estas observações reflectem a reduzida absorção de água e minerais e também as perdas de sangue e tecidos pelo intestino grosso afectado. O potássio, os fosfatos, o CO<sub>2</sub>, a glicose, a creatinina, o ácido úrico e o azoto do sangue, não são afectados (Stockdale, 1981).

As perdas de sódio e de potássio nas fezes aumentam durante a infecção clínica, e o sódio plasmático pode diminuir moderadamente. As perdas de água devidas a diarreia são compensadas pela reabsorção de sódio a nível renal bem como pela redução do volume urinário desencadeado por uma resposta hormonal (hormona anti-diurética e aldosterona).

As perdas de peso são particularmente observadas no pico da doença, mantendo-se inclusivamente depois do tratamento. Sartin, Shores, Schwartz, Kemppainen e Baker (2000) reportaram uma diminuição da quantidade de alimento ingerida, por um período de 28 dias. Uma parte desta perda de peso é derivada da síndrome de má absorção e da perda de líquidos, e outra, do incompleto desenvolvimento dos mecanismos reguladores (factores de crescimento), independentemente da anorexia (Heath et al., 1997).

São necessárias entre 6-13 semanas para que o consumo de água e alimento dos animais infectados retomem aos níveis da pré-infecção (Argüello, 1999).

A “coccidiose nervosa”, provocada por *E. zuernii* foi observada na América do Norte (Fanelli, 1983) e a patogénese dos seus sinais clínicos é ainda desconhecida. Várias causas como: a alteração no teor de electrólitos sanguíneos, deficiências em vitamina A e tiamina, envenenamento por chumbo, Urémia, meningoencefalite por *Haemophilus somnus*, hepatopatia, alteração drástica na flora bacteriana intestinal ou severidade da doença clínica, foram sendo descartadas com o aparecimento dos casos. Testes laboratoriais em murganhos, permitiram identificar uma neurotoxina no soro de vitelos com “coccidiose nervosa”, mas o seu significado permanece por esclarecer (Radostits, 2007a).

#### 8.4. Sinais clínicos e sintomas

A coccidiose é uma doença auto-limitante e termina, na maioria dos casos quando a reprodução intestinal do parasita está completa, i.e. quando a excreção de oocistos desaparece. Nos casos naturais da doença, a etiologia é múltipla envolvendo duas ou mais espécies de *Eimeria*.

Os animais jovens são os mais afectados e nestes, a doença é caracterizada por diarreia profusa, desidratação, anorexia, letargia e alta mortalidade (Lima, 2004) . Nos estádios iniciais da doença poderá surgir febre moderada, mas na maioria dos casos a temperatura é normal ou subnormal.

Os primeiros sinais de coccidiose clínica consistem no aparecimento súbito de diarreia com cheiro acre, com muco e sangue. O sangue presente nas fezes pode ser escuro, semelhante ao alcatrão ou podem aparecer laivos de sangue ou coágulos inclusos. A evacuação pode também apenas ser constituída de grandes coágulos ou sangue fresco. Normalmente o períneo e a cauda estão conspurcados de fezes com sangue e a diarreia pode ser acompanhada de tenesmo, podendo evoluir para prolapso rectal (Radostits, 2007a).

A severidade da doença está dependente do número de oocistos esporulados ingeridos. Uma pequena quantidade de oocistos ingeridos pode originar uma infecção subclínica, com evolução discreta, traduzida apenas por um menor desenvolvimento corporal e por vezes anemia crónica.

A primo-infecção de vitelos com grande número de oocistos de *E. zuernii* ou *E. bovis*, pode resultar em diarreias graves com fezes contendo fibrina e tecido intestinal. Por vezes surge tenesmo, anorexia, desidratação, anemia, perda de peso, podendo evoluir para morte. A diarreia hemorrágica pode durar até 36 dias em vitelos (Bohrmann, 1991) e a taxa de mortalidade pode variar ente 7 a 20% (Fox, 1985).

A recuperação de animais gravemente afectados, normalmente torna-os pouco rentáveis, devido a atrasos no crescimento e a uma taxa de conversão deficiente, associado a presença de lesões intestinais permanentes que vão impedir uma correcta digestão e absorção dos alimentos (Lima, 2004). No caso de uma recuperação incompleta, a susceptibilidade a outros agentes patogénicos pode aumentar, piorando o seu estado clínico geral.

A maioria das espécies de *Eimeria*, e a pouca influência das espécies patogénicas, induzem casos subclínicos da doença com diarreias moderadas (Busato et al., 1998; Cornelissen et al., 1995). A diarreia não é necessariamente acompanhada de disenteria, no entanto é comum ocorrer um baixo grau de crescimento dos animais (Radostits, 2007a).

A forma nervosa da doença (“coccidiose nervosa”) consiste no aparecimento de sinais nervosos como, tremores musculares, hiperestesia, convulsões com ventroflexão da cabeça e pescoço e nistagmus em animais com doença clínica aguda. Contrariamente às outras

situações, a mortalidade nestes casos é bastante elevada, podendo atingir valores entre 80 – 90% (Radostits, 2007a)

A coccidiose nos bovinos adultos ocorre muito raramente e é de curta duração, variando entre uma a duas semanas. A mortalidade oscila entre 5 a 20% mas, nos surtos severos pode atingir valores elevados acima dos 50% dos animais infectados. Os animais surgem com diarreia, tenesmo, mucosas pálidas, espessamento e lacerações da parede do recto. A recuperação geralmente é rápida e sem necessidade de recorrer a tratamento (Lima, 2004; Radostits, 2007a).

### **8.5. Imunidade**

A imunidade contra a eimeriose é constituída por ambas as respostas, celular e humoral. A imunidade celular é a mais importante na resistência contra a reinfecção.

Os animais desenvolvem imunidade logo após a primeira vez que ingerem oocistos e assim, nas infecções seguintes não ocorre doença clínica (Daugschies et al., 1986). Svensson, Olofsson e Uggla (1996), após provocarem uma infecção por *E. alabamensis* em vitelos, verificaram que apesar de ter sido desenvolvida imunidade, continuava a haver excreção de uma pequena quantidade de oocistos. O estímulo antigénico, necessário para promover uma resposta imunitária adequada e suficiente para a protecção contra futuras infecções, vai depender da quantidade de oocistos ingeridos, pelo que a exposição a um pequeno ou moderado número de oocistos, pode não ser suficiente para o desenvolvimento de resistência a reinfecções.

Faber et al. (2002) sugeriram que *E. bovis* é mais imunogénica, induzindo uma melhor e mais precoce resposta imunitária do que *E. ellipsoidalis*, podendo ser importante e naturalmente vantajoso porque a *E. bovis* é claramente mais patogénica do que outras espécies de *Eimeria*.

Os anticorpos colostrais, principalmente a IgG1, mas também a IgG2 e a IgM são transferidos para os vitelos após a ingestão de colostro. Faber et al. (2002) verificaram que a acumulação de IgG1 no colostro era acompanhada por um decréscimo da mesma no soro das vacas, indicando a passagem deste isótipo específico para os vitelos através do colostro. A IgG1 é a principal envolvida no combate da primo-infecção comparativamente a IgM, IgG2 e IgA. Existe uma correlação directa e significativa entre o aumento da excreção de oocistos de *E. bovis* e o aumento dos níveis de IgM, IgG2 e IgA medidos 3 semanas (ou mais) após o nascimento, ou seja, estes anticorpos são sintetizados em resposta a infecções adquiridas. De acordo com Faber et al. (2002) a resposta humoral a este parasita baseia-se predominantemente na IgG2. Uma vez que a citoquina que estimula a síntese de IgG2 é o INF- $\gamma$ , foi atribuída uma resposta do tipo 1 à infecção por *E. bovis*. Contudo, apesar

da presença de anticorpos reflectir uma exposição às coccídias, estes não conferem protecção contra a doença (Fiege, Klatte, Kollmann, Zahner, & Burger, 1992).

A imunidade protectora é específica da espécie e é principalmente do tipo celular, podendo falhar sobre a presença de uma elevada quantidade de oocistos infectantes.

Estudos realizados com roedores demonstram o envolvimento das células “natural killers” (NK), responsáveis pela imunidade inata, na síntese INF- $\gamma$  em resposta a infecções precoces com *Eimeria* spp. (Schito & Barta, 1997; Shi, Hirzmann, Dafa'alla, & Zahner, 2001) facto este, que ainda não está totalmente esclarecido em vitelos (Faber, 2002).

Várias observações sugerem que a coccidiose bovina é imunossupressora, aumentando a susceptibilidade dos animais a outras infecções (Radostits, 2007a).

As células T CD4+, e outras células linfóides são particularmente importantes no combate à primo-infecção e podem ser transferidas via colostro para os vitelos (Faber, 2002; Fiege et al., 1992), enquanto que as células T CD8+ citotóxicas actuam especialmente nas reinfecções (Hermosilla, Burger, & Zahner, 1999). Foi demonstrado um aumento da proporcionalidade dos fenótipos periféricos de CD4+, CD8+ e CD2+ durante o período pré-patente de *E. bovis*. No período patente, o fenótipo CD2+ esteve igualmente presente em elevados níveis no sangue periférico, bem como os outros fenótipos, apesar de nem sempre serem significativos (Hermosilla et al., 1999).

Hermosilla et al. (1999) concluíram que infecções por *E. bovis*, resultam numa reacção prolongada das células T a um estímulo antigénico específico mas apesar de activadas, são incapazes de anular o ciclo de vida do parasita. A resposta das células T pode estar correlacionada com o nível e a duração da eliminação de oocistos e podem também interagir com o controlo imunológico de futuras infecções. A actuação das células linfóides CD4+ no controlo da infecção primária poderá reflectir uma resposta do tipo Th1 originando o bloqueio da libertação de NO através do INF- $\gamma$ .

Na coccidiose, os níveis sanguíneos do TNF- $\alpha$  estão diminuídos e acredita-se que esta citocina tem efeitos deletérios sobre o parasita. O estradiol e a progesterona atrasam a diminuição do TNF- $\alpha$  durante a infecção, estimulam a imunidade celular e promovem alguma protecção contra infecção por *E. bovis* (Heath et al., 1997). A monensina e o amprolium bloqueiam o desenvolvimento da doença em vitelos infectados por *E. zuernii* (Radostits, 2007a).

Apesar de ser possível imunizar bovinos artificialmente, a protecção é apenas parcial. A doença clínica pode voltar a aparecer e os bovinos continuam a excretar oocistos em baixa ou em moderada quantidade (Cornelissen et al., 1995; Svensson, Olofsson, & Uggla, 1996).

## 8.6. Diagnóstico

O diagnóstico da coccidiose em ruminantes é feito com base na anamnese, incluindo aumento da observação de casos de diarreia num determinado período, historial da doença na exploração, etc, e na informação relativa ao tipo de manejo, higiene da exploração, sistema de criação, sinais clínicos, entre outros.

Nos casos de fezes hemorrágicas contendo tecidos e fibrina, devem ser sempre consideradas as espécies *E. bovis* e/ou *E. zuernii*. As infecções moderadas ou provocadas por outras espécies de *Eimeria* menos patogénicas podem originar doença sub-clínica, ou então, o tipo de diarreia que ocorre (transitória e clinicamente inespecífica), pode conduzir ao diagnóstico de outros agentes enteropatogénicos.

A detecção de oocistos nas fezes ao microscópio óptico, após concentração recorrendo a técnicas de flutuação convencionais é relativamente fácil, mas não é suficiente para o diagnóstico da doença. Fezes diarreicas muito líquidas ou, no caso de infecções severas por *E. bovis* e/ou *E. zuernii* com eliminação de grandes quantidades de sangue, fibrina ou muco, diminuem a sensibilidade dos exames coprológicos devido a diluição e camuflagem dos oocistos (Daugischies & Najdrowski, 2005). No caso de não serem encontrados oocistos e haver fortes suspeitas da infecção, pode-se tentar a observação dos merozoítos através de esfregaços fecais directos, pois os esquizontes não flutuam nas soluções concentradas convencionais utilizadas para a flutuação dos oocistos (Radostits, 2007a).

A coproscopia quantitativa também apresenta limitações. A simples presença de oocistos nas fezes de animais não permite o diagnóstico de coccidiose, uma vez que a produção de oocistos difere entre as espécies, sendo necessário fazer o diagnóstico específico, considerando os diferentes graus de patogénicidade das diferentes espécies de *Eimeria* e sem nunca esquecer a possibilidade de a infecção ser mista (Cornelissen et al., 1995; Lima, 2004). O diagnóstico específico requer a observação das características morfológicas dos oocistos esporulados; por isso, preparam-se coproculturas de modo a criar condições óptimas, para a esporulação dos oocistos nas fezes. Com alguma experiência, é possível identificar, pelo menos as três espécies mais patogénicas (*E. bovis*, *E. zuernii* e *E. alabamensis*) que infectam os bovinos sem os esporular, e directamente em fezes frescas (BayerHealthCare, 2008)

O período prepatente, durante o qual os oocistos são libertados em maiores quantidades difere consoante a espécie presente envolvida, a idade do animal e o grau de imunidade, tornando-se vantajosa a recolha de fezes de vários animais, a fim de se obter uma verdadeira estimativa da presença de coccidiose num grupo de vitelos (Radostits, 2007a).

Nos bovinos, as principais lesões macroscópicas encontradas na necropsia são congestão, hemorragia, edema e espessamento da mucosa do ceco, cólon, recto e ílio. Nas infecções severas provocadas por *E. bovis*, o lúmen intestinal contém coágulos de sangue e fezes sanguinolentas e a mucosa aparece descamada com pseudomembranas amareladas e

pequenos nódulos puntiformes de cor branco ou cinzento, formados por esquizontes que podem ser visíveis a olho nu.

Histologicamente observa-se descamação e necrose do epitélio das vilosidades, infiltração de linfócitos e leucócitos e podem ser vistos merozoítos no interior das células. As diversas fases de desenvolvimento do parasita podem ser observadas através de esfregaços da mucosa.

A presença de anticorpos anti-eiméria pode ser detectada por métodos serológicos – ELISA e Western Blot – especialmente utilizados para estudos experimentais e epidemiológicos. Estas técnicas não têm fiabilidade suficiente para o diagnóstico de rotina. Nos animais jovens, detectam-se os anticorpos do colostro materno que não estão relacionados com a infecção. Para além disso, o problema de possíveis reacções cruzadas entre espécies também tem de ser considerado (Faber, 2002; Fiege et al., 1992).

Existem ainda métodos moleculares, como por exemplo PCR ou de detecção de coproantígeno (ELISA) para a diferenciação das espécies, mas não são utilizados no diagnóstico de rotina (Daugochies & Najdrowski, 2005).

### **8.7. Tratamento e controlo**

A coccidiose é uma doença auto-limitante e é comum a recuperação espontânea sem qualquer tipo de tratamento.

O controlo da coccidiose é feito através da adopção de medidas sanitárias e de manejo, tratamento dos animais e uso preventivo de drogas coccidiostáticas (Lima, 2004). A maioria dos coccidiostáticos tem um efeito depressor apenas nas primeiras etapas do ciclo de vida do parasita e são usados para o controlo da doença. Permitem o desenvolvimento da imunidade e não interferem com a performance produtiva.

Os sinais clínicos característicos da coccidiose clínica apenas surgem na última fase do ciclo de vida do parasita, altura em que a maioria dos agentes quimioterápicos é menos eficaz. A dificuldade do tratamento da coccidiose reside no facto de que quando os coccidiostáticos são administrados, o parasita já passou a fase do ciclo em que os medicamentos são mais eficazes.

