



LAÍS MARIA VIANA

**PESQUISA DE INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* sp.,
ACHADOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
LESÕES ASSOCIADAS EM BEZERROS**

RESEARCH FOR INFECTION BY *Cryptosporidium* sp.,
EPIDEMIOLOGICAL and CLINICAL FINDINGS and associated
lesions IN CALVES

**LAVRAS - MG
2023**

LAÍS MARIA VIANA

**PESQUISA DE INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* sp,
ACHADOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E LESÕES ASSOCIADAS EM
BEZERROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Animal, para obtenção de título de Mestre.

Dra Angelica Terezinha Barth Wouters
Orientadora

**LAVRAS-MG
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Viana, Laís Maria.

Pesquisa de infecção por *Cryptosporidium* sp., achados
epidemiológicos, clínicos e lesões associadas em bezerros / Laís
Maria Viana. - 2023.

55 p. : il.

Orientador(a): Angelica Terezinha Barth Wouters.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Diarreia. 2. Lactente. 3. Protozoário. I. Barth Wouters,
Angelica Terezinha. II. Título.

LAÍS MARIA VIANA

**PESQUISA DE INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* sp,
ACHADOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E LESÕES ASSOCIADAS EM
BEZERROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Animal, para obtenção de título de Mestre.

Aprovada em 22/08/2023

Dra. Angelica T. Barth Wouters – UFLA
Dr. Flademir Wouters – UFLA
Dra. Bruna Resende Chaves - UNILAVRAS

Prof(a) Dra Angelica Terezinha Barth Wouters
Orientadora

**LAVRAS-MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Com muita satisfação e alegria, a mais uma oportunidade e a mais uma etapa vencida, agradeço primeiramente ao meu Divino Protetor Deus e aos meus guias/guardiões de iluminação que me permitiram alcançar esse propósito.

Gratidão à minha mãe Maria Aparecida, ao meu pai Fábio Quintino Viana e à minha irmã, Cintia Clara Viana, por todo apoio, na forma de amor, incentivo e pela confiança em minha capacidade pessoal e profissional. Vocês são os canais pelo qual me inspiro diariamente e de onde retiro toda minha força para continuar a jornada. Em honra aos meus avós Benedito Quintino (*in memoriam*), Francisco Costa (*in memoriam*), Regina Viana (*in memoriam*) e Terezinha Maria.

Aos meus tios, padrinhos e primos, que me incentivam na caminhada diária, me motivaram e me fizeram acreditar que tudo é possível, seja como referência, apoio ou incentivo.

Agradeço aos meus amigos, desde os amigos da infância, da graduação, da residência e dos amigos recentes, que sempre incentivaram e torceram por minhas conquistas e por estarem presentes em momentos importantes desta caminhada.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, a todos os professores e instituições de ensino que frequentei, pela contribuição como cidadã, ser humano e profissional. Agradeço também ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFLA pela oportunidade. O agradecimento se estende, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)”.

A quem me proporcionou guia e acolhimento desde o início dessa jornada até o final, minha orientadora Professora Dra. Angélica T. Barth Wouters, gratidão e honra pelo tempo que caminhamos juntas, pelo cuidado ao compartilhar conhecimento e pela paciência no processo. A todos da equipe do Setor de Patologia Veterinária – UFLA, aos professores Flademir, Djeison e Mary, quanta satisfação tive em aprender com vocês. Aos funcionários do Departamento da Medicina Veterinária que me acompanharam, em especial ao Sr. Francisco, pela alegria compartilhada ao falar com tanta sabedoria. À Dona Lúcia, por estar orando por mim. Aos alunos e estagiários, tão queridos e essenciais na rotina, agradeço pela amizade que fizemos ao longo dos semestres, pelo companheirismo e à constante oportunidade de aprendizado e crescimento.

Por fim, agradeço à Santa Luzia, por me permitir enxergar somente o que é necessário e o que é luz, por me fazer florir onde plantou, e a São Francisco de Assis, por simbolizar e ensinar o amor, respeito e proteção a todos os animais.

Gratidão eterna!