A severidade da doença relaciona-se com o número de oocistos esporulados ingeridos e da saúde geral do hospedeiro infectado. De acordo com Argüello (1999) e Lima (2004), as boas práticas de manejo e de higiene das explorações tomam um papel muito importante no controle e tratamento da coccidiose e baseiam-se nas seguintes medidas:

- os comedouros e os bebedouros devem estar colocados a uma altura suficiente para evitar a contaminação fecal e a queda de alimentos;
- evitar o sobrepovoamento e colocar os animais recém-nascidos em locais secos e limpos;

- as explorações devem ser mantidas secas e limpas através de uma boa drenagem dos pisos (viteiros com chão ripado) e a limpeza das camas deve ser frequente, evitando a acumulação de fezes e não dando tempo para os oocistos esporularem.

Embora os oocistos sejam resistentes à acção de vários desinfectantes, o uso de altas concentrações de amónia, hipoclorito de sódio, cresol ou fenol ou fumigações com formaldeído na desinfecção das explorações, tem algum efeito sobre estas formas parasitárias (Lima, 2004; Radostits, 2007a). A diminuição da contaminação nas pastagens é mais complicada. As pastagens devem ser drenadas, secas e vedadas de forma a impedir a contaminação do ambiente circundante. A rotação das pastagens (i.e. não pastoreadas por vitelos no mesmo ano ou no ano anterior) reduz o risco de coccidiose (Dauguschies & Najdrowski, 2005).

Se as condições de criação e de manejo não são as desejáveis, torna-se inevitável o recurso ao tratamento a todos os animais susceptíveis e confinados em ambiente contaminado (Lima, 2004).

Os esquizontes são o principal alvo das drogas terapêuticas e num grupo de animais, poderão existir várias espécies de *Eimeria* em diferentes estádios de desenvolvimento e é por isso, que os coccidiostáticos parecem ser eficazes nalguns casos e noutros não. Após o início dos sintomas num grupo de animais afectados, poderão surgir mais casos clínicos num período entre 12-15 dias. É impossível saber qual a fase do período pré-patente em que os animais se apresentam, e o melhor é administrar um coccidiostático na água ou na comida, tratar os novos casos e evitar factores de stress (superpopulação e alterações nutricionais) (Radostits, 2007a).

Animais com sintomas agudos da doença deverão ser separados dos outros e os tratamentos de suporte, tais como electrólitos, glicose e anti-diarreicos devem ser administrados para controlar a diarreia e a desidratação. A antibioterapia é recomendada para o combate a infecções secundárias.

Várias drogas com têm sido recomendadas para o tratamento de ruminantes afectados. Sulfonamidas na água de bebida ou o amprolium no alimento; antibióticos poliésteres como o lasalocid e a monensina, utilizados originalmente na coccidiose aviária, apresentam resultados eficazes na prevenção da coccidiose bovina (Quigley, 2001).

As sulfonamidas continuam a ser a principal escolha no tratamento da coccidiose clínica nos vitelos, particularmente quando associada ao trimetoprim. Estas apenas são eficazes nos estádios intracelulares (esquizontes) através do bloqueio do mecanismo de transporte de folato para dentro da célula, significando que apenas são eficazes na fase assexuada do parasita (Jonsson, 2008).

O grupo dos poliésteres ionóforos (monensina, salinimicina, lasalocid, maduramicina, narasina) actua somente nos merozoítos livres destruindo as organelas celulares, mas não actua contra os estádios intracelulares. Para além de propriedades anticoccídicas, os

ionóforos são promotores do crescimento e têm sido realizados estudos para determinar se o aumento de peso corporal dos ruminantes ocorreu em resposta ao controlo da coccidiose ou a uma modificação da fermentação ruminal (Quigley, 2001; Sinks, Quigley, & Reinemeyer, 1992). A monensina é um coccidiostático e promotor do crescimento em ruminantes e aves onde está provada a sua eficácia quando administrada por extensos períodos na ração (Quigley, 2001; Radostits, 2007a; Stockdale, 1981). A sua posterior retirada pode ser seguida do desenvolvimento de episódios mortais em alguns animais devido ao efeito imunossupressor desta droga (Radostits, 2007a).

O decoquinato, uma quinolona usada em alguns países (França, Reino Unido e Holanda), inibe a respiração da 1ª geração de esquizontes e a esporulação de oocistos (Jonsson, 2008). É administrada na forma de alimento composto e tem de ser aplicado de forma contínua durante longos períodos de tempo, pois só actua na fase inicial do ciclo evolutivo.

Compostos à base de acetoneitrilo de benzeno (toltrazuril, diclazuril) são conhecidos pela sua eficácia frente à doença por actuarem em vários estádios do ciclo de vida do parasita e por isso particularmente utilizados na metafilaxia. O toltrazuril actua nos estádios de merogonia e gametogonia e vários estudos já demonstraram a sua eficácia no controlo da coccidiose em vitelos, particularmente se administrado durante o período pré-patente. Uma única dose oral de toltrazuril (15mg/kg de peso vivo) é eficaz no controlo da doença clínica e na diminuição da excreção de oocistos após infecção experimental por *E. bovis* em vitelos (Mundt, Dauschies, Uebe, & Rinke, 2003). Raposo e Vieira (2008) avaliaram durante 30 dias, a presença de espécies de *Eimeria* e o impacto do tratamento preventivo de coccidiose bovina com toltrazuril a 5% em bezerros vindos dos Açores para uma exploração do continente. Detectaram excreção de oocistos apenas no primeiro dia e um maior ganho médio diário no grupo tratado (não existindo contudo uma diferença significativa entre os dois grupos). O tratamento metafilático com diclazuril (dose única de 1mg/kg de peso vivo) controla eficazmente a coccidiose em vitelos, reduzindo a contaminação ambiental com oocistos e prevenindo os efeitos negativos da exposição natural à coccidiose na performance de crescimento dos animais (Dauschies, Agneessens, Goossens, Mengel, & Veys, 2007).

O desenvolvimento de vacinas comerciais para combater a coccidiose parece estar ainda longe de ser alcançado. A existência de imunidade inata e adquirida contra esta infecção sugere a possibilidade do desenvolvimento de vacinas. Contudo, a imunidade cruzada entre as espécies de *Eimeria* é claramente reduzida o que complica o processo numa doença onde as infecções mistas são mais a regra do que excepção (Jonsson, 2008).

## II. TEMA: Coccidioses em vitelos da região de Montemor-o-Velho

### 1. Objectivos

O presente estudo teve como objectivos:

1. Detectar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelas técnicas de esfregaço fecal directo (ED), esfregaço fecal após concentração pelo método de Ritchie modificado (Ritchie) e esfregaço fecal após concentração pelo método de centrifugação simples, corados pelo método de Ziehl-Neelsen modificado e caracterizá-los morfológicamente
2. Detectar a presença de oocistos de *Eimeria* spp. pelo método de Willis e caracterizá-los morfológicamente;
3. Avaliar, dentro das técnicas de diagnóstico utilizadas, qual a que representa maior sensibilidade para a detecção de *Cryptosporidium*;
4. Identificar factores de risco para a eimeriose e a criptosporidiose.

### 2. Material e métodos

O processo de amostragem é condicionado pelo tipo de pesquisa; acessibilidade à população para a qual se pretende efectuar inferências; representatividade (caso esta seja necessária) e disponibilidade de tempo, recursos financeiros e logística (tais como, material e disponibilidade do laboratório). Nesta dissertação, a decisão sobre o tipo de amostragem recaiu numa amostragem por conveniência não probabilística, devido a limitações de tempo, exequibilidade e acessibilidade à população. As desvantagens inerentes ao processo de amostragem mencionado e o seu impacto nas conclusões do estudo, serão abordadas na discussão desta dissertação.

A amostra compreendeu 101 recolhas de fezes de vitelos, distribuídas por 26 explorações localizadas na região de Montemor-o-Velho e concelhos limítrofes, durante o período compreendido entre 29 de Fevereiro e 28 de Abril de 2008. Por cada animal registaram-se, sempre que possível, os seguintes dados: número do animal, idade, data da recolha, consistência das fezes, exploração e localização da mesma.

As idades variaram entre 2 e 50 dias e foram estratificadas em cinco grupos etários da seguinte forma: grupo 1 (1 a 7 dias); grupo 2 (8 a 15 dias); grupo 3 (16 a 23 dias); grupo 4 (24 a 32 dias); grupo 5 (33 a 50 dias).

As fezes foram recolhidas directamente do recto para frascos individuais, devidamente identificados e conservadas a 4°C. A análise das amostras foi feita no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV.

Na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*, utilizaram-se três técnicas: esfregaços fecais directos, esfregaços fecais após concentração pelo método de Ritchie modificado, corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada.

Em oito das 101 amostras não foi possível efectuar a técnica de esfregaço fecal após concentração pelo método de Ritchie modificado, por serem constituídas por fezes demasiado líquidas. Assim, utilizou-se a técnica de centrifugação simples tal como em mais outras oito amostras que apresentaram resultados contraditórios nas outras técnicas de pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*.

Para a pesquisa de oocistos de *Eimeria*, as fezes foram analisadas segundo o método de Willis.

A fim de conseguir o máximo de informação, foi ainda realizado um inquérito nas explorações (anexo I).

Efectuou-se tanto para os resultados obtidos na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* pelas técnicas esfregaço fecal directo e após concentração pelo método de Ritchie, como para a pesquisa de oocistos obtidos de *Eimeria* pela técnica de Willis, a associação de variáveis, para um nível de significância de 5% recorrendo a testes de Qui-quadrado (teste exacto de Fisher), através do software de estatística SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)16.0.1.

As associações entre proporções de positivos para *Eimeria* foram entre os grupos etários, tipo de alojamento dos vitelos, tipo de piso e paredes dos viteiros e sistema de abeberamento. Para os dois testes de diagnóstico utilizados para *Cryptosporidium*, para além das variáveis referidas anteriormente, relacionaram-se ainda a proveniência da água de abeberamento e a existência de rios ou de ribeiros próximo das explorações.

Na avaliação da sensibilidade das técnicas de diagnóstico utilizadas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* (esfregaço fecal directo e esfregaço fecal após concentração pelo método de Ritchie modificado corados pelo Ziehl-Neelsen modificado), utilizou-se o método de testes múltiplos paralelos. Esta estratégia significa que dois ou mais testes são realizados, e que qualquer resultado positivo identifica um caso. Os testes em paralelo têm por objectivo aumentar um programa de triagem. Foram excluídos desta avaliação oito animais devido à falta de realização de uma das técnicas de diagnóstico (método de Ritchie). Para verificar concordância de resultados entre os dois métodos, recorreu-se ao valor  $k$  (*Cohen's kappa*).

A falta de pressupostos para a realização do teste ou a não evidência de associação entre variáveis ( $p > 0,05$ ) ocorreu em todas as associações feitas para a técnica de Willis e para a técnica de Ritchie (anexo). Assim, apenas as associações que foram possíveis de evidenciar serão demonstradas nos resultados e posteriormente discutidas.

## 2.1. Técnicas laboratoriais utilizadas para o estudo das amostras fecais de vitelos

### 2.1.1. Esfregaços fecais corados pelo método de Ziehl-Neelsen

#### 2.1.1.1. Preparação dos esfregaços fecais directos

1. Depositar uma gota de água destilada, numa lâmina para microscopia.
2. Juntar uma pequena quantidade de fezes e homogeneizar bem, com a ajuda de uma zaragatoa.
3. Deixar secar o esfregaço à temperatura ambiente.

#### 2.1.1.2. Preparação dos esfregaços fecais, após concentração, pelo método de sedimentação difásica de Ritchie (modificado e adaptado de Casemore et al., 1985)

1. Misturar cerca de 0,5 mL de fezes, ou o equivalente ao tamanho de uma pequena ervilha (no caso de fezes sólidas), com 3 mL de água destilada, num tubo de centrifuga de 10 mL.
2. Agitar no “vortex” durante 1 minuto.
3. Adicionar 3 mL de éter sulfúrico e agitar vigorosamente durante 30 segundos.
4. Perfazer com água destilada, o volume final de 10 mL.
5. Filtrar por um tamis de rede e duas camadas de gaze, para um tubo limpo, de forma a eliminar os detritos fecais de maiores dimensões.
6. Centrifugar o filtrado a 70 xg, durante um minuto.
7. Recolher com uma pipeta de Pasteur descartável, a fase que fica entre o éter e o sedimento, para um tubo de ensaio limpo, podendo o sedimento ser usado para pesquisa de ovos e de quistos de outros parasitas.
8. Perfazer o volume de 10 mL com água destilada e centrifugar a 600 xg, durante 10 minutos.
9. Desprezar o sobrenadante, efectuar o esfregaço com o sedimento e conservar o restante a 4° C, para pesquisa de oocistos pelo método de imunofluorescência directa com anticorpos monoclonais.

#### 2.1.1.3. Preparação dos esfregaços fecais após concentração por centrifugação

1. Adicionar cerca de 6 mL de fezes num tubo de centrifuga. No caso de fezes sólidas, adicionar o equivalente a uma colher das de chá (rasa) e perfazer com água destilada até um volume final de 6 mL.
2. Agitar no “vortex” durante 1 minuto.

3. Centrifugar a 1 500 rpm durante 5 minutos.
4. Desprezar o sobrenadante e efectuar o esfregaço com o sedimento.

2.1.1.4. Coloração de Ziehl-Neelsen modificada  
(adaptada de Casemore et al., 1985)

1. Fixar o esfregaço fecal bem seco, com metanol, durante 1 minuto.
2. Cobrir a lâmina com fucsina básica fenicada (fucsina básica em pó 1% m/v, fenol cristalizado 5% m/v, álcool absoluto 10% v/v) durante 10 minutos.
3. Lavar com água da torneira.
4. Descorar com álcool clorídrico a 1% até à eliminação total do corante em excesso.
5. Lavar com água da torneira.
6. Cobrir a lâmina com verde malaquite a 0,4% durante 30 segundos.
7. Lavar com água da torneira.
8. Deixar secar à temperatura ambiente e observar ao microscópio.

2.1.1.5. Observação microscópica

A observação dos esfregaços para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* foi feita em microscópio óptico, com ocular de  $\times 10$  e objectivas de  $\times 20$ ,  $\times 40$  e de imersão.

Consideraram-se como oocistos de *Cryptosporidium*, todas as estruturas esféricas ou subesféricas de cor rosa brilhante e com granulações ou esporozoítos em forma de banana no interior, com dimensões que variaram entre 4,5 – 5,4  $\mu\text{m}$  x 4,17 – 5,0  $\mu\text{m}$ .

Foi feita a contagem de oocistos em 10 campos microscópicos ao acaso, na ampliação de  $\times 400$  (ocular  $\times 10$  e objectiva  $\times 40$ ) e determinou-se o nível de parasitismo das amostras fecais nos esfregaços após concentração (tabela 6).

**Tabela 6** – Classificação do nível de infecção das amostras fecais por *Cryptosporidium* em função do número de oocistos

Nº de oocistos	Nível de infecção
1 a 10	I
11 a 50	II
51 a 100	III
101 a 300	IV
Mais de 300	V

### 2.1.2. Método de Willis

1. Emulsionar uma quantidade de fezes equivalente ao tamanho de uma avelã (ou cerca de 4 mL no caso de fezes líquidas) com cerca de 20 mL de solução saturada de sacarose num copo plástico, agitando com uma vareta de vidro.
2. Com a ajuda de um funil, fazer passar a emulsão das fezes através de uma rede metálica, ao mesmo tempo que se faz a compressão com a vareta sobre a massa fecal, para dentro de tubos de ensaio de 10 mL até ficarem quase cheios. Completar se necessário, com solução saturada de sacarose.
3. Retirar o funil e completar o enchimento com a solução saturada até se formar um menisco convexo.
4. Esperar dois minutos e retirar os resíduos sobrenadantes, adicionando, com pipeta de Pasteur algumas gotas da solução saturada de sacarose, evitando que se formem bolhas de ar.
5. Colocar uma lamela e aguardar 10 minutos.
6. Retirar a lamela, colocar numa lâmina e observar ao microscópio óptico.