RESUMO

As afecções intestinais que cursam com diarreia em bezerros são complexas e multifatoriais. Nos últimos anos o protozoário *Cryptosporidium* sp. tem recebido destaque como causa de doença em bezerros nas primeiras semanas após o nascimento. Esse coccídio pode agir como agente primário ou associado a enteropatógenos como Rotavírus, Coronavírus, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Das 38 espécies de *Cryptosporidium* relatadas quatro infectam bovinos; *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae*, com variações em faixa etária dos animais afetados e localização no sistema digestório. Bezerros recém-nascidos demonstram alta suscetibilidade a *C. parvum*, apontada como importante causa de diarreia e elevadas taxas de eliminação em torno dos 15 dias de idade, além de ter potencial zoonótico. *C. parvum* se liga a enterócitos de jejuno e íleo, levando a atrofia de vilosidades, bem como se liga a criptas colônicas. O objetivo do trabalho foi identificar ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* sp. em bezerros de até 12 meses de idade encaminhados para necrópsia no Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (SPV-DMV-FZMV-UFLA), por meio da citologia e da histopatologia, identificar lesões associadas e se a criptosporidiose foi a causa da morte dos bezerros. Foram examinados bezerros de até 12 meses, com histórico de diarreia ou não, encaminhados ao SPV-DMV-FZMV-UFLA, provenientes de propriedades das regiões Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais, no período de abril de 2021 a maio de 2023. Amostras de conteúdo intestinal foram colhidas na necrópsia, centrifugadas e o sedimento distendido sobre lâminas de microscopia, que foram secadas, fixadas com metanol, coradas na técnica de Ziehl Neelsen modificada (ZNM) e então avaliadas em microscópio de luz, com classificação da intensidade de infecção. Fragmentos de intestino delgado e grosso e demais órgãos e tecidos foram colhidos, fixados em formol a 10% tamponado, processados para histopatologia e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica. A técnica histoquímica de Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi usada para evidencição de *Cryptosporidium* sp. nos cortes histológicos de intestino. No período do estudo foram necropsiados 85 bezerros de até 12 meses, com predomínio de fêmeas, raça Holandês, criação intensiva com manutenção de bezerros lactentes em baias individuais e/ou coletivas. Em nove bezerros foram observadas estruturas de *Cryptosporidium* sp. na microscopia. Os bezerros positivos tinham seis a 21 dias de idade. A coloração de ZNM evidenciou as estruturas do protozoário no conteúdo intestinal, sendo uma técnica interessante para o diagnóstico da infecção. Na avaliação histológica em HE foram observadas estruturas do protozoário na superfície das vilosidades intestinais, arredondadas e fracamente basofílicas e o PAS foi uma ferramenta útil para evidencição dessas estruturas, que se coraram em azul a arroxeado. Os resultados evidenciaram que, apesar de *Cryptosporidium* sp. ser um patógeno frequentemente mencionado como causa de diarreia em bezerros, principalmente lactentes e em rebanhos leiteiros, a infecção não foi a causa mais importante de doença e morte, mesmo em bezerros de até 30 dias, considerados os mais suscetíveis.

Palavras-chave: Diarreia. Lactente. Protozoário. Ziehl Neelsen. Ácido Periódico de Schiff. Halofuginona.

ABSTRACT

Intestinal disorders that course with diarrhea in calves are complex and multifactorial. In recent years the protozoan *Cryptosporidium* sp. has emerged as an important cause of disease in calves in the first weeks after birth. This coccidian can act as a primary agent or in conjunction with enteropathogens such as Rotavirus, Coronavirus, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. Of 38 reported species of *Cryptosporidium*, four cause infection in cattle; *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* and *C. ryanae*, with variations in age of the affected animals and location in digestive tract. Newborn calves are more susceptible to *C. parvum*, identified as an important cause of diarrhea and high elimination rates around 15 days of age, in addition to its zoonotic potential. *C. parvum* binds to jejunal and ileal enterocytes, leading to villous atrophy, and binds to crypts in the colon. The aim of this study was to identify infection by *Cryptosporidium* sp. in calves up to one year of age sent for necropsy at the Veterinary Pathology Sector of the Department of Veterinary Medicine of the Faculty of Zootecnics and Veterinary Medicine of the Federal University of Lavras (SPV-DMV-FZMV-UFLA), through cytology and histopathology, identify related lesions, and whether cryptosporidiosis was the cause of death. Calves up to 12 months of age with a history of diarrhea or not, sent to the SPV-DMV-FZMV-UFLA, from properties of the Campo das Vertentes, South and Southwest regions of Minas Gerais, from April 2021 to May 2023 were examined. Samples of intestinal content were collected at necropsy, centrifuged and the sediment distended on microscopy slides, which were dried, fixed with methanol, stained with the modified Ziehl Neelsen technique (ZNM), and then, evaluated under a light microscope, with classification of the intensity of infection. Intestine fragments and other organs and tissues were collected, fixed in 10% buffered formalin, processed for histopathology and stained with hematoxylin and eosin (HE) for microscopic analysis. The Periodic Acid-Schiff (PAS) histochemical technique was used to demonstrate *Cryptosporidium* sp. in histological gut sections. During the study, 85 calves of up to 12 months of age were necropsied, with a predominance of females, Holstein breed and intensive rearing, with suckling calves kept in individual and collective pens. Structures of *Cryptosporidium* sp. were found in nine calves at microscopic evaluation. All positive calves were six to 21 days old. The ZNM staining clearly showed the protozoan in the intestinal contents, being an interesting technique for the diagnosis of the infection. In the histological evaluation in HE, structures of the protozoan were observed on the surface of the intestinal villi, rounded and weakly basophilic, and the PAS staining was a useful tool for highlighting these structures, which were stained in blue to purplish. The results showed that, although *Cryptosporidium* sp. is a pathogen often mentioned as a cause of diarrhea in calves, especially suckling calves of dairy herds, the infection was not the most important cause of illness or death, even in calves up to 30 days old, considered the most susceptible.