#### 2.1.2.1. Observações microscópicas

A observação das lâminas para pesquisa de oocistos de *Eimeria* foi feita em microscópio óptico, com ocular de x10 e objectiva de x10.

Consideraram-se como oocistos de *Eimeria*, estruturas ovóides, elipsoidais ou subesféricas, de cor acastanhada ou incolor brilhante e com granulações no seu interior com dimensões entre 17,5 – 27,5 µm x 12,5 – 22,5 µm. A classificação morfológica foi feita na ampliação x400 (ocular x10 e objectiva x40) através da medição dos oocistos.

O nível de parasitismo foi determinado nas preparações, após contagem em 10 campos aleatórios na ampliação de x100 (ocular x10 e objectiva x10), tendo sido estratificado em três níveis (tabela 7).

**Tabela 7** - Classificação do nível de infecção das amostras fecais por *Eimeria* em função do número de oocistos.

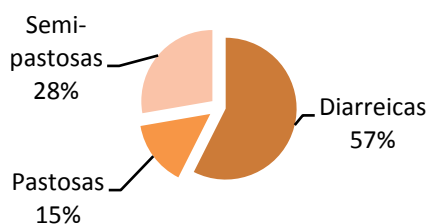
Nº de oocistos	Nível de infecção
1 a 75	I
76 a 150	II
Mais de 150	III

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterização das fezes quanto à consistência

As fezes foram classificadas em três categorias (pastosas, semi-pastosas e diarreicas) e, no momento da recolha da amostra, 57% dos animais apresentava-se com fezes diarreicas. Os restantes animais apresentavam fezes não diarreicas, das quais 28% eram de consistência semi-pastosa e 15% eram pastosas (gráfico 3).

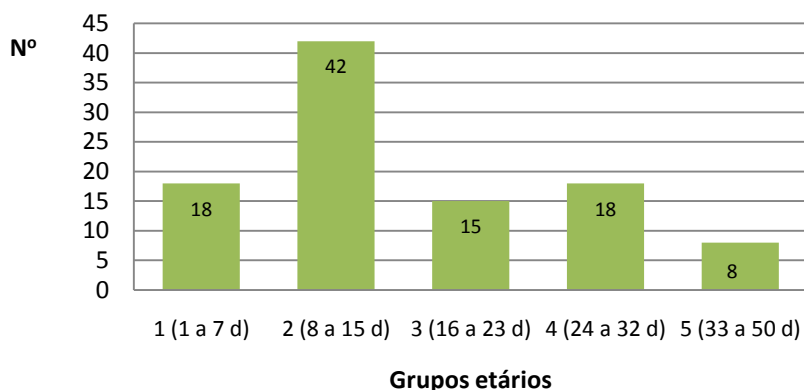
**Gráfico 3** – Classificação das fezes de vitelo quanto à consistência (n= 101)



#### 3.2. Caracterização dos vitelos quanto à idade

O grupo etário mais representado foi o 2 (8 a 15 dias) com 41,6% (42/101) animais, seguido pelos grupos 1 (1 a 7 dias) e 4 (24 a 32), ambos com 18 animais (17,8%). Os outros grupos, ordenados por ordem decrescente foram o 3 (16 a 23 dias) e o 5 (33 a 50 dias) com 14,8% (15/101) e 7,9% (8/101) respectivamente (gráfico 4).

**Gráfico 4** – Distribuição do total de vitelos incluídos no estudo por grupos etários



### 3.3. Resultados da pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e *Eimeria*

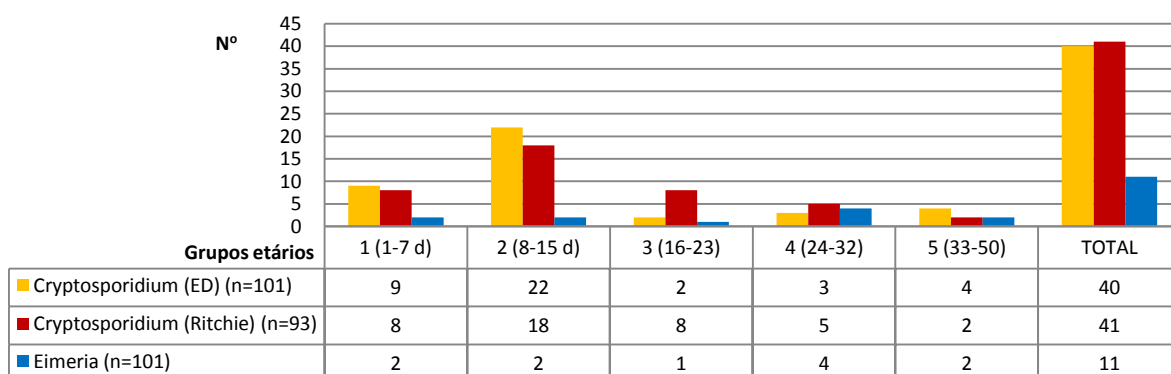
A pesquisa de *Cryptosporidium* pela técnica de esfregaço fecal directo corado pela técnica Ziehl-Neelsen registou um total de 40 amostras positivas (n=101) onde houve evidência de associação entre os resultados obtidos e os grupos etários (p=0,012). Entre as 40 amostras positivas, as correspondentes a animais com idades pertencentes aos grupos etários 1 e 2 foram as que obtiveram maiores proporções de resultados positivos com 22,5% (9/40) e 55% (22/40), seguindo-se por ordem decrescente, os animais com idades inseridas nos grupos 4, 3 e 2 com 10% (4/40), 7,5% (3/40) e 5% (2/40) (tabela e gráfico 5).

**Tabela 8** - Proporções dos resultados positivos e negativos à presença de oocistos de *Cryptosporidium*, pela técnica de esfregaço fecal directo (ED) entre os vários grupos etários

			Grupos etários (dias)					TOTAL
			1 a 7	8 a 15	16 a 23	24 a 32	33 a 50	
Técnica ED	Negativo	Nº de animais	9	20	13	15	4	61
		%	14,8%	32,8%	21,3%	24,6%	6,6%	100,0%
	Positivo	Nº de animais	9	22	2	3	4	40
		%	22,5%	55,0%	5,0%	7,5%	10,0%	100,0%
<b>TOTAL</b>		Nº de animais	18	42	15	18	8	101
		%	17,8%	41,6%	14,9%	17,8%	7,9%	100,0%

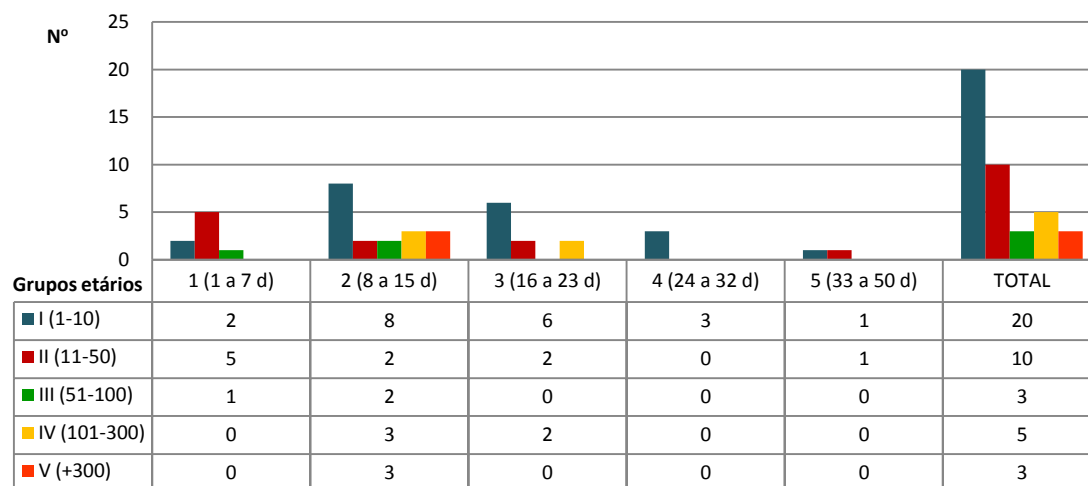
Das 93 amostras analisadas nos esfregaços fecais pela técnica de concentração (Ritchie), 41 foram positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* (gráfico 5), tendo sido classificadas quanto ao nível de infecção de acordo com a tabela 6.

**Gráfico 5** – Distribuição do número de amostras fecais positivas à presença de oocistos de *Eimeria* e *Cryptosporidium*, por grupos etários e por técnicas de diagnóstico



Os animais pertencentes aos grupos etários 1 (1 a 7 dias), 2 (8 a 15 dias) e 3 (16 a 32 dias) foram os que registaram maiores proporções de animais positivos, estando englobados na sua maioria, dentro dos níveis de infecção I e II (Gráfico 6).

**Gráfico 6** – Distribuição do número de amostras fecais positivas para *Cryptosporidium* (n=41), classificadas pelo nível de infecção (I a V) e por grupos etários (1 a 5)



Num total de 20 amostras com nível de infecção I (1 a 10 oocistos), dois animais pertenciam ao grupo etário 1 (10%), oito animais ao grupo 2 (40%), seis animais ao grupo 3 (30%), três animais ao grupo 4 (15%) e um animal ao grupo 5 (5%).

No nível II de infecção (11 a 50 oocistos) verificou-se um total de dez animais, onde 50% (5/10) tinham idades correspondentes ao grupo etário 1. Os grupos etários 2 e 3 englobaram dois animais em cada um deles (20%) e nenhum animal do grupo etário 4 apresentava infecção de nível II. Apenas 1 animal do grupo etário 5 registou infecção de nível II.

Registaram-se três amostras com nível III de infecção (51 a 100 oocistos), onde um animal tinha até uma semana de vida (grupo 1) e dois animais tinham de 8 a 15 dias (grupo 2).

Os cinco animais que apresentaram nível de infecção IV (10 a 500 oocistos) pertenciam aos grupos etários 2 e 3 com 40% (2/5) e 60% (3/5) respectivamente.

Quanto ao nível máximo de infecção (V), os três animais registados, tinham idades compreendidas entre 8 e 15 dias (100%).

Os resultados da pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* nos esfregaços fecais após centrifugação simples estão representados na tabela 9.

Esta técnica foi utilizada apenas para as amostras de fezes demasiado líquidas, que não permitiram efectuar a técnica de Ritchie (8 amostras) e as amostras fecais (8 amostras) onde se obtiveram resultados contraditórios, i.e. menor quantidade de oocistos contados (em 10 campos aleatórios na ampliação x40) pela técnica de Ritchie do que pela técnica de esfregaço directo. Em todos os resultados contraditórios registados entre o ED e o método de Ritchie, obtiveram-se maiores contagens de oocistos pelo método de centrifugação

comparativamente ao ED. Relativamente às oito amostras fecais que não foram submetidas ao método de Ritchie, detectou-se positividade em quatro amostras cujo resultado foi negativo pela técnica de ED.

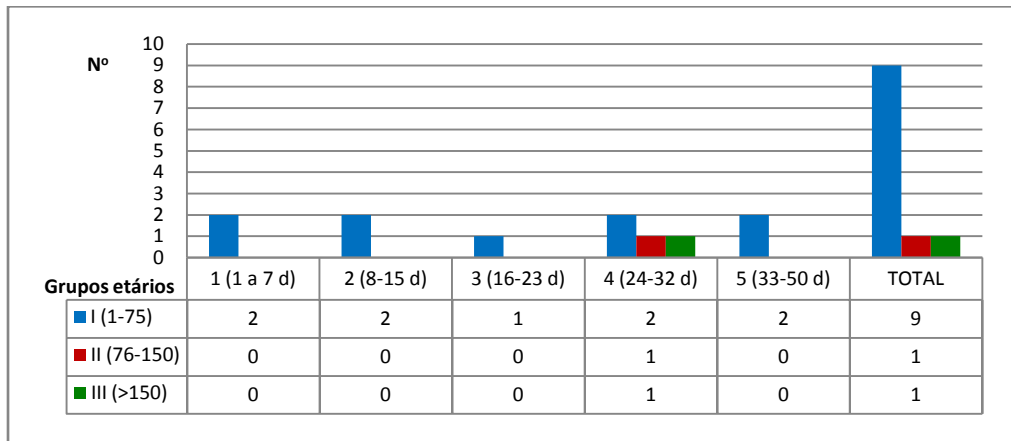
**Tabela 9** – Comparação dos resultados da contagem do número de oocistos de *Cryptosporidium* (em 10 campos aleatórios na ampliação x400) obtidos pela técnica de esfregaço directo, de concentração pelo método de Ritchie modificado e de centrifugação simples (Centrifugação) em 16 amostras

Amostra nº	Idade	Tipo fezes	Nº de oocistos		
			ED	Ritchie	Centrifugação
61	8	D	53	NE	146
64	8	D	0	NE	25
65	24	D	4	NE	10
67	31	D	0	NE	0
69	30	D	0	NE	3
91	7	D	69	NE	102
95	16	D	0	NE	0
101	10	D	42	NE	70
94	6	D	112	21	170
15	5	D	1	0	5
38	38	SP	1	0	3
39	9	D	1	0	1
40	41	P	3	0	2
46	14	P	1	0	3
93	6	P	1	0	3
102	10	D	1	0	4

D= fezes diarreicas; SP= fezes semi-pastosas; P= fezes pastosas; NE= técnica não efectuada; ED= técnica de esfregaço directo; Ritchie= técnica de concentração pelo método de Ritchie modificado, Centrifugação= técnica de centrifugação simples.

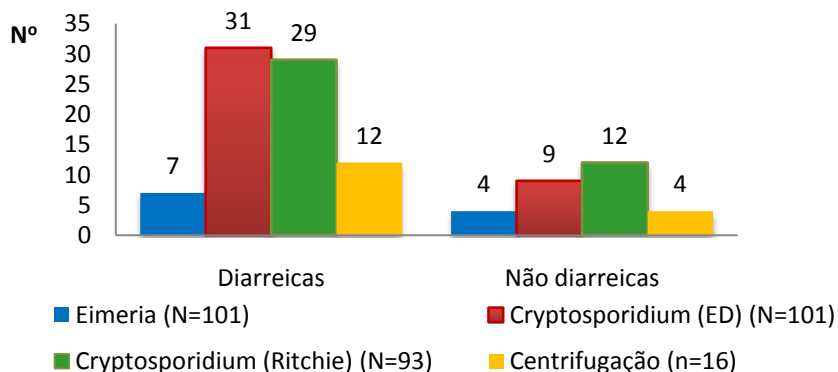
A pesquisa de oocistos de *Eimeria* pelo método de Willis modificado revelou um total de 11 amostras positivas (n=101), onde nove animais se apresentavam com nível de infecção I, um animal com nível II e um animal com o nível III. Os animais com idades entre 24 a 32 dias foram os mais afectados (4/11) (Gráfico 7).

**Gráfico 7 –** Número de amostras fecais positivas para *Eimeria*, distribuídas pelo nível de infecção e por grupos etários (n=11)



As fezes diarreicas foram a maioria das fezes recolhidas com uma proporção de 57% (58/101) e foi nestas, que se registou um maior número de amostras com resultado positivo à presença de *Cryptosporidium* e *Eimeria*. Detectou-se *Cryptosporidium* em 53% (31/58) e 58% (29/50) das fezes diarreicas analisadas, pela técnica de esfregaço directo (ED) e após concentração (Ritchie) respectivamente. Nas fezes não diarreicas, a técnica de ED foi positiva em 21% (9/43) e a técnica de Ritchie em 28% (12/43) das amostras positivas. Para *Eimeria*, detectaram-se resultados positivos em 12% (7/58) das fezes diarreicas e em 9% (4/43) das fezes não diarreicas. As fezes diarreicas avaliadas pela técnica de centrifugação simples foram positivas em 75% (12/16) e em 25% (4/16) das de tipo não diarreico (gráfico 8).