Keywords: Diarrhea. Suckling. Protozoan. Ziehl Neelsen. Periodic Acid Schiff. Halofuginone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> sp.	13
Figura 2 - Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. evidenciados pela coloração de Ziehl Neelsen modificada, em conteúdo intestinal de bezerros necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023	32
Figura 3 - Evidenciação de estruturas de <i>Cryptosporidium</i> sp. em corte histológico de intestino de bezerro diagnosticado com infecção por <i>Cryptosporidium</i> sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023	33
Figura 4 - Achados em parede intestinal na necrópsia em bezerra diagnosticada com infecção por <i>Cryptosporidium</i> sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023	34
Figura 5 - Achados externos em necrópsia de bezerro diagnosticado com infecção por <i>Cryptosporidium</i> sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA	35
Figura 6 - Torção intestinal em necrópsia de bezerro diagnosticado com infecção por <i>Cryptosporidium</i> sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA	36
Figura 7 - Morfologia de <i>Cryptosporidium</i> sp. em corte histológico de intestino de bezerro diagnosticado criptosporidiose no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023	37
Figura 8 - Úlcera abomasal perfurada em bezerro diagnosticado com infecção por <i>Cryptosporidium</i> sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA	38
Figura 9 - Alterações pós-mortais em intestino delgado de bezerro diagnosticado com infecção por <i>Cryptosporidium</i> sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA	39

LISTA DE GRÁFICOS E QUADROS

Gráfico 1 - Idade dos bezerros necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023	27
Gráfico 2 - Sexo e raça dos bezerros necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023	27
Gráfico 3 - Procedência dos bezerros necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023	28
Quadro 1 - Informações epidemiológicas e clínicas dos bezerros positivos para <i>Cryptosporidium</i> sp. em exame microscópico no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023	29
Quadro 2 - Bezerros positivos para <i>Cryptosporidium</i> sp. em exame microscópico no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023 e o diagnóstico final	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	<i>Cryptosporidium</i> sp.....	12
2.2	Criptosporidiose em bezerros.....	14
2.3	Epidemiologia e fatores predisponentes	15
2.4	Demais enteropatógenos envolvidos	19
2.5	Patogenia e sinais clínicos	20
2.6	Achados de necrópsia e lesões histopatológicas	21
2.7	Medidas de tratamento e controle.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Necrópsia	25
3.2	Exame citopatológico: Coloração especial de Ziehl Neelsen Modificado	25
3.3	Coleta, fixação e processamento para exame histopatológico	25
3.4	Coloração histoquímica de Ácido Periódico de Schiff	26
4	RESULTADOS	27
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

As causas de diarreia em bezerros são complexas e multifatoriais, destacando-se na literatura dos últimos anos o protozoário *Cryptosporidium* sp. (ASSIS-BRASIL et al., 2013). São descritas quatro espécies deste coccídio em bovinos; *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae*. Destes, *C. parvum* mostrou, em diferentes estudos, suscetibilidade marcada de infecção em bezerros lactentes (OUAKLI et al., 2018). São relatadas taxas elevadas de eliminação do parasito em bezerros aos 15 dias de idade, além de infecções concomitantes com bactérias, como *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., ou vírus, como Rotavírus e Coronavírus, que exacerbam a gravidade da diarreia (FEITOSA et al., 2008; BLANCHARD, 2012; CARVALHO et al., 2014; MARTIN et al., 2020).

As causas de diarreia em bezerros de até 21 dias de idade podem resultar taxas de morbidade de 90 a 100%. Já a taxa de mortalidade descrita para esta fase é de aproximadamente 50 a 75%, com pico de óbitos em torno dos 19 dias, no entanto, *Cryptosporidium* sp. é considerado importante causa de morbidade e mortalidade em bezerros de até um mês de idade, impactando o sistema de criação (CARVALHO et al., 2014; WINDEYER et al., 2014; OUAKLI et al., 2018).

Estudos demonstraram que *C. parvum* se liga às células epiteliais das vilosidades intestinais levando-as a atrofia, bem como se liga às criptas do cólon, com infiltrado inflamatório de neutrófilos. Podem também ocorrer hiperemia e congestão, além de ulcerações multifocais a disseminadas na mucosa intestinal (MOHTESHAMUDDIN et al., 2020). Os estágios do ciclo biológico do parasito ocorrem nos enterócitos principalmente do jejuno e do íleo (SANFORD; JOSEPHSON, 1982). No entanto, a histopatologia de amostras intestinais colhidas na necrópsia deve incluir seções de duodeno, jejuno e íleo, além de amostras de cólon descendente (BLANCHARD, 2012).

Apesar da frequência da infecção por *Cryptosporidium* sp. ser considerada elevada em bezerros, informações sobre a epidemiologia e a identificação das causas da diarreia em bezerros se faz necessária em Minas Gerais. O número de casos de casos sem diagnóstico definido, com queixa de manifestação de diarreia nas propriedades leiteiras e de casos de bezerros com diarreia encaminhados para atendimento clínico e necrópsia nas dependências do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA é alto e demonstra a necessidade de pesquisas nesta área.

Os resultados da pesquisa de agentes causadores de diarreia associada ao estudo das lesões e às informações clínicas e epidemiológicas devem contribuir para o conhecimento das causas de diarreia em bezerros, bem como para a sua prevenção e o controle. Além disso,

deve ser considerada a relevância da infecção por *Cryptosporidium* sp. para a saúde pública, por ser uma zoonose.

O produtor é penalizado pelas perdas econômicas relacionadas a doença e morte de animais, gastos com uso de fármacos antiparasitários e antimicrobianos, muitas vezes indiscriminado, por não haver diagnóstico da causa da diarreia e uso de tratamentos sem eficiência comprovada.

A complexidade da etiologia da diarreia em bezerros lactentes tem sido a base para discussões sobre o benefício do uso de antimicrobianos e antiparasitários e outros fármacos empregados como antidiarreicos (MARTIN et al., 2020). Dessa forma, o conhecimento sobre a patogenia das diarreias, bem como a identificação dos enteropatógenos envolvidos, é de extrema importância para que os médicos veterinários adotem condutas adequadas de tratamento, prevenção e controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Cryptosporidium* sp.

Taxonomicamente, *Cryptosporidium* sp. pertence ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa (que possui um complexo apical), Classe Sporozoa (que se reproduz por ciclos assexuados e sexuados, com formação de oocistos), Subclasse Coccidia (com ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia), Ordem Eucoccidiida (na qual ocorre esquizogonia ou merogonia), Subordem Eimeriina (na qual se desenvolvem micro e macrogamia independentes), Família Cryptosporidiidae e Gênero *Cryptosporidium* (TZIPORI; WARD, 2002).

O gênero *Cryptosporidium* é encontrado mundialmente e tem grande importância na saúde pública, principalmente em países da América do Sul, onde altas taxas de infecção são geralmente relatadas em crianças e pessoas imunocomprometidas, incluindo pacientes HIV+. Oocistos de *Cryptosporidium* são notavelmente resistentes a desinfetantes e podem ser detectados em água potável e alimentos. Se esses oocistos não são inativados é facilitada a transmissão fecal-oral entre animais e humanos (BLANCHARD, 2012; LEITCH; HE, 2012).

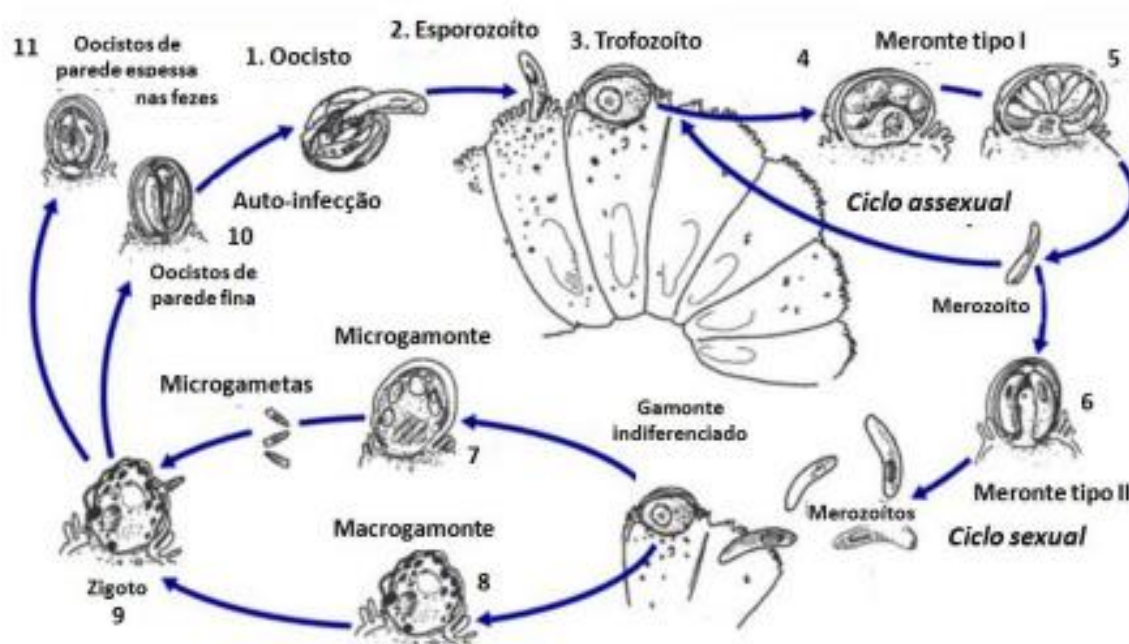
As espécies *C. parvum* e *C. hominis* (espécie antroponótica) são as mais envolvidas em infecções humanas, porém outras, como *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris*, *C. felis* e *C. viatorum* também foram relatadas em transmissão de animais para humanos (FREDES; RAFFO; MUÑOZ, 2007; AVENDAÑO et al., 2018).

O ciclo biológico de *Cryptosporidium* é característico de um protozoário coccídio. Seu ciclo é monoxeno, isto é, ocorre em um único hospedeiro, com duração de 2 a 8 dias e possui vários estágios de desenvolvimento (FIGURA 1). Há estágios de reprodução assexuada (cissiparidade múltipla), com esquizogonia ou merogonia e duas gerações de esquizontes, seguidos de multiplicação sexuada (gametogonia), com formação de macro e microgametócitos (FAYER et al., 1986; TZIPORI; WARD, 2002).

O ciclo se inicia com a liberação de oocistos para o ambiente por um hospedeiro definitivo. Os oocistos constituem a forma infectante e contém quatro esporozoítos, que estão protegidos e nutridos (SILVA JÚNIOR et al., 2011; LEITCH; HE, 2012). A infecção ocorre pela ingestão desses oocistos por um hospedeiro definitivo. Após a ingestão os oocistos percorrem o trato gastrointestinal até que ocorra a excitação, processo resultante da ação de proteases do parasito e de sais biliares e/ou proteases do intestino delgado do hospedeiro definitivo (SMITH; NICHOLS; GRIMASON, 2005), permitindo a liberação dos esporozoítos através de uma sutura linear que abrange um terço da metade da parede do oocisto, característica única do agente (PETRY, 2004). Fayer (2008) descreve detalhes das

características dos oocistos; paredes contínuas, exceto no local onde há uma sutura única, local de liberação dos quatro esporozoítos infetantes. A parede exterior provavelmente é rica em material glicoproteico e a camada central de composição lipídica e glicoproteica. Existe um certo grau de rigidez e é característica do gênero *Cryptosporidium* a afinidade ao corante álcool ácido-resistente, devida às características de suas paredes.