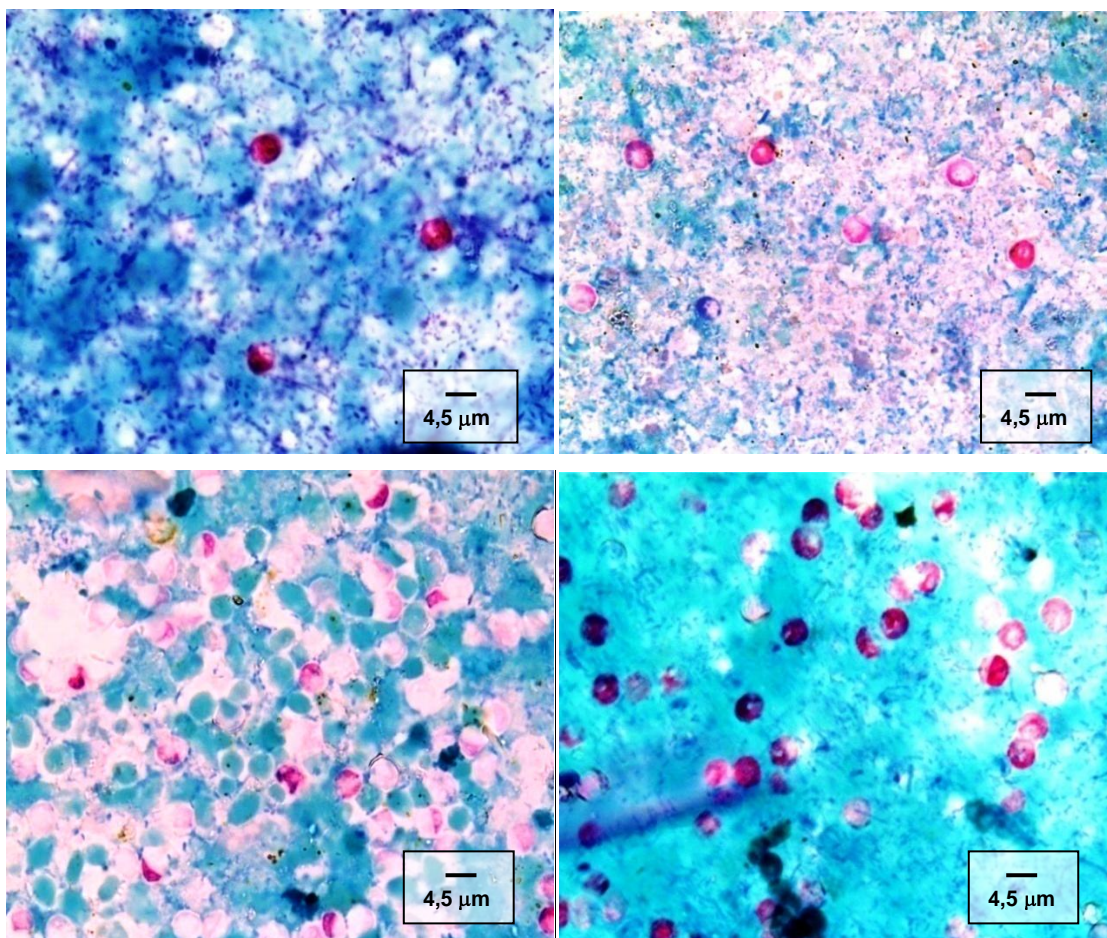
**Gráfico 8 –** Distribuição dos resultados positivos para *Eimeria* e *Cryptosporidium* de acordo com o tipo de fezes (diarreicas e não diarreicas)



### 3.4. Caracterização morfológica dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp.

Foram identificados como oocistos de *Cryptosporidium*, as estruturas esféricas ou subesféricas com granulações ou esporozoítos em forma de crescente, corados em tons de vermelho/rosa brilhante. As dimensões dos oocistos variaram entre 4 – 5  $\mu\text{m}$  x 4,5 – 5  $\mu\text{m}$ , sugerindo que possam se tratar das espécies *C. parvum* e *C. bovis* (Figura 9).

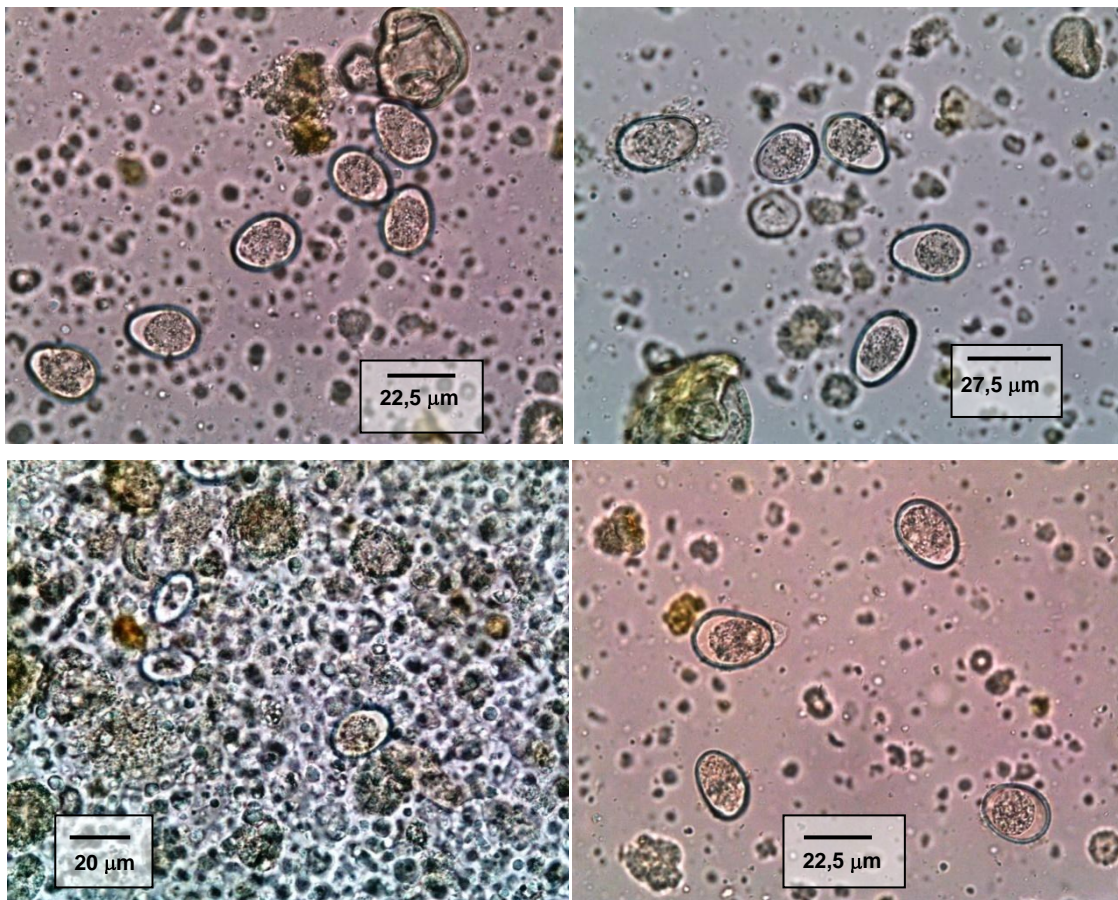
**Figura 9** – Oocistos de *Cryptosporidium* em esfregaços fecais corados pelo método de Ziehl-Neelsen modificado



Após medição dos oocistos de *Eimeria* observados, verificaram-se três padrões diferentes baseados nas dimensões e nos aspectos morfológicos. Assim, oocistos incolores e sem micrópilo, com forma elipsoidal e dimensões de 22,5  $\mu\text{m}$  x 15  $\mu\text{m}$  e 22,5  $\mu\text{m}$  x 12,5  $\mu\text{m}$  (média=22,5  $\mu\text{m}$  x 13,8  $\mu\text{m}$ ) sugeriam as espécies *E. ellipsoidalis*, *E. alabamensis* e *E. cylindrica*, enquanto que os oocistos incolores, sem micrópilo e de forma subesférica, de dimensões 17,5  $\mu\text{m}$  x 15  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$  x 17,5  $\mu\text{m}$  (média= 18,8  $\mu\text{m}$  x 16,2  $\mu\text{m}$ ) sugeriam *E. zuernii*. Oocistos com dimensões 27,5  $\mu\text{m}$  x 17,5  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$  e 25  $\mu\text{m}$  x 22,5  $\mu\text{m}$  (média= 25,8  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$ ) de aspecto alongado e subesférico, incolores apresentando micrópilo pouco desenvolvido, sugeriam *E. bovis*. Nos três casos, as paredes dos oocistos

eram incolores e apenas se verificou micrópilo pouco desenvolvido nos oocistos com dimensões de 27,5 µm x 17,5 µm (Figura 10).

**Figura 10** – Oocistos de *Eimeria* spp. pelo método de Willis



### **3.5. Avaliação da sensibilidade das técnicas de diagnóstico utilizadas na pesquisa de *Cryptosporidium* (esfregaço fecal directo e após concentração pela técnica de Ritchie)**

Para classificar os animais como doentes, usou-se o método de testes múltiplos em paralelo de testes de diagnóstico. Se um dos métodos de diagnóstico (neste caso esfregaço fecal directo ou esfregaço fecal pelo método de Ritchie) tiver resultado positivo, o animal fosse considerado como parasitado. Assumindo a classificação dada pelo teste paralelo, efectuaram-se avaliações aos dois métodos de diagnóstico para *Cryptosporidium*. Verificou-se para a amostra em questão (n=93) que a sensibilidade (probabilidade do animal doente apresentar resultado positivo) do método de Ritchie foi maior do que a sensibilidade do método de ED com valores de 85% e 75% respectivamente.

### 3.6. Resultados do inquérito efectuado nas explorações em estudo

#### 3.6.1. História de diarreia neo-natal

De acordo com o inquérito realizado nas explorações 26 das 28 explorações analisadas apresentavam casos de vitelos com diarreia neo-natal. A diarreia tinha início durante a primeira semana de vida dos animais em 22 explorações e em duas outras explorações, a diarreia nos vitelos tinha início a partir da segunda semana de vida (Anexos, tabela 13).

#### 3.6.2. Administração de colostro e desmame aos vitelos

Em todas as explorações o colostro das mães era fornecido aos recém-nascidos nas primeiras 6-12 horas após o nascimento e se o parto tivesse ocorrido durante a noite, o colostro era dado na manhã seguinte. Os vitelos saíam das maternidades logo após o nascimento e o desmame era feito aos dois meses, de forma gradual.

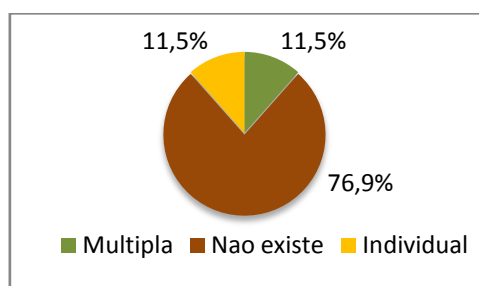
#### 3.6.3. Vacinação das vacas adultas

A vacinação das vacas adultas foi praticada em 21 das 26 explorações. Os animais foram vacinados contra Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Vírica Bovina (BVD), Parainfluenza - 3 (PI-3), Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV), Rotavírus, *Echirichia coli* (K99), Coronavírus e Leptospiroses. As doenças/agentes etiológicos para os quais foi feita prevenção em cada exploração, estão discriminados no anexo I, tabela 2, sendo a IBR, a BVD, a PI-3 e o BRSV, os mais comuns nestas explorações, seguidos de Rotavírus, *E.coli* (K99) e Coronavírus (Anexos, tabela 13).

#### 3.6.4. Tipo de maternidade existente nas explorações

Verificou-se a existência de maternidades individuais em três explorações (11,5%) e maternidades múltiplas noutras três explorações (11,5%). Em 77% (20/26) das explorações verificou-se a inexistência de maternidades (gráfico 9).

**Gráfico 9** – Percentagem das maternidades existentes nas explorações em estudo (n=26)

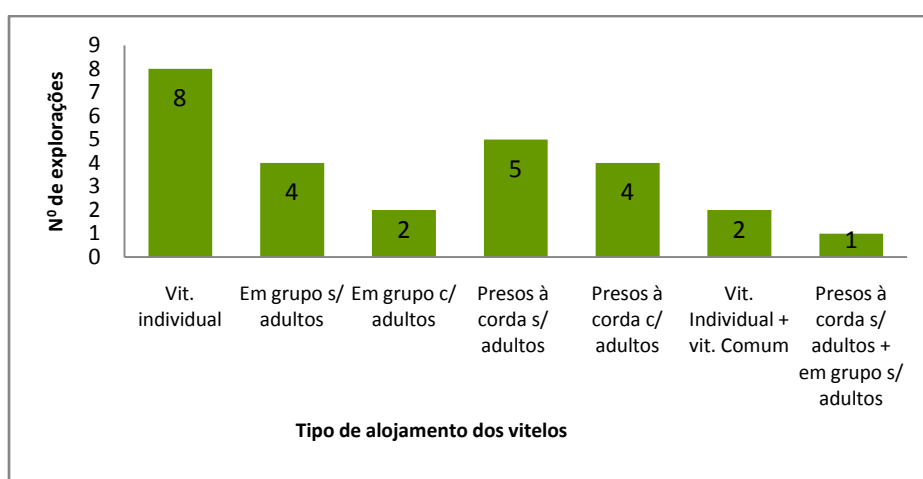


### 3.6.5. Tipo de alojamento/contenção dos vitelos existentes nas explorações

O gráfico 10 ilustra os diferentes tipos de alojamento/contenção existentes nas explorações, onde se destacam os vitelheiros individuais (8/26). As outras explorações apresentavam:

- vitelos presos à corda, em contacto (4/26) ou separados dos adultos (5/26),
- vitelos alojados em grupo, em contacto com adultos (2/26) ou separados deles (4/26).
- duas explorações com vitelheiros individuais e vitelheiros comuns
- uma exploração com vitelos presos à corda separados dos adultos e vitelos em grupo separados dos adultos.

**Gráfico 10** – Distribuição dos diferentes tipos de alojamento/contenção nas explorações (n=26)

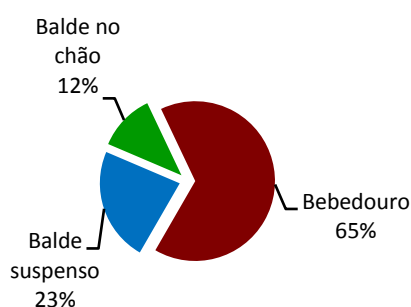


Recolheu-se uma maior quantidade de amostras a vitelos alojados em vitelheiros individuais, vitelos presos à corda separados dos adultos e vitelos em grupo separados dos adultos, com 37,6% (38/101), 21,8% (22/101) e 13,9% (14/101) respectivamente (Anexos, tabela 12).

### 3.6.6. Sistema de abeberamento e proveniência da água de abeberamento

Relativamente ao sistema de abeberamento dos vitelos, verificaram-se três tipos diferentes: em 65% (17/26) das explorações eram utilizados bebedouros, em 23% (6/26) a água era fornecida em balde suspenso e em 12% (3/26) o balde estava no chão (gráfico 11). A água de abeberamento dos animais era proveniente de furos em 22 explorações e de poço em quatro explorações (Anexos, tabela 13).

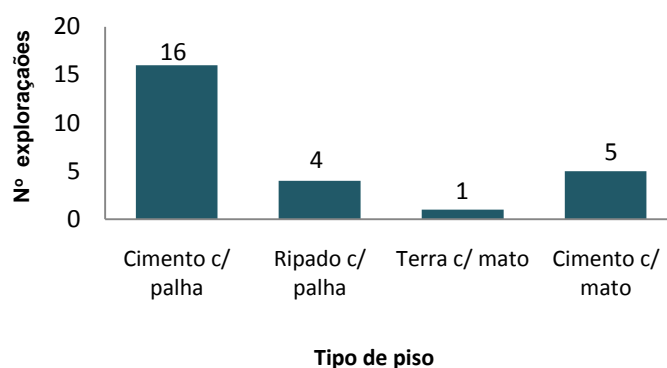
**Gráfico 11** – Distribuição do tipo de abeberamento dos vitelos nas explorações



### 3.6.7. Tipo de piso e paredes dos viteiros

O piso de cimento com palha existia em 62% (16/26) das explorações. Nas restantes, o piso ripado com palha, o piso de terra com mato e o piso de cimento com mato, existia respectivamente em 15% (4/26), 4% (1/26) e 19% (5/26) das explorações (gráfico 11). Relativamente às paredes dos viteiros, todas eram construídas com cimento exceptuando uma exploração que apresentava viteiros com paredes de madeira (e com piso de terra com palha).

**Gráfico 12** – Distribuição do tipo de piso dos viteiros nas explorações



Foi encontrada evidência de associação entre o tipo de piso e o tipo de construção das paredes dos viteiros e as proporções de positivos pela técnica de esfregaço directo para *Cryptosporidium*, através do teste exacto de Fisher ( $p=0,018$ ). Conforme a tabela 10, os vitelos alojados em viteiros com piso de terra com palha e parede de madeira (14,3%) e piso ripado com palha e paredes de cimento (24,2%) foram os que apresentaram menor proporção de positivos quando comparados com os alojados em viteiros de piso de cimento com mato e paredes de cimento e viteiros com piso de cimento com palha e paredes de cimento.

**Tabela 10** – Comparação entre o tipo de piso e paredes dos viteiros e o número e percentagem de amostras positivas pela técnica de esfregaço directo (ED) (n=101)

		Tipo de piso e paredes dos viteiros (piso+parede)				Total
		Terra c/ palha + madeira	Cimento c/ mato + cimento	Cimento c/ palha + cimento	Ripado c/ palha + cimento	
<b>Técnica ED</b>						
<b>Negativo</b>	Nº amostras	6	4	26	25	61
	%	85.7%	33.3%	53.1%	75.8%	60.4%
<b>Positivo</b>	Nº animais	1	8	23	8	40
	%	14.3%	66.7%	46.9%	24.2%	39.6%
<b>Total</b>	Nº animais	7	12	49	33	101
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

### 3.6.8. Existência de rios ou de ribeiros perto das explorações

A maioria das explorações (73%) onde foram recolhidas as amostras de fezes, não tinham rios ou ribeiros na sua proximidade, tendo sido possível comprovar, a relação entre resultados obtidos pela técnica de ED e a existência ou não de proximidade de rios ou ribeiros ( $p=0,022$ ). De acordo com a tabela 11, os vitelos nascidos em explorações próximas de rios ou ribeiros, eram os que apresentavam menores proporções de positivos (25%), comparativamente aos animais positivos nascidos em explorações sem rios ou ribeiros próximos (75%). No entanto, o total de amostras recolhidas em explorações próximas de cursos de águas foi muito inferior (15/101) ao total de amostras de fezes recolhidas em explorações distantes de cursos de água (86/101).

**Tabela 11** – Associação entre os resultados obtidos pela técnica de ED e a proximidade ou não de rios ou ribeiros das explorações

			Proximidade de rios ou ribeiros		TOTAL
			não	sim	
<b>Técnica ED</b>	Negativo	Nº amostras	56	5	61
		%	91,8%	8,2%	100,0%
	Positivo	Nº amostras	30	10	40
		%	75,0%	25,0%	100,0%
<b>TOTAL</b>	Nº amostras	86	15	101	
	%	85,1%	14,9%	100,0%	

#### 4. Discussão

As principais razões que levaram à execução deste estudo foram a importância que estes dois parasitas têm nos bovinos como agentes causais de diarreias em vitelos e, no caso do género *Cryptosporidium*, especialmente na espécie *C. parvum*, o impacto em saúde pública. Durante o período de estágio, constatou-se grande número de vitelos com diarreia nas explorações. Observando o gráfico 3, verifica-se que durante o período de recolha das amostras de fezes, 57% das amostras eram constituídas por fezes diarreicas, seguido de 28% de amostras com fezes semi-pastosas.

Os resultados obtidos, no que se refere ao parasitismo, foram comparados dentro dos vários grupos etários estudados, com o tipo de alojamento/contenção, tipo de piso e parede dos vitleiros, presença/ausência de maternidades nas explorações, sistema de abeberamento dos vitelos e presença de rios ou de ribeiros por perto. Por conveniência do estudo a escolha dos animais baseou-se na idade inferior ou igual a três meses, embora tenha sido devido ao acaso o facto de 41,6% dos vitelos presentes nas explorações visitadas durante aquele período pertencer ao grupo etário 2 (gráfico 4).

A criptosporidiose em vitelos, normalmente tem início entre a primeira e a quarta semana de idade (Merck & Co., 2005b), o que confirma os resultados apresentados neste trabalho (gráfico 5). A presença do parasita *Cryptosporidium*, nos animais analisados foi bastante elevada com valores de 40% (40/101) de animais infectados, sendo possível a evidência de associação entre estas proporções e os grupos etários, onde a maior percentagem de positivos se registou na primeira e na segunda semanas de vida, com 55% (22/40) e 22,5% (9/40) respectivamente ( $p=0,012$ ).

Estudos realizados em Portugal registaram uma taxa de infecção de 44% (62/141) em vitelos até aos quatro meses de idade na região de Montemor-o-Novo (I. Pereira da Fonseca, Mariano, I. e Lopes, S., 1998) e num outro estudo realizado na mesma região, foi estimada uma prevalência de 23,3% (129/553) (Pereira da Fonseca, 2000). Na região de Aveiro, as maiores percentagens foram observadas em animais com idades compreendidas entre sete a 14 dias e 15 a 21 dias, atingindo valores de 89% (56/63) e 90% (35/39) respectivamente, numa percentagem global de 74,8% em animais com idades até 12 semanas (Martins, 2007). Um outro estudo revelou uma prevalência de 25,4% (74/291) em vitelos da região da Beira Litoral e Entre Douro e Minho (Mendonça et al., 2007).

De acordo com as medições e características morfológicas dos oocistos de *Cryptosporidium* observados, e por ser a espécie mais patogénica e a mais comum em vitelos, acredita-se que a espécie envolvida seja *C. parvum* (4,5-5,4  $\mu\text{m}$  x 4,2-5,0  $\mu\text{m}$ ), no entanto, seria de toda a conveniência recorrer a técnicas de biologia molecular e estudos de genotipagem (por exemplo pela técnica de PCR- RFLP) de modo a confirmar as espécies, considerando que *C. bovis* (4,76-5,35 x 4,17-4,76  $\mu\text{m}$ ) pode igualmente estar envolvida. Num estudo realizado em vitelos de várias explorações nos Estados Unidos, que relacionou a idade dos animais e as

espécies de *Cryptosporidium* envolvidas na infecção, a espécie *C. parvum* foi a única presente nos intestinos dos vitelos com idades até as duas semanas e constatou-se que a espécie *C. bovis* podia ser detectada a partir das 3 semanas de idade (Santín, 2004).

A espécie *C. parvum* é conhecida por provocar enterites agudas em animais e humanos e a sua presença nos ruminantes é um factor de risco para a saúde pública devido à contaminação ambiental. Em contraste, nenhum vitelo infectado com a espécie *C. bovis* apresentou sinais clínicos de diarreia e nunca foi detectado em humanos (R. Fayer, Santin, Trout, & Greiner, 2006; Santín, 2004)

Um dos objectivos propostos foi a determinação do método de diagnóstico mais eficaz entre os dois métodos de diagnóstico utilizados para *Cryptosporidium* (esfregaço fecal directo e após concentração pelo método de Ritchie modificado, corados pelo método de Ziehl-Neelsen modificado), tendo como base a sua sensibilidade, facilidade de execução, rapidez e custo acessível. Por norma, são utilizados testes de referência (*Gold Standard*) para a avaliação das técnicas de diagnóstico, através do qual são comparadas as outras técnicas, assumindo que esse teste tem uma sensibilidade e especificidade de 100%. Vários autores consideram como *Gold Standard*, a técnica dos esfregaços fecais corados pelo Ziehl-Neelsen (Arrowood & Sterling, 1987; Tee et al., 1993).

No presente trabalho, como não foi feito um estudo de caso-controlo, não foi possível utilizar métodos de comparação de técnicas de diagnóstico que utilizassem testes de referência, uma vez que não era possível conhecer o estado hígido de cada animal de modo a classificá-lo como parasitado ou não por criptosporídios.

Assim, na avaliação da sensibilidade das técnicas de diagnóstico para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, com a limitação de não ter sido realizado um estudo de caso-controlo, utilizou-se o método de testes múltiplos paralelos, revelando uma sensibilidade do método de Ritchie superior em relação ao método de esfregaço fecal directo, com 85% e 75% respectivamente. Uma vez que a amostra em estudo não foi representativa da população e os métodos são medidos numa escala qualitativa (positivo ou negativo), de forma a avaliar a concordância entre os resultados dos dois métodos, calculou-se o valor  $k$  (Cohenn's kappa), que nos fornece uma ideia do quanto as observações se afastam daquelas esperadas, fruto do acaso, indicando-nos assim quão legítimas as interpretações são. O valor  $k$  varia de 0 a 1, sendo que "1" representa a concordância perfeita e "0" representa não existência de concordância. O valor  $k$  obtido neste caso foi igual 0,51 o que, segundo alguns autores (Landis & Koch, 1977), é considerado um nível de concordância moderada ( $0,4 < k < 0,6$ ). O teste múltiplo paralelo, possui a desvantagem de classificar um animal são como positivo, se um dos testes der resultado positivo, mesmo que este seja falso positivo devido a, por exemplo, erro da técnica, a contaminação da amostra, a observador pouco experiente (os oocistos podem ser facilmente confundidos com leveduras ou pseudo-parasitas quando vistos por alguém pouco experiente), entre outros.

No entanto, e porque o método de concentração é mais demorado na sua execução, mais caro devido à necessidade de maior quantidade de material e reagentes, o método dos esfregaços fecais corados pelo Ziehl-Nelsen modificado foi o método escolhido de entre os dois. Este método apresenta o inconveniente de poder originar falsos negativos no caso de infecções pouco severas, onde o recurso a um método de concentração torna-se mais vantajoso. As fezes preparadas pelo método de concentração de Ritchie modificado passam por dois processos de centrifugação e, de um modo geral, foram obtidas preparações mais ricas em oocistos quando sujeitas a métodos de concentração. No entanto, alguns autores referem que cada passo de centrifugação pode levar a 30% de perdas de oocistos (LeChevallier, Norton, Siegel, & Abbaszadegan, 1995). Tal como para o caso da pesquisa de oocistos de *Eimeria*, optou-se por uma contagem semi-quantitativa do número de oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras devido à sua maior rapidez. Segundo observações de alguns autores (Peeters et al., 1992; Villacorta, Peeters, Vanopdenbosch, Ares-Mazas, & Theys, 1991) existe uma estreita correlação entre a determinação do número de oocistos feita em câmara de Neubauer e a contagem semiquantitativa dos esfregaços corados.

O recurso à centrifugação simples apenas foi usado no caso de fezes demasiado líquidas, onde o método de Ritchie não se revelou eficaz, provavelmente pela dispersão dos oocistos e pelo menor teor de gordura presente na amostra fecal e também nos casos onde se contaram maior número de oocistos em fezes preparadas pela técnica de esfregaço directo. Em duas amostras onde a técnica de concentração de Ritchie não foi utilizada (tabela 9), a técnica de centrifugação simples permitiu obter resultado positivo, em contraste com o resultado negativo (falso negativo) revelado pela técnica de esfregaço directo. Nas amostras com resultados contraditórios entre o método de esfregaço directo e após concentração pelo método de Ritchie, contou-se um número maior de oocistos pela centrifugação simples na generalidade das amostras, provavelmente pelos motivos apontados acima. Além disso, e em relação ao método de concentração de Ritchie, concluiu-se que muitos dos oocistos devem ter ficado retidos nas malhas da gaze utilizada para a filtração das amostras, originando perdas significativas de oocistos (Weber et al., 1991). Os esfregaços preparados pela técnica de centrifugação simples, não passam por nenhum processo de filtração e além disso, tem uma execução mais rápida. A falta de tempo não permitiu a execução desta técnica em todas as preparações, o que teria sido interessante para a comparação de resultados com a técnica de Ritchie com o objectivo de concluir a hipótese da perda de oocistos devido ao processo de filtração.

A técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada é fácil de executar, económica e permite a coloração simultânea de vários esfregaços ao mesmo tempo, e uma boa visualização da morfologia dos oocistos. Para além disto, esta técnica não utiliza produtos altamente inflamáveis como acetona ou éter, muito empregues noutros métodos de

diagnóstico de *Cryptosporidium*. Os esfregaços fecais corados por esta técnica apresentam no entanto, a desvantagem de falha no diagnóstico no caso de amostras pouco parasitadas e a necessidade de observadores experientes. A presença de estruturas como leveduras, bactérias ou glóbulos de gordura, podem confundir um observador pouco experiente. Observou-se que, os oocistos não apresentam uma coloração uniforme, podendo aparecer formas desde total a parcialmente coradas ou até mesmo formas não coradas na mesma preparação (figura 9). Nos oocistos esporulados, podem-se ver esporozoítos, em forma de crescente, intensamente corados e no decurso da maturação os esporozoítos vão sendo empurrados para um lado, surgindo um grande vacúolo (figura 9). As características álcool-ácido-resistentes dos oocistos vão surgindo à medida que o oocisto amadurece, embora a coloração de oocistos envelhecidos possa também ser dificultada (Clavel, 1994; Entrala, Rueda-Rubio, Janssen, & Mascaró, 1995).

A eimeriose é uma doença comum em animais jovens, surgindo normalmente, a partir das três semanas até aos 6 meses de idade. Neste estudo, a infecção por *Eimeria* verificou-se em apenas 10,8% (11/101), e em animais com idades superiores a três semanas o que está de acordo com as observações de outros autores (Boghton, 1945; Faber, 2002). O grupo etário 4 (24 a 32 dias) englobou o maior número de animais (4/11) com presença de oocistos de *Eimeria* nas fezes. Este grupo incluiu apenas 17% (18/101) dos animais em estudo (gráfico 5) e embora o valor desta percentagem pareça motivar a impossibilidade de associação entre idade e a infecção, a experiência clínica apoia-nos na observação.

Neste trabalho, devido a várias condicionantes laboratoriais e temporais, a contagem dos oocistos de *Eimeria* foi realizada de forma semi-quantitativa (contagem de oocistos em 10 campos aleatórios na ampliação x100) e os resultados obtidos, estratificados por níveis de infecção de acordo com a tabela 7. Quanto ao nível de infecção, nove dos 11 animais com presença de oocistos de *Eimeria* nas fezes apresentavam nível I (1-75 oocistos), um animal com nível II (76-150 oocistos) e um animal com nível III (>150 oocistos) de infecção (gráfico 7). Uma contagem rigorosa de oocistos, através de um método quantitativo (por exemplo método de MacMaster), daria uma indicação mais fidedigna acerca do nível de infecção sem nunca esquecer que um diagnóstico correcto de coccidiose deve ser feito em primeiro lugar com base na anamnese, sinais clínicos, história da doença na exploração, sistema de produção, entre outros (Argüello, 1999; Dauschies & Najdrowski, 2005; Lima, 2004).