Figura 1 – Ciclo biológico de *Cryptosporidium* sp.



Fonte: Adaptado de <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>. Acesso em 16 de agosto de 2023.

Os esporozoítos são liberados especialmente em jejuno e íleo, com adesão e invasão da porção apical dos enterócitos. Depois ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo ao redor do parasito e o desenvolvimento intracelular do trofozoíto, o estágio subsequente. O trofozoíto é classificado como estágio típico de localização intracelular peculiar, que ocorre dentro da membrana plasmática, porém extracitoplasmático (FAYER et al., 1997; TZIPORI; WARD, 2002).

Os trofozoítos produzem dois tipos de merontes, por proliferação/reprodução assexuada. Esta compreende a diferenciação para formas de meronte tipo I e posterior produção de merozoíto, que se diferencia em meronte tipo II, fazendo a liberação de novos merozoítos, até chegar ao estágio de gamonte indiferenciado (THOMPSON, 2003; LEICHT; HE, 2012; UZAL et al., 2016).

A reprodução passa a ser sexuada quando os gamontes se diferenciam em macrogamontes e microgamontes e (gametas feminino e masculino, respectivamente). Da reprodução sexuada resulta a formação dos zigotos, produtos da fertilização dos macrogametas pelos microgametas. Os zigotos amadurecem em oocistos, totalmente esporulados (esporulação endógena) e infectantes (THOMPSON, 2003; RYAN; HIJJAWI, 2015). Cerca de 20% dos oocistos produzidos são de parede fina, com poder de causar autoinfecção, perpetuando o ciclo no mesmo hospedeiro. Os demais oocistos produzidos (cerca de 80%) têm parede espessa e são liberados no ambiente com as fezes, diarreicas ou não (LEITCH; HE, 2012). Em ambiente úmido e livre de ação solar direta os oocistos podem permanecer viáveis por vários meses. Eles são muito resistentes; somente temperaturas abaixo de 0°C e acima de 65°C podem inativá-los e são relatadas formas de sobrevivência até mesmo nestas condições extremas (FOREYT, 1990; ROBERTSON et al., 1992).

Os oocistos de parede espessa podem ter duas ou três camadas na parede, distintas entre si, que mantêm rigidez e plasticidade (FIGURA 1). A formação inicia pela camada interna, relativamente espessa e composta por glicoproteína filamentosa. A segunda camada, mediana ou central, tem rigidez evidente e é composta por um lipídio complexo, associado a uma estrutura de membrana de dupla unidade. Por fim, a camada externa é rica em glicoproteína ácida. A coloração em vermelho ácido-resistente dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. intactos é resultado da estrutura multicamada de sua parede. Essa característica é visualizada por meio de colorações especiais, as quais destacam a presença de lipídios, o que também é observado em paredes lipídicas de micobactérias (UZAL et al., 2016).

2.2 Criptosporidiose em bezerros

São relatadas quatro espécies de *Cryptosporidium* sp. em bovinos; *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni*, com infecção em diferentes faixas etárias e localizações no trato gastrointestinal (LICHTMANNSPERGER et al., 2020). De maneira geral, *C. parvum* e *C. bovis* são responsáveis por mais de 90% das infecções bovinas. Apesar de *C. parvum* ter o maior potencial zoonótico, *C. bovis* e *C. andersoni* foram ocasionalmente relatadas em humanos, embora não contribuam significativamente para a zoonose (AVENDAÑO et al., 2018; LICHTMANNSPERGER et al., 2020).

A espécie *C. parvum* destaca-se como a única identificada em bezerros recém-nascidos na Argentina, no Brasil e em vários outros países. É considerada o principal agente enteropatógeno responsável por diarreias aquosas profusas e não-hemorrágicas,

compreendendo cerca de 85% das infecções intestinais. No entanto, sua prevalência diminui significativamente com a idade, representando apenas 1% das infecções em bezerros após o desmame (SANTÍN et al., 2004). A espécie é amplamente endêmica, com prevalência de até 100% dentro do rebanho, encontrada no intestino delgado de bezerros com menos de 21 dias de idade. Bezerros diarreicos e também bezerros sem sinais clínicos são considerados os principais reservatórios zoonóticos (AVENDAÑO et al., 2018; CARDOSO et al., 2008; LICHTMANNSPERGER et al., 2020).

As espécies *C. bovis* e *C. ryanae* são encontradas predominantemente nas fezes de bezerros após o desmame, na faixa etária de dois a 11 meses. A espécie *C. andersoni* também foi encontrada nas fezes de bezerros após o desmame, apesar de sua ocorrência ser mais registrada em bovinos adultos, porém com prevalência que varia de 0 a 2,1%, sendo localizada no lúmen de glândulas abomasais, sem prejuízos evidentes na vida produtiva e na saúde dos animais infectados (CARDOSO et al., 2008).

Além da variação quanto à infecção em faixas etárias distintas, as espécies são identificadas por variação em morfologia/tamanho dos oocistos. A espécie *C. ryanae* possui os menores oocistos relatados, com média de 3,73 x 3,16 µm. Por outro lado, *C. bovis* possui dimensões semelhantes a *C. parvum*, com média de 4,89 x 4,63 µm, dimensões estas menores que dos oocistos de *C. andersoni*, que têm 7,4 x 5,6 µm (FAYER et al., 2005; SILVERLÅS et al., 2013).