A observação dos oocistos de *Eimeria*, a medição e a caracterização morfológica (forma, cor e presença ou ausência de micrópilo) evidenciou que os animais apresentavam infecções mistas provocadas por duas ou mais das cinco espécies encontradas: *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii*, *E. cylindrica* e *E. alabamensis*. Segundo Dauschies & Najdrowski (2005) a simples presença de oocistos nas fezes, não permite fazer o diagnóstico específico, uma vez que os graus de patogenicidade e o número de oocistos produzidos variam consoante as espécies. O diagnóstico específico rigoroso necessita da observação

dos oocistos esporulados (Argüello, 1999), com recurso a coproculturas em placas de Petri, avaliando o tempo necessário para o desenvolvimento dos esporozoítos e posterior medição. No entanto, segundo alguns autores, considerando a experiência do observador, é possível identificar pelo menos os oocistos das espécies mais patogénicas que infectam os bovinos (*E. bovis*, *E. zuernii* e *E. alabamensis*) sem necessidade de recorrer a técnicas que permitam a esporulação de oocistos (BayerHealthCare, 2007). Destas três espécies, as mais comuns na Europa são *E. bovis* e *E. zuernii* (Bushan, 2006). A importação de animais portadores assintomáticos, de diferentes partes da Europa, poderia justificar o aparecimento de espécies pouco comuns de Portugal, como é o caso de *E. alabamensis*. Num estudo realizado na Alemanha, demonstrou-se que em zonas endémicas, deverá ser considerado o risco de desenvolvimento de coccidiose clínica pela espécie *E. alabamensis* em vitelos durante as primeiras duas-três semanas post-tournout (Himmelstjerna, 2006). Faber et al. (2002) verificaram que as espécies *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii*, *E. bovis* e *E. auburnensis* foram as que predominaram nas explorações localizadas no norte e no centro da Alemanha. Em todas as explorações onde se recolheram as amostras positivas a *Eimeria* havia história de diarreia neo-natal, com início na primeira semana de vida (Anexos, tabela 13). Nesta fase podem surgir outros agentes causais de diarreia, tais como *Cryptosporidium*, *E. coli* (K99), Rotavírus, Coronavírus. Tal como a eimeriose, outras doenças como a salmonelose, a diarreia viral bovina ou outras parasitoses intestinais (nematodoses, por exemplo) surgem normalmente, a partir das três semanas de vida (Merck & Co., 2005a). Assim, o diagnóstico diferencial deve incluir todas estas doenças, bem como alterações devidas a mudanças alimentares. É de referir que nas 11 amostras positivas a *Eimeria*, cinco apresentaram simultaneamente resultado positivo para oocistos de *Cryptosporidium* e todas elas com nível de infecção I (1 a 10 oocistos), onde quatro desses animais eram os pertencentes aos grupos etários 3, 4 e 5.

Tanto a criptosporidiose como a eimeriose são doenças auto-limitantes que terminam, normalmente quando a excreção de oocistos desaparece. Nas infecções naturais por *C. parvum*, o aparecimento dos sintomas e a eliminação dos oocistos pode começar na primeira ou na segunda semana de vida (Merck & Co., 2005b). A excreção pode ter início logo aos dois dias de idade, atingindo o seu máximo aos 14 dias de idade (Olson et al., 2004). O período correspondente ao declínio da excreção de oocistos de *Cryptosporidium* (aproximadamente a partir da quarta semana) coincide com o início do aumento da excreção de oocistos de *Eimeria* (aproximadamente a partir das 3 semanas até aos seis meses). Comparando os gráficos 6 e 7, verifica-se um menor número de amostras positivas à presença de oocistos de *Cryptosporidium* a partir da quarta semana de idade dos animais (grupo etário 4) com um baixo nível de infecção (nível I). Para o caso das amostras positivas à presença de oocistos de *Eimeria*, foi exactamente nesta fase que se registou maior número de amostras e os níveis mais elevados de infecção.

Independentemente do parasita em estudo e da técnica de diagnóstico utilizada, verificou-se um maior número de resultados positivos em amostras de fezes diarreicas (gráfico 8). Este facto é claramente conhecido, considerando que, à medida que as infecções se resolvem, a consistência das fezes vai aumentando e o número de oocistos excretados vai diminuindo.

A imunização activa de vacas ou novilhas em gestação, através de vacinas contra Rotavírus, Coronavírus e *E. coli* (K99) verificou-se em apenas 4 explorações (Anexo tabela 13). Os vitelos deveriam ser alimentados com colostro de vacas vacinadas, durante as primeiras duas a quatro semanas de vida, com o objectivo de reduzir a intensidade de diarreias provocadas por *E. coli* (K99), reduzir a incidência de diarreias provocadas por rotavírus e, nos vitelos infectados por coronavírus ou rotavírus diminuir a sua disseminação. A presença de outros agentes enteropatogénicos, tais como *E. coli* (K99), rotavírus e coronavírus, bastante comuns em vitelos nesta faixa etária, poderá estar também relacionada com o elevado número de animais com diarreia (Merck & Co., 2005b). No entanto, não foi possível fazer a pesquisa destes agentes etiológicos, o que teria enriquecido o trabalho. Alterações de dieta (leite de substituição, introdução de ração, entre outros) são também causas importantes para o aparecimento de diarreia em vitelos.

Segundo Faubert e Litvinsky (2000), é no momento do parto que as vacas portadoras assintomáticas libertam um maior número de oocistos de *Cryptosporidium*, comparativamente às vacas que se encontram no período do pré-parto e do pós-parto, levando à conclusão de que os recém-nascidos adquirem a infecção imediatamente após o nascimento. A existência ou não de maternidades nas explorações sugere a hipótese de ser um factor a ter em conta na susceptibilidade de infecção por *Cryptosporidium* em vitelos recém-nascidos. Colocou-se a hipótese de as vacas que pariam em explorações onde não existiam maternidades, ou seja, que não eram separadas das outras fêmeas do mesmo parque e, vacas que pariam em maternidades múltiplas podiam contribuir para o aumento da susceptibilidade dos vitelos recém-nascidos de contrair imediatamente a infecção, em comparação com aqueles nascidos em maternidades individuais (no caso de a progenitora não estar infectada). No entanto, a associação entre os resultados positivos e a existência ou não de maternidades não foi demonstrada.

Garber et al. (1994) detectaram infecção em 59,1% (652/1103) das explorações e em 22,4% (1648/7369) dos vitelos num estudo realizado a nível nacional nos Estados Unidos da América. As explorações onde existiam maternidades múltiplas, assim como as que tinham mais de 100 vacas a produzir leite, foram as que apresentaram um maior número de vitelos infectados.

Nas explorações deste estudo, detectou-se a presença deste parasita em 29% (9/31) dos animais nascidos em maternidades múltiplas, 30% (3/10) em maternidades individuais e em 46,6% (28/60) de animais nascidos em explorações sem maternidade (Anexos, tabela 14).

A pesquisa de infecção por *Cryptosporidium* nas mães dos vitelos analisados neste estudo, bem como os níveis de infecção de cada uma delas, provavelmente teria sido útil para a comprovação desta hipótese.

A via de infecção mais comum para estes dois tipos de parasitas é a fecal-oral, através da ingestão de oocistos excretados nas fezes. O sistema de produção, as condições higiosanitárias das explorações, o tipo de alojamento dos animais e a localização dos bebedouros e/ou manjedouras (a proximidade do chão contribui para a contaminação fecal da água e/ou alimentos) assume grande importância na transmissão destas doenças.

Verificou-se neste estudo a presença de animais alojados/contidos juntamente com animais adultos (gráfico 10), onde o contacto entre adultos e vitelos sugere que, a existência de portadores assintomáticos, sejam uma fonte de infecção para os vitelos ao excretarem continuamente oocistos de *Cryptosporidium* ou de *Eimeria* (Anderson, 1998; Faber, 2002; Faubert & Litvinsky, 2000). Contudo, o reduzido número de amostras deste estudo não permitiu demonstrar esta associação.

No total de fezes recolhidas, 50 animais tinha como sistema de abeberamento o balde colocado no chão, 42 o balde suspenso e nove o bebedouro. A hipótese de o maior número de animais infectados serem aqueles cujo sistema de abeberamento fossem baldes no chão, não se comprovou para *Eimeria* nem para *Cryptosporidium*. Para além do baixo número de animais que constituíam a amostra deste estudo, em muitos casos, observou-se que muitos dos baldes suspensos e bebedouros existentes, não estavam a uma altura suficiente para impedir a contaminação fecal pelos animais. Tal facto poderá ter contribuído para a impossibilidade desta associação assim como a ausência de aplicação de produtos desinfectantes na água de bebida dos animais (Anexos, tabelas 15 e 17).

Relativamente ao tipo de solo e paredes dos viteiros, os dados obtidos permitiram evidenciar a associação entre as proporções de positivos para *Cryptosporidium*, através do teste exacto de Fisher ( $p=0,018$ ) (tabela 10). Os viteiros com piso de cimento com mato e viteiros com piso de cimento com palha foram os que apresentaram mais casos positivos tanto para *Cryptosporidium* como para *Eimeria* (anexos, tabela 16). O deficiente escoamento deste tipo de piso associado à presença de camas de palha proporciona as condições ideais de temperatura e de humidade necessárias à esporulação dos oocistos de *Eimeria*, manutenção da viabilidade dos oocistos e maior probabilidade dos animais ingerirem os oocistos (de *Eimeria* e/ou *Cryptosporidium*). Um piso ripado ou de terra permite um melhor escoamento das fezes e urina dos animais, mantendo as camas secas durante mais tempo. Os oocistos de *Cryptosporidium* podem estar presentes em todo o tipo de águas, tais como rios, ribeiros, lagoas, águas residuais, água potável, etc, sendo a contaminação das águas uma importante via de transmissão da criptosporidiose (R. Fayer, 2004). A evidência de associação entre os resultados obtidos e a existência ou não de proximidade de rios ou ribeiros ( $p=0,022$ ) revelaram que os vitelos nascidos em explorações próximas de rios ou

ribeiros são os que apresentam menores proporções de positivos (25%), comparativamente aos animais positivos nascidos em explorações sem rios ou ribeiros próximo delas (75%). No entanto, das 15 amostras recolhidas em explorações próximas de cursos de água, 10 eram positivas (tabela 11). Condicionantes de tempo e de logística impossibilitaram a realização de testes a estas águas para avaliar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* e sua viabilidade. Aqueles testes poderiam confirmar ou não a hipótese dos efluentes destas explorações serem a causa da contaminação das águas e conseqüente risco para a saúde pública.

## 5. Conclusão

A componente prática do estágio curricular foi de enorme importância tanto do ponto de vista profissional, permitindo adquirir competências fundamentais para o desenvolvimento da futura actividade na área da clínica e cirurgia das espécies pecuárias, mas também a nível pessoal. A aprendizagem e conhecimentos adquiridos através do contacto com a realidade diária do trabalho do Veterinário de Campo vão contribuir para que a autora se sinta confiante para desempenhar o seu papel de Médica Veterinária. Assim, as experiências vividas e as dificuldades sentidas possibilitaram a aplicação de um raciocínio crítico e de resolução de problemas, necessários em qualquer profissão.

A noção da viabilidade económica de um tratamento face à produtividade do animal e/ou das possibilidades de cada produtor, foi muito importante para compreender a necessidade de seleccionar os métodos de diagnóstico e de tratamento que melhor se adaptem a cada caso, nunca esquecendo o bem-estar animal.

É importante referir a função do Médico Veterinário na formação dos produtores, quer em termos de manejo, como também na utilização de produtos de uso veterinário por parte daqueles de modo a maximizar económica a sua exploração.

Relativamente ao tema escolhido para a presente dissertação, todos os objectivos propostos foram concretizados.

A amostragem por conveniência não probabilística deste trabalho, não permitiu fazer um estudo de prevalência por não ser representativa da população da região. No entanto, foi possível demonstrar na população estudada, as duas coccídias que nos propusemos estudar – *Eimeria* com 10,8% de casos e *Cryptosporidium* com 39,6% de casos pela técnica de esfregaço fecal e 40,6% de casos pela técnica de concentração pelo método de Ritchie modificado.

A avaliação das características morfológicas dos oocistos de *Eimeria* levou à conclusão de que para além das espécies *E. bovis* e *E. zuernii* (as mais comuns em Portugal), outras espécies menos comuns em Portugal, como *E. alabamensis*, podem ser responsáveis pela doença. No entanto, seria necessário promover, sob condições laboratoriais, a esporulação desta última, para poder afirmar a sua existência inequivocamente.

Na avaliação efectuada nos oocistos de *Cryptosporidium*, apesar das características morfológicas e a morfometria obtida terem sido coincidentes com as espécies *C. parvum* e *C. bovis*, considerando o baixo nível de patogenicidade da espécie *C. bovis* e pelo facto de esta espécie ser menos característica em vitelos com menos de três semanas, faixa etária mais representada neste estudo, tudo indica ser *C. parvum* a espécie envolvida nestes casos.

Quanto à avaliação da técnica de diagnóstico mais eficaz dentro das técnicas utilizadas para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, comprovou-se que a técnica de concentração pelo método de Ritchie modificado, apresentou uma maior sensibilidade (85%) em comparação com a técnica de esfregaço fecal (75%).

Os factores de risco identificados para os animais em estudo foram a idade e o tipo de piso e paredes dos viteiros e apenas para a infecção por *Cryptosporidium*. Os pisos de cimento com palha e/ou pisos de cimento com mato, ambos com paredes de cimento, são os que evidenciaram através dos resultados, um maior risco de infecção para os animais, em comparação com os pisos ripados com paredes de cimento ou pisos de terra com paredes de madeira.

De um modo geral, seria desejável colmatar algumas lacunas deste trabalho num próximo estudo representativo da população de bovinos da região de Montemor-o-Velho. O facto de ser uma região onde predominam rios, ribeiros, lagoas e campos alagados (arrozais) seria de enorme importância a pesquisa de espécies de *Cryptosporidium* – especialmente *C. parvum* nas águas de superfície que abrangem aquela região.

### III. BIBLIOGRAFIA

- Abrahamsen, M. S. (1998). Bovine T cell responses to *Cryptosporidium parvum* infection. *Int J Parasitol*, 28(7), 1083-1088.
- Anderson, B. C. (1998). Cryptosporidiosis in bovine and human health. *J Dairy Sci*, 81(11), 3036-3041.
- Anderson, B. C., Donndelinger, T., Wilkins, R. M., & Smith, J. (1982). Cryptosporidiosis in a veterinary student. *J Am Vet Med Assoc*, 180(4), 408-409.
- Angus, K. W. (1990). Criptosporidiosis in Ruminants. In J. P. Dubey, Speer, C.A., Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidiosis of man and animals* (pp. 83-103). Boca Raton: CRS Press.
- Argüello, M. R. H. e. C., M.C. . (1999). Parasitoses del aparato digestivo: Coccidiosis. In M. Campillo M.C., Vasquez, F.A.M., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romero, H.Q. & Varela, M.C. (Ed.), *Parasitología veterinaria* (pp. 195-212). Madrid: McGraw-Hill - Interamericana.
- Arrowood, M. J., & Sterling, C. R. (1987). Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J Parasitol*, 73(2), 314-319.
- Arslan, M., Tüzer, E. (1998). Prevalence of bovine eimeriosis in Thracia, Turkey. *Journal of Parasitology and Animal Sciences*, 22, 161-164.
- BayerHealthCare. (2007). Coccidiose em Bovinos. In B. P. S.A. (Ed.), *Baycox Bovis: informação técnica* (pp. 4-46). Carnaxide: Bayer Healthcare, Saúde Animal.
- BayerHealthCare. (2008). *Coccidiosis in cattle: sampling and diagnosis*. Acedido em Mai., 25, 2008 em: [http://www.baycox.com/323/Sampling\\_and\\_Diagnosis.htm](http://www.baycox.com/323/Sampling_and_Diagnosis.htm)
- Boghton, D. C. (1945). Bovine Coccidiosis: from carrier to clinical case. *North America Veterinary Journal*, 147.
- Bohrmann, R. (1991). Treatment with toltrazuril in a natural outbreak of coccidiosis in calves. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 98(9), 343-345.
- Busato, A., Lentze, T., Hofer, D., Burnens, A., Hentrich, B., & Gaillard, C. (1998). A case control study of potential enteric pathogens for calves raised in cow-calf herds. *Zentralbl Veterinarmed B*, 45(9), 519-528.
- Bushan, C. (2006). Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in Europe [Abstract], 1<sup>st</sup> *International Bayer Cattle Simposium* (pp. 8). Nice.
- Carneiro, J. R., Campos, D.B., Linhares, G.G., Rodrigues, N. (1988). *Eimeria* em bovinos mestiços Zebu-Holandês procedentes da bacia leiteira de Goiânia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veteriária e Zootecnia*, 40(6), 355-360.
- Casemore, D. P. (1991). ACP Broadsheet 128: June 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol*, 44(6), 445-451.
- Casey, M. J. (1991). *Cryptosporidium* and bovine criptosporidiosis. *Irish Veterinary Journal*, 1, 2-7.