Em certas áreas da Suécia, da China e do Sudão, as espécies *C. ryanae* e *C. bovis* foram isoladas de bezerros clinicamente saudáveis e também de bezerros lactentes com diarreia (SILVERLÅS et al., 2013). Com exceção de *C. parvum*, as demais espécies são descritas como causa de manifestação clínica leve, com perda de peso e queda em produção leiteira quando ocorrem em animais adultos, porém não são suficientes para manifestação clínica grave (CARDOSO et al., 2008; FAYER et al., 2008).

2.3 Epidemiologia e fatores predisponentes

A disseminação dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. no ambiente, que os torna fonte de infecção, é influenciada por diversos fatores. A resistência desses oocistos permite sua sobrevivência prolongada no ambiente, o que, por sua vez, amplia a possibilidade de transmissão fecal-oral para bezerros suscetíveis. Bezerros infectados excretam quantidades variáveis de oocistos no ambiente, o que depende da frequência e da duração da diarreia. Nesse contexto, o sistema de criação desempenha papel significativo na epidemiologia da doença. Além disso, a idade do bezerro, que está diretamente relacionada ao sistema imunológico, é um fator

determinante para o desenvolvimento da criptosporidiose (FEITOSA et al., 2008; GARRO et al., 2016).

Portanto, o entendimento da epidemiologia desempenha papel crucial na investigação de casos de óbito de bezerros com manifestação clínica de diarreia (BLANCHARD, 2012). Quando são criados em bezerreiros coletivos, a veiculação do protozoário é facilitada pela aglomeração de animais. Silva Júnior et al. (2011) apontam que bezerros mantidos em abrigos coletivos têm risco aproximadamente cinco vezes maior de infecção por *Cryptosporidium* spp. em comparação com animais criados em baias individuais.

No Brasil, Botteon et al. (2008) afirmaram que propriedades que utilizam bezerreiros coletivos necessitam de maior frequência de higienização, pelo maior acúmulo de matéria orgânica. Porém, sabe-se que os oocistos liberados nas fezes são altamente resistentes às condições ambientais, podendo suportar condições extremas, até mesmo o tratamento de água para consumo humano ou animal com cloro e ozônio. Além disso, esses oocistos podem se manter por longos períodos, como meses, em estágio infectante. Portanto, apenas a higienização mais frequente pode não garantir maior eficiência do sistema de criação ao reduzir o aporte de agentes infecciosos. Vale lembrar que o manejo de criação envolve também efeitos estressantes e/ou competição entre animais nas instalações coletivas.

Em relação à alimentação, bezerros lactentes podem receber colostro ou leite de maneira natural ou artificial, seja por meio de mamadeiras, baldes ou sondagem gástrica (quando necessária). No entanto, estudos indicam que a ocorrência de diarreia é maior em bezerros aleitados de forma artificial do que naqueles aleitados de forma natural. Essa divergência de informação pode estar associada às condições de higiene/asepsia dos equipamentos usados para ministrar colostro e leite. A ausência de controle da carga microbiana patogênica aumenta a suscetibilidade à infecção e, consequentemente, à diarreia (BOTTEON et al., 2008).

Nesse contexto, a ingestão *ad libitum* de substitutos de leite também se mostrou um potencial fator de risco para a diarreia. Esse risco está diretamente ligado ao aleitamento coletivo de bezerros, uma vez que a prática facilita a transmissão de agentes patogênicos devido à proximidade entre animais e à possível contaminação de recipientes (CURTIS et al., 2016). Em contrapartida à comparação com o aleitamento natural, Romero et al. (2001) destacam que os tetos da vaca podem ser potencial fonte de infecção, pois podem veicular oocistos de *Cryptosporidium* spp., que são ingeridos pelo bezerro ao consumir colostro ou leite.

No que diz respeito à vaca como fonte de infecção, observa-se relação sólida entre o local e as estações de parição. Conforme apontado por Millemann (2009), propriedades que concentram os partos em um período curto e local específico, como piquetes de maternidade, podem enfrentar surtos de infecção por agentes enteropatogênicos que se acumulam no ambiente. Esse enfoque é corroborado por Chartier et al. (2013), que destacam maior ocorrência de diarreia em bezerros de fazendas que optam por baias de maternidade para os partos. Nesse cenário aumenta a exposição aos oocistos de *Cryptosporidium* sp., especialmente quando os partos são sazonais. A criptosporidiose clínica surge então no final do período de parição, em conjunto com outros patógenos intestinais.

Uma relação se estabelece entre os locais de parto e a transmissão quando não há higienização adequada do local entre os partos, com agravamento quando há compartilhamento da área por animais doentes. Consequentemente, a detecção da criptosporidiose em bezerros com 3 a 4 dias de idade sugere contaminação ambiental no local de nascimento. Isso está em consonância com o período de incubação do parasito, estimado em 3 a 4 dias, até o surgimento dos sinais clínicos (CHARTIER et al., 2013; KLEIN-JÖBSTL et al., 2014).

Nesse contexto Muñoz et al. (2014) relatam detecção de oocistos do protozoário em um bezerro de um dia de idade com diarreia seguida de morte. Esse achado condiz com o de Diaz-Lee et al. (2010), que descrevem dois bezerros positivos para criptosporidiose no dia do nascimento, ou seja, antes de transcorrido o período de incubação. A justificativa para esses achados é descrito por Romero et al. (2001), ao considerarem os tetos da mãe como principal fonte de infecção, devido à veiculação dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. Segundo Muñoz et al. (2014), a eliminação de oocistos antes de completar o ciclo biológico do protozoário se deve ao papel do hospedeiro de trânsito, aquele que se infecta no primeiro dia, alberga o parasito e o elimina diretamente nas fezes. Entretanto, os mesmos autores acreditam na possibilidade de existirem outras vias de transmissão, porém devem ser mais estudadas.

De acordo com Curtis et al. (2016), a ocorrência de diarreia em bezerros nas primeiras semanas após o nascimento é mais provável quando são criados em baias coletivas. É inegável que bezerros recém-nascidos podem manter sua saúde quando não compartilham o ambiente com indivíduos mais velhos, os quais podem excretar altas concentrações de agentes infecciosos prejudiciais. Bezerros expostos a concentrações mais baixas de patógenos frequentemente têm sinais clínicos discretos ou podem até serem subclínicos. No entanto, esses bezerros têm o potencial de excretar patógenos em grandes quantidades, resultando em contaminação ambiental significativa (LARSON; TYLER, 2005).

Considerando as superlotações, em regiões com clima frio a doença tem maior ocorrência no inverno, quando os bezerros são confinados em espaços reduzidos, favorecendo a disseminação de oocistos e, conseqüentemente, a sua ingestão. Por outro lado, Vargas Junior et al. (2014) descreveram um surto na primavera, mas se tratava de época de parição em criação extensiva na região Sul do Brasil. Na época de parição as vacas eliminam maior quantidade de oocistos nas fezes e os autores observaram que os bezerros que nasciam na mesma área se infectavam pela ingestão de oocistos durante a sucção nos tetos das mães ou, quando do aleitamento por mamadeiras ou baldes, sem a sua devida desinfecção. Desde que animais adultos são considerados fontes de infecção para o ambiente e para o resto do rebanho, atenção deve ser dada para essa categoria, pois se comportam como hospedeiros sem manifestar sinais clínicos da doença (MUÑOZ et al., 2014; VARGAS JUNIOR et al., 2014).

Silva Júnior et al. (2011) observaram que bezerras que permaneciam em piquete maternidade além de 12h após o nascimento tiveram maior risco de infecção por *Cryptosporidium* spp. e também por *Giardia duodenalis*, comparados com bezerros removidos do local antes de transcorridas 12h do nascimento. Vale lembrar que animais adultos, que normalmente não manifestam a forma clínica da infecção por *C. parvum* e têm predisposição para infecção por *C. bovis* e *C. andersoni*, são considerados fontes de contaminação ambiental e de infecção para o resto do rebanho (VARGAS JUNIOR et al., 2014).

Cursos d'água superficiais constituem potencial fonte de infecção para o gado. Além disso, a qualidade da vegetação e do solo devem ser consideradas, principalmente quando compartilhados com fazendas próximas e com criação extensiva de bovinos. Portanto, é recomendada a análise desses quesitos, a fim de alertar quanto a medidas preventivas necessárias para evitar a disseminação do agente entre animais, além da transmissão para pessoas próximas e diminuir, conseqüentemente, prejuízos sanitários e econômicos (MUÑOZ et al., 2014).

Devido à sua resistência no ambiente, *Cryptosporidium* sp. pode permanecer no solo por vários meses, principalmente no verão, sendo também altamente resistente a desinfetantes, o que dificulta a descontaminação ambiental e perpetua a infecção em humanos e animais (VARGAS JUNIOR et al., 2014). Botteon et al. (2008) demonstraram que a diarreia foi mais frequente em bezerros em instalações limpas ocasionalmente do que naquelas com limpeza mais frequente. Desse modo mostraram a importância de bons

procedimentos de higiene nas instalações para bezerros.

Apesar da indústria pecuária demonstrar grandes melhorias tecnológicas, as causas de diarreia de bezerros ainda são preocupantes para produtores e Médicos Veterinários. No entanto, é possível reduzir a frequência da diarreia em bezerros com base em medidas preventivas, agindo em biossegurança, imunidade, boa nutrição e bem-estar animal (COURA et al., 2014).

2.4 Demais enteropatógenos envolvidos

A infecção de bezerros por *Cryptosporidium* spp. pode resultar em doença aguda grave sem associação com outros patógenos. Sabe-se que *C. parvum* frequentemente age como agente primário, mas outrora se comporta como oportunista, em conjunto com outros enteropatógenos, não pela interação do parasito com a população bacteriana, mas sim pelo dano à integridade do epitélio intestinal (RADOSTITS et al., 2007; VARGAS JUNIOR et al., 2014).

Em bezerros neonatos e lactentes infectados por *C. parvum* foram observados danos às microvilosidades na superfície dos enterócitos devidos ao seu crescimento, levando a suscetibilidade a infecções concomitantes por *Fusobacterium* sp. (ICHIKAWA-SEKI et al., 2019). Infecções por bactérias como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e patótipos de *E. coli* também podem ser frequentes.

A salmonelose ocorre em bezerros de duas a seis semanas de idade, principalmente, sendo mais comuns os sorotipos Dublin e Typhimurium, embora outros sorotipos também possam infectar bezerros, os quais podem manifestar diferentes sinais clínicos. *Salmonella* spp. apresentam etiopatogenia complexa, envolvendo inflamação e necrose em mucosa intestinal (COURA et al., 2014).