- Clavel, A., Arnal, A., Sanchez, E.C., Ocariz, I., Varea, M., Castillo, F., Quilez, J. . (1994). Morphological and staining alterations of *Cryptosporidium* oocysts contained in 10% formalin-preserved faeces. *Research Reviews of Parasitology*, 54(4), 273-275.
- Cornelissen, A. W., Verstegen, R., van den Brand, H., Perie, N. M., Eysker, M., Lam, T. J., et al. (1995). An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms. *Vet Parasitol*, 56(1-3), 7-16.
- Current, W. L., & Haynes, T. B. (1984). Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science*, 224(4649), 603-605.
- Dauguschies, A., Agneessens, J., Goossens, L., Mengel, H., & Veys, P. (2007). The effect of a metaphylactic treatment with diclazuril (Vecoxan) on the oocyst excretion and growth performance of calves exposed to a natural *Eimeria* infection. *Vet Parasitol*, 149(3-4), 199-206.
- Dauguschies, A., Akimaru, M., & Burger, H. J. (1986). [Experimental *Eimeria bovis* infections in the calf: 1. Parasitological and clinical findings]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 93(9), 393-397.
- Dauguschies, A., & Najdrowski, M. (2005). Eimeriosis in cattle: current understanding. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52(10), 417-427.
- de Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., & Peeters, J. E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol*, 29(8), 1269-1287.
- Dedrickson, J. (2003). *Coccidia (Eimeria bovis, E. zuernii)*. *A Parasite Profile*. Retrieved March 10<sup>th</sup>, 2008, from <http://www.corid.com/coccidia.html>
- Entrala, E., Rueda-Rubio, M., Janssen, D., & Mascaro, C. (1995). Influence of hydrogen peroxide on acid-fast staining of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Int J Parasitol*, 25(12), 1473-1477.
- Esteban, E., & Anderson, B. C. (1995). *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J Dairy Sci*, 78(5), 1068-1072.
- Faber, J., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Burger, H., Zahner, H. (2002). *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. *Vet Parasitol*, 104(1), 1-17.
- Fanelli, H. (1983). Observations on nervous coccidiosis in calves. *Bovine Practice*, 18, 50-53.
- Farrington, M., Winters, S., Walker, C., Miller, R., & Rubenstein, D. (1994). *Cryptosporidium* antigen detection in human feces by reverse passive hemagglutination assay. *J Clin Microbiol*, 32(11), 2755-2759.
- Faubert, G. M., & Litvinsky, Y. (2000). Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. *J Parasitol*, 86(3), 495-500.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*, 126(1-2), 37-56.
- Fayer, R., Andrews, C., Ungar, B. L., & Blagburn, B. (1989). Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. *J Parasitol*, 75(3), 393-397.

- Fayer, R., Morgan, U., & Upton, S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*, 30(12-13), 1305-1322.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J. M., & Greiner, E. (2006). Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet Parasitol*, 135(2), 105-112.
- Fayer, R., Santin, M., & Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol*, 91(3), 624-629.
- Fayer, R., Speer, C.A., Dubey, J.P. (1997). The general biology of *Cryptosporidium*. In R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, (pp. 1-41). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Fayer, R., Trout, J. M., Graczyk, T. K., & Lewis, E. J. (2000). Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Vet Parasitol*, 93(2), 103-112.
- Fiege, N., Klatter, D., Kollmann, D., Zahner, H., & Burger, H. J. (1992). *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitol Res*, 78(1), 32-38.
- Foster, J. C., Matthew, D.G., Courtney, P.D. e Ward, L.A. (2003). Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. *Food Microbiology*, 20, 351-357.
- Fox, J. E. (1985). Coccidiosis in cattle. *Modern Veterinary Practice*, 66, 113.
- Friend, S. C., & Stockdale, P. H. (1980). Experimental *Eimeria bovis* infection in calves: a histopathological study. *Can J Comp Med*, 44(2), 129-140.
- Garber, L. P., Salman, M. D., Hurd, H. S., Keefe, T., & Schlater, J. L. (1994). Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc*, 205(1), 86-91.
- Gookin, J. L., Nordone, S. K., & Argenzio, R. A. (2002). Host responses to *Cryptosporidium* infection. *J Vet Intern Med*, 16(1), 12-21.
- Grinberg, A., Markovics, A., Galindez, J., Lopez-Villalobos, N., Kosak, A., & Tranquillo, V. M. (2002). Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate. *Vet Rec*, 151(20), 606-608.
- Harp, J. A. e. G., J.P. (1998). Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Journal of Parasitology*, 81(1), 289-294.
- Heath, H. L., Blagburn, B. L., Elsasser, T. H., Pugh, D. G., Sanders, L. G., Sartin, E. A., et al. (1997). Hormonal modulation of the physiologic responses of calves infected with *Eimeria bovis*. *Am J Vet Res*, 58(8), 891-896.
- Hermosilla, C., Burger, H. J., & Zahner, H. (1999). T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. *Vet Parasitol*, 84(1-2), 49-64.
- Himmelstjerna, G. E., C.; Wirtherle, N.; Heyden, V.; Welz, C.; Radloff, I.; Beening, J.; Carr, D.; Hellman, K.; Schneider, T.; Krieger, K. (2006). Clinical and epidemiological characteristics of *Eimeria* infections in first-year grazing cattle. *Veterinary Parasitology*, 136, 215-221.

- Jarvie, B. D., Trotz-Williams, L. A., McKnight, D. R., Leslie, K. E., Wallace, M. M., Todd, C. G., et al. (2005). Effect of halofuginone lactate on the occurrence of *Cryptosporidium parvum* and growth of neonatal dairy calves. *J Dairy Sci*, 88(5), 1801-1806.
- Joachim, A., Krull, T., Schwarzkopf, J., & Dauschies, A. (2003). Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Vet Parasitol*, 112(4), 277-288.
- Jonsson, N. (2008). Coccidiosis in cattle: unusual aspects of a common disease are discussed, *The Veterinarian*. Sydney: Sydney Magazine Publishers Pty Ltd.
- Jonstone, C. (2000, 2000). *Eimeria bovis: Life cycle*. Retrieved Mar. 10, 20008, from [http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Protozoa/eimer\\_b.htm](http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Protozoa/eimer_b.htm)
- Kirkpatrick, C. E. (1995). Infección por *Cryptosporidium* como una causa de diarrea del ternero. In E. Hunt (Ed.), *Clinicas Veterinarias de NorteAmerica: Practica en animales de consumo. Diarrea del ternero* (pp. 89-104). Buenos Aires: Inter-Médica Editorial.
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159-174.
- LeChevallier, M. W., Norton, W. D., Siegel, J. E., & Abbaszadegan, M. (1995). Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol*, 61(2), 690-697.
- Lima, J. D. (2004). Coccidiose dos ruminantes domesticos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13.
- Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R., & Blagburn, B. L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol*, 47(1), 91-95.
- Luginbühl, A. e. P., K. (1996). Cryptosporidiosis of calves as a serious problem on a dairy cattle farm. *Schweiz. Arch. Tierhilk*, 138(4), 195-200.
- MacKenzie, W. R., Schell, W. L., Blair, K. A., Addiss, D. G., Peterson, D. E., Hoxie, N. J., et al. (1995). Massive outbreak of waterborne *cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin Infect Dis*, 21(1), 57-62.
- Marshall, R. N., Catchpole, J., Green, J. A., & Webster, K. A. (1998). Bovine coccidiosis in calves following turnout. *Vet Rec*, 143(13), 366-367.
- Martins, S., Sousa S., Madeira de Carvalho, L.M., Bacelar, J., Cannas da Silva, J. . (2007). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Northwest Portugal dairy calves and efficacy of Halofuginone Lactate on the prevention of cryptosporidiosis. *Cattle Practice*, 15(2), 152-156.
- Matjia, P. T., Penzhorn, B.L. (2002). Ocorrence and diversity of bovine coccidian at three localities in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 104(2).
- Matos, O., Alves, M., Xiao, L., Cama, V., & Antunes, F. (2004). *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 10(12), 2256-2257.
- Matos, O., Tomas, A., Aguiar, P., Casemore, D., & Antunes, F. (1998). Prevalence of cryptosporidiosis in AIDS patients with diarrhoea in Santa Maria Hospital, Lisbon. *Folia Parasitol (Praha)*, 45(2), 163-166.

- McAllister, T. A., Olson, M. E., Fletch, A., Wetzstein, M., & Entz, T. (2005). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. *Can Vet J*, 46(1), 47-55.
- Mendonça, C., Almeida, A., Castro, A., de Lurdes Delgado, M., Soares, S., da Costa, J. M., et al. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet Parasitol*, 147(1-2), 47-50.
- Merck & Co., I. (2005a). Coccidiosis. In C. Kahn (Ed.), *The Merck Veterinary Manual* (9 ed., pp. 164-166): Merck & Co., Inc., Whitehouse Station.
- Merck & Co., I. (2005b). Cryptosporidiosis. In C. Kahn (Ed.), *The Merck Veterinary Manual* (9 ed., pp. 168-171): Merck & Co., Inc., Whitehouse Station.
- Mora, L. M. O., Bautista, M.G., Vazquez, F.A.R. (1999). Parasitoses del aparato digestivo: Criptosporidiosis. In M. Campillo M.C., Vasquez, F.A.M., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romero, H.Q. & Varela, M.C. (Ed.), *Parasitología Vetrinaria* (pp. 213-221). Madrid: McGraw-Hill - Interamericana.
- Morgan-Ryan U.M., X., L.; O'Donoghue, P.; Hill, B.D.; Lal, A.A. e Tompson, R.C. (2000). Detection of *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a dugong (*Dugong dugong*). *J. Parasitol*, 86, 1352-1354.
- Morgan, U. M., Sargent, K. D., Deplazes, P., Forbes, D. A., Spano, F., Hertzberg, H., et al. (1998). Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology*, 117 (Pt 1), 31-37.
- Mundt, H. C., Dauschies, A., Uebe, F., & Rinke, M. (2003). Efficacy of toltrazuril against artificial infections with *Eimeria bovis* in calves. *Parasitol Res*, 90 Suppl 3, S166-167.
- Nielsen, K. (1982). Pathophysiology of gastrointestinal parasitism. In D. F. D. Mettrick, S.S. (Ed.), *Parasites - their world and ours* (pp. 248-251). Toronto: Esevier.
- Olson, M. E., O'Handley, R. M., Ralston, B. J., McAllister, T. A., & Thompson, R. C. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol*, 20(4), 185-191.
- Palmateer, G. (2003). *Cryptosporidium parvum* is a very successful and lethal parasite. Retrieved Marc. 5, 2008, from <http://www.esemag.com/0103/crypto.html>
- Peeters, J. E., Villacorta, I., Vanopdenbosch, E., Vandergheynst, D., Naciri, M., Ares-Mazas, E., et al. (1992). *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Infect Immun*, 60(6), 2309-2316.
- Pereira da Fonseca, I. (2000). Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: Caracterização genética de isolados de *Cryptosporidium parvum* de origem bovina. Tese de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Pereira da Fonseca, I. (2001). Criptosporidiose nos ruminantes domésticos e silvestres - parte I. *Medicina Veterinária*, 47-53.
- Pereira da Fonseca, I., Mariano, I. e Lopes, S. (1998). *Cryptosporidium parvum* em bovinos na região de Montemor-o-Novo (Portugal). *Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 64, 162-164.
- Pérez-Gordón, G. (2006, 15/08/2006). The confused taxonomy of *Cryptosporidium*. *Revista peruana de biología*, 13, 143-144.

- Pilarczyk, B., Balicka-Ramisz, A., Ramisz, A. . (2000). Studies on coccidiosis in cattle in north-west Poland. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 3(1).
- Pohjola, S., Neuvonen, E., Niskanen, A., & Rantama, A. (1986). Rapid immunoassay for detection of zoonotic oocysts. *Acta Vet Scand*, 27(1), 71-79.
- Quigley, J. (2001). Revisión sobre la Coccidiosis en becerros (Vol. 17, pp. 1-6).
- Radostits, O. M. G., C.C.; Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007a). Diseases associated with protozoa: coccidiosis. In Elsevier (Ed.), *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th ed., pp. 1498-1507): Saunders.
- Radostits, O. M. G., C.C.; Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007b). Diseases associated with protozoa: cryptosporidiosis. In Elsevier (Ed.), *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (pp. 1512-1515): Saunders.
- Ralston, B. J., McAllister, T. A., & Olson, M. E. (2003). Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet Parasitol*, 114(2), 113-122.
- Raposo, J. C., Vieira, A. (2008). Coccidiose bovina: avaliação preliminar do tratamento preventivo. In A. P. Buiatria (Ed.), *XIII Jornadas da associação portuguesa de Buiatria*. Vilamoura - Portugal.
- Riggs, M. W. (1997). Immunology: Host Response and Development of Passive Immunotherapy and Vaccines. In R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* (pp. 129-161). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Riggs, M. W. (2002). Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes Infect*, 4(10), 1067-1080.
- Rosignol, J. F., Hidalgo, H., Feregrino, M., Higuera, F., Gomez, W. H., Romero, J. L., et al. (1998). A double-blind placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92(6), 663-666.
- Sanford, S. E., & Josephson, G. K. (1982). Bovine Cryptosporidiosis: Clinical and Pathological Findings in Forty-two Scouring Neonatal Calves. *Can Vet J*, 23(12), 343-347.
- Santín, M., Trout, J., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Journal of Parasitology*, 122(2), 103-117.
- Sartin, J. L., Shores, M. A., Schwartz, D. D., Kempainen, R. J., & Baker, J. (2000). Reduced growth of calves and its reversal by use of anabolic agents. *Domest Anim Endocrinol*, 19(2), 85-92.
- Schito, M. L., & Barta, J. R. (1997). Nonspecific immune responses and mechanisms of resistance to *Eimeria papillata* infections in mice. *Infect Immun*, 65(8), 3165-3170.
- Shi, M. Q., Hirzmann, J., Dafa'alla, T. H., & Zahner, H. (2001). In vivo expression profiles of cytokine and iNOS mRNAs in rats infected with *Eimeria separata*. *Vet Parasitol*, 97(2), 131-140.

- Sinks, G. D., Quigley, J. D., 3rd, & Reinemeyer, C. R. (1992). Effects of lasalocid on coccidial infection and growth in young dairy calves. *J Am Vet Med Assoc*, 200(12), 1947-1951.
- Slapeta, J. (2006). *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. *Trends Parasitol*, 22(10), 469-474.
- Stockdale, P. H. (1981). Effects of monensin on coccidiosis in ruminants. *Vet Med Small Anim Clin*, 76(11), 1575-1578.
- Svensson, C., Olofsson, H., & Ugglå, A. (1996). Immunisation of calves against *Eimeria alabamensis* coccidiosis. *Appl Parasitol*, 37(3), 209-216.
- Tapia, A. M., Álamo, C. F., García, C. L., & Casanova, P. M. (2006). *Brotos epidémicos de criptosporidiosis*. Acedido em Abril 5, 2008, em: [http://www.seimc.org/control/revi\\_Para/Brotcripto.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Para/Brotcripto.htm)
- Tee, G. H., Moody, A. H., Cooke, A. H., & Chiodini, P. L. (1993). Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J Clin Pathol*, 46(6), 555-558.
- Titchen, D. A. (1982). The role of hormones in the reaction of the host to enteric parasites. In D. F. D. Mettrick, S.S. (Ed.), *Parasites - their World and Ours* (pp. 245-247). Toronto: Elsevier.
- Traversa, D., Giangaspero, A., Molini, U., Iorio, R., Paoletti, B., Otranto, D., et al. (2004). Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from Chamelea gallina clams in Italy. *Appl Environ Microbiol*, 70(7), 4367-4370.
- Tzipori, S. (1983). Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol Rev*, 47(1), 84-96.
- Tzipori, S., & Griffiths, J. K. (1998). Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Adv Parasitol*, 40, 5-36.
- Tzipori, S., Smith, M., Halpin, C., Angus, K. W., Sherwood, D., & Campbell, I. (1983). Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Vet Rec*, 112(6), 116-120.
- Tzipori, S., & Ward, H. (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect*, 4(10), 1047-1058.
- Ungar, B. L. (1990). Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J Clin Microbiol*, 28(11), 2491-2495.
- Villacorta, I., Peeters, J. E., Vanopdenbosch, E., Ares-Mazas, E., & Theys, H. (1991). Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(2), 283-287.
- Weber, R., Bryan, R. T., Bishop, H. S., Wahlquist, S. P., Sullivan, J. J., & Juranek, D. D. (1991). Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J Clin Microbiol*, 29(7), 1323-1327.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., & Upton, S. J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev*, 17(1), 72-97.
- Yoder, J. S., & Beach, M. J. (2007). Cryptosporidiosis surveillance--United States, 2003-2005. *MMWR Surveill Summ*, 56(7), 1-10.

Young, K. H., Bullock, S. L., Melvin, D. M., & Spruill, C. L. (1979). Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol*, 10(6), 852-853.

#### IV. ANEXOS

##### Questionário

1. Existe história e diarreia na exploração? Neo-natal?
2. Em que idade?
3. Existe maternidade?                      Multipla ou individual?                      Outra? Qual?
4. Tipo de alojamento dos vitelos.
5. Características do piso e das paredes dos vitleiros.
6. São habitualmente administradas vacinas?                      Quais?
7. É dado colostro aos recém-nascidos.
8. Com quantos dias saem os vitelos das maternidades?
9. Como é feito o desmame?
10. De onde provém o abeberamento dos animais?
11. Sistema de abeberamento?
12. Há rios ou ribeiros por perto?
13. Para onde se dirigem as águas de escorrência da exploração?

**Tabela 12** – Dados relativos a cada amostra e contagem do número de oocistos de *Cryptosporidium* e de *Eimeria* encontrados pelas diferentes técnicas usadas

Amostra	Explr.	Idade	Fezes	<i>Eimeria spp</i>	<i>Cryptosporidium spp</i>		
				Willis	ED	Ritchie	Centrif.
43	A	22	SP	0	0	0	
45	A	20	SP	0	0	0	
48	A	30	SP	0	0	0	
49	A	31	SP	0	0	0	
54	A	27	SP	0	0	0	
55	A	17	SP	0	0	1	
57	A	15	SP	0	0	0	
2	A	28	P	0	0	0	
41	A	24	P	0	0	1	
1	A	17	D	0	0	0	
3	A	6	D	0	0	12	
4	A	13	D	0	10	22	
5	A	13	D	0	6	5	
6	A	14	D	0	0	0	
7	A	7	D	0	2	1	
8	A	5	D	0	0	0	
42	A	14	D	0	0	0	
44	A	24	D	0	0	0	
47	A	15	D	0	2	2	
52	A	13	D	0	110	114	
53	A	21	D	0	0	253	
56	A	17	D	0	38	256	
46	A	14	P	0	1	0	3
9	B	19	SP	0	0	0	
10	B	19	SP	0	0	11	
11	B	25	SP	0	0	8	
12	B	15	P	0	0	0	
13	B	22	P	0	0	0	
14	B	17	P	0	0	0	
15	B	5	D	0	1	0	5
16	C	5	SP	0	3	2	
17	D	8	P	0	0	0	
18	D	30	D	0	3	12	
19	D	8	D	41	6	6	
20	E	7	D	12	0	0	
88	E	8	D	0	163	541	
89	E	7	D	0	247	41	
90	E	9	D	0	144	264	
91	E	7	D	0	69	NE	102
23	F	2	P	0	0	0	
21	F	12	D	0	0	0	
22	F	2	D	0	0	0	
81	F	10	D	0	0	0	
82	F	10	D	0	22	151	
24	G	3	SP	1	0	0	
26	G	30	SP	0	0	0	
25	G	9	D	2	0	0	
69	G	30	D	0	0	NE	3

**Tabela 12 (continuação)** – Dados relativos a cada amostra e contagem do número de oocistos de *Cryptosporidium* e de *Eimeria* encontrados pelas diferentes técnicas usadas

Amostra	Explr.	Idade	Fezes	<i>Eimeria</i> spp	<i>Cryptosporidium</i> spp		
				Willis	ED	Ritchie	Centrif.
27	H	22	SP	0	6	10	
29	H	14	SP	0	0	0	
30	H	10	SP	0	0	4	
28	H	8	D	0	14	7	
79	H	8	D	0	121	753	
80	H	8	D	0	271	> 1000	
31	I	21	D	9	0	3	
32	I	12	D	0	0	0	
33	J	29	SP	45	0	0	
36	J	29	SP	16	2	6	
50	J	6	SP	0	37	68	
34	J	15	P	0	0	0	
35	J	14	D	0	6	3	
37	J	35	D	11	4	3	
38	J	38	SP	13	1	0	3
39	K	9	D	0	1	0	1
40	K	41	P	0	3	0	2
51	L	8	D	0	14	111	
95	M	16	D	0	0	NE	0
58	M	5	D	0	0	0	
59	N	7	D	0	3	41	
60	N	15	D	0	0	0	
61	O	8	D	0	53	NE	146
62	P	14	D	0	3	3	
64	Q	8	D	0	0	NE	25
65	Q	24	D	0	4	NE	10
63	Q	8	D	0	8	35	
67	R	31	D	202	0	NE	0
68	R	30	D	143	0	0	
71	S	47	SP	0	0	0	
73	S	42	SP	0	0	0	
72	S	42	P	0	0	0	
74	S	36	P	0	0	0	
70	S	50	D	0	36	32	
75	S	24	D	0	0	0	
77	T	15	SP	0	0	0	
76	T	14	P	0	0	0	
78	T	17	D	0	0	1	
83	U	5	SP	0	0	21	
84	U	7	P	0	0	0	
85	V	30	SP	0	0	7	
87	V	10	SP	0	0	0	
86	V	30	D	0	0	0	
92	W	21	D	0	0	3	
93	X	6	P	0	1	0	3
94	Y	6	D	0	112	21	170

**Tabela 12 (continuação)** – Dados relativos a cada amostra e contagem do número de oocistos de *Cryptosporidium* e de *Eimeria* encontrados pelas diferentes técnicas usadas

<b>Amostra</b>	<b>Explr.</b>	<b>Idade</b>	<b>Fezes</b>	<b>Willis</b>	<b>ED</b>	<b>Ritchie</b>	<b>Centrif.</b>
98	Z	8	SP	0	0	0	
99	Z	10	SP	0	3	4	
96	Z	10	D	0	0	0	
97	Z	10	D	0	29	79	
101	Z	10	D	0	42	NE	70
100	Z	10	D	0	0	0	
102	Z	10	D	0	1	0	4

Legenda:

**Amostra** – Número da amostra

**Explr.** – Exploração

**Idade** – Idade do animal no momento da recolha da amostra

**Fezes** – Tipo de fezes

**Willis** – Método de Willis

**ED** – Esfregaço fecal directo

**Ritchie** – Esfregaço fecal após concentração pelo método de Ritchie

**Centrif.** – Esfregaço fecal após concentração pelo método de centrifugação simples

Tabela 13 – Base de dados relativa ao questionário feito nas explorações

Expl.	HD	NN	Idade (d)	Maternidade	Tipo de alojamento	Vacinas
A	sim	sim	4	múltipla	Viteiro individual	IBR, BVD, PI-3, BRSV
B	sim	sim	8 a 15	múltipla	vit. individual + vit. comum	Rotavírus, E.coli (k99), Coronavírus
C	sim	sim	3	nao existe	Viteiro individual	IBR, BVD, PI-3, Leptospiroses
D	sim	sim	5	nao existe	em grupo s/A	nao
E	sim	sim	5	nao existe	corda c/ A	IBR, BVD, PI-3, BRSV
F	sim	sim	8	individual	Viteiro individual	IBR, BVD, PI-3, BRSV, Rotavírus, E.coli (k99), Coronavírus
G	sim	sim	5	nao existe	corda e em grupo s/ A	IBR, BVD, PI-3, BRSV
H	sim	sim	8	nao existe	corda s/A	IBR, BVD, PI-3, BRSV
I	sim	sim	5	nao existe	Viteiro individual	IBR, BVD, PI-3, BRSV
J	sim	sim	4	nao existe	corda s/A	IBR, BVD, PI-3, BRSV, Rotavírus, E.coli (k99), Coronavírus
K	sim	sim	8	individual	vit. individual ou em grupo	IBR, BVD, PI-3, BRSV
L	sim	sim	8	nao existe	Viteiro individual	nao
M	sim	sim	8 a 15	nao existe	corda c/ A	nao
N	sim	sim	6	nao existe	Viteiro individual	BVD
O	sim	sim	3	nao existe	corda c/ A	IBR, BVD, PI-3, Leptospiroses
P	sim	sim	8	nao existe	Viteiro individual	BVD
Q	sim	sim	3	nao existe	corda c/ A	nao
R	sim	sim	4	nao existe	em grupo s/ A	IBR, BVD, PI-3, BRSV
S	sim	sim	5	nao existe	em grupo s/ A	IBR, BVD, PI-3, BRSV
T	nao	nao		individual	Viteiro individual	IBR, BVD, PI-3, BRSV, Rotavírus, E.coli (k99), Coronavírus
U	sim	sim	5	nao existe	em grupo c/ A	IBR, BVD, PI-3, BRSV
V	sim	sim	3	nao existe	em grupo s/ A	IBR, BVD, PI-3, BRSV
W	sim	sim	8	nao existe	corda s/A	IBR, BVD, PI-3, BRSV
X	sim	sim	8	múltipla	corda s/A	IBR, BVD, PI-3, BRSV
Y	nao	nao		nao existe	em grupo c/ A	nao
Z	sim	sim	8	nao existe	corda s/A	IBR, BVD, PI-3, BRSV

Tabela 13 (continuação) - Base de dados relativa ao questionário feito nas explorações

Expl.	Solo e paredes do vitéleiro	Prov. Abeb.	Sist. Abeb.	Rios/ribeiros	Escurrência
A	ripado c/palha + cimento	furo	balde suspenso	nao	fossa
B	Terra c/ palha + madeira	furo	balde no chao	nao	fossa
C	cimento c/ mato + cimento	furo	bebedouro	sim	fossa
D	cimento c/ mato + cimento	furo	bebedouro	nao	fossa
E	cimento c/ mato + cimento	furo	bebedouro	nao	fossa
F	ripado c/palha + cimento	furo	balde suspenso	nao	fossa
G	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	nao	fossa
H	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	nao	fossa
I	ripado c/palha + cimento	furo	balde suspenso	nao	fossa
J	cimento c/ palha + cimento	furo	balde suspenso	nao	fossa
K	cimento c/ palha + cimento	furo	balde suspenso	sim	fossa
L	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	sim	fossa
M	cimento c/ mato + cimento	poço	balde no chao	nao	fossa
N	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	nao	fossa
O	cimento c/ mato + cimento	furo	balde no chao	sim	fossa
P	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	sim	fossa
Q	cimento c/ palha + cimento	poço	balde no chao	nao	fossa
R	cimento c/ palha + cimento	poço	balde no chao	sim	fossa
S	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	nao	fossa
T	ripado c/palha + cimento	furo	balde suspenso	nao	fossa
U	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	nao	fossa
V	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	nao	fossa
W	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	nao	fossa
X	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	nao	fossa
Y	cimento c/ palha + cimento	poço	balde no chao	nao	fossa
Z	cimento c/ palha + cimento	furo	balde no chao	sim	fossa

Legenda:

**Expl.-** Exploração

**HD** – História de diarreia

**NN** – História de diarreia neo-natal

**Idade** – em que idade se inicia a diarreia

**Maternidade** – Tipo de maternidade

**Vacinas** – Prática de vacinação e quais os agentes

**Prov. Abeb.** – proveniência do abeberamento dos animais

**Sist. Abebe.** – Sistema de abeberamento

**Rios/ribeiros** – existência de cursos de água próximo das explorações

**Escurrência** – pr onde vão as águas de escurrência das explorações

**corda s/A=** presos à corda separados dos adultos

**corda+adultos=** presos à corda junto aos adultos

**em grupo s/ A=** alojados em grupo, separados dos adultos

**grupo+adultos =** vitelos juntos com os adultos

**Tabela 14** – Comparação dos resultados positivos e negativos pela técnica de esfregaço fecal directo (ED) dentro dos animais nascidos nos diferentes tipos de maternidades

		Maternidade			
		individual	múltipla	nao existe	Total
<b>ED</b>	Negativo	7	22	32	61
	Positivo	3	9	28	40
	Total	10	31	60	101

**Tabela 15** – Comparação dos resultados positivos e negativos nos animais, pela técnica de esfregaço fecal directo (ED), dentro dos diferentes tipos de sistemas de abeberamento

		Sistema de abeberamento			
		balde no chao	balde suspenso	bebedouro	Total
<b>ED</b>	Negativo	32	27	2	61
	Positivo	18	15	7	40
	Total	50	42	9	101

**Tabela 16** – Comparação dos resultados positivos e negativos dos animais, pelo método de willis, dentro dos diferentes tipos de solos e paredes dos viteiros

		Solo e parede dos viteiros (Solo + Parede)				
		Terra c/ palha + Madeira	Cimento c/ mato + Cimento	Cimento c/ palha + Cimento	Ripado c/ palha + Cimento	Total
<b>Willis</b>	Negativo					
	nº animais	7	10	41	32	90
	%	100.0%	83.3%	83.7%	97.0%	89.1%
	Positivo					
	nº animais	0	2	8	1	11
	%	0%	16.7%	16.3%	3.0%	10.9%
<b>Total</b>	nº animais	7	12	49	33	101
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

**Tabela 17** – Comparação dos resultados positivos e negativos dos animais, pelo método de willis, dentro dos diferentes tipos de sistemas de abeberamento

			Sistema de abeberamento			
			balde no chão	balde suspenso	bebedouro	Total
<b>Willis</b>	Negativo	n° de animais	46	37	7	90
		%	92.0%	88.1%	77.8%	89.1%
	Positivo	n° de animais	4	5	2	11
		%	8.0%	11.9%	22.2%	10.9%
	Total	n° de animais	50	42	9	101
		%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%