Escherichia coli enterotoxigênica comumente infecta bezerros recém-nascidos de até três dias de idade. Bezerros de raças leiteiras, bem como de raças de corte, são suscetíveis, com frequente associação entre *Cryptosporidium* spp. e *E. coli* (OLIVEIRA FILHO et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007).

Avendaño et al. (2018) consideram os enteropatógenos Rotavírus e *Cryptosporidium* como os dois mais prevalentes, podendo haver infecção concomitante, mas o protozoário foi associado a probabilidade significativamente maior como causa de diarreia em bezerros. A doença por Rotavírus Bovino do Grupo A muitas vezes está associada a criptosporidiose neonatal, sendo importante para o agravamento do quadro clínico e do prognóstico, além de ter também caráter zoonótico (GRAAF et al., 1999; KIM et al., 2011). A Rotavirose predispõe

para pneumonia bacteriana secundária, resultando no complexo respiratório bovino. Além do Rotavírus, outro patógeno viral, o Coronavírus Bovino também pode estar associado a altas taxas de mortalidade, sendo necessário o isolamento viral para o diagnóstico (VARGAS JUNIOR et al., 2014).

Outra possibilidade de infecção em bezerros é *Giardia* sp., que pode ocorrer de forma isolada ou associada a outros enteropatógenos, como *Cryptosporidium*. *Giardia* sp. também é relatada como causa de mortalidade em bezerros neonatos na ausência de outros agentes infecciosos (GUIMARÃES et al., 2001). Além disso possui potencial zoonótico, com distúrbios entéricos em humanos (MATSUURA et al., 2017). Guimarães et al. (2009) observaram eliminação frequente de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em bezerros com diarreia contínua. Foi sugerida possível associação com Rotavírus, no entanto, esses autores perceberam que, ao passo que a diarreia passava a ser intermitente parava a eliminação dos oocistos. Para bezerros que permaneciam com diarreia por longos períodos foi sugerida a coinfeção com *Giardia* sp.

É plausível considerar as coinfeções e que elas levam a grandes perdas econômicas. Diante de um quadro clínico ou subclínico elas devem ser diagnosticadas, pois podem constituir um dos fatores que determinam a epidemiologia local. O risco de infecção deve ser avaliado adequadamente, para que medidas profiláticas sejam implementadas (RODRIGUES et al., 2016).

2.5 Patogenia e sinais clínicos

A patogenia da criptosporidiose bovina, em se tratando de *C. parvum*, a mais patogênica, envolve estímulos às células epiteliais intestinais para secreção de prostaglandinas (PGE-2 e PGI-2). Estas vão estimular o sistema nervoso periférico entérico a secretar acetilcolina (Ach) e polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP). Ocorre aumento na concentração de Ca^{++} intracelular e monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico), além da ativação da secreção de ânions (Cl^- e HCO^-) e inibição da absorção de sódio e cloro (GOOKIN et al., 2002; JONES; BLIKSLAGES, 2002). Há produção de algumas enzimas, como as dissacaridases e peptidases (FOSTER; SMITH, 2009).

Ocorrem danos aos enterócitos, incluindo apoptose de enterócitos e atrofia das vilosidades intestinais. Com a intensidade da infecção e persistência no animal pode haver hiperplasia das criptas. A infecção pode ser acentuada a ponto de favorecer o rompimento da barreira epitelial. A infecção persiste até que a resposta imune do hospedeiro elimine o

parasito (FOSTER; SMITH, 2009). O parasito frequentemente estimula mecanismos de defesa do hospedeiro, correlacionado a liberação de citocinas pró-inflamatórias no epitélio infectado, induzindo uma síndrome de má digestão e má absorção, que leva a hipersecreção (UZAL et al., 2016).

É comum haver infecção subclínica, porém quando há doença clínica diarreia é o sinal clínico mais evidente, aquosa e profusa, e pode ser discreta a acentuada. Pode persistir até duas semanas e culminar em má absorção intestinal (SANTÍN et al., 2013; AVENDAÑO et al., 2018). Na infecção pelo protozoário há combinação entre absorção deficiente e aumento da secreção de fluidos. As variações entre os sinais clínicos e as lesões entéricas estão associadas a variações na quantidade de oocistos ingerida e da espécie infectante, à virulência, além de considerar a idade e o estado imunológico do bezerro (HEINE et al., 1984). Sinais clínicos como apatia, fraqueza e anorexia podem acompanhar o quadro de diarreia. Frequentemente ocorre balanço energético negativo (EL-DEEB et al., 2022). A diarreia é observada com maior frequência na segunda e na terceira semanas após o nascimento, mas pode ser observada já na primeira semana, devido ao período pré-patente de 3 a 6 dias, com eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes com 3 a 12 dias, isto é; a eliminação dos oocistos está relacionada com o início e a duração da diarreia (HEINE et al., 1984; FAYER et al., 1998).

As taxas de letalidade na criptosporidiose geralmente são baixas, a menos que a condição seja complicada por outros fatores, como infecções bacterianas, virais ou parasitárias concomitantes, falhas na transferência de imunidade passiva, aleitamento incorreto, desidratação, superlotação, entre outros fatores. No entanto, é sabido que a infecção é autolimitada em bezerros, assim como em humanos (HEINE et al., 1984; FAYER et al. 1998). *C. parvum* foi associada a um risco aumentado de diarreia, comparada a Rotavírus e Coronavírus (RENAUD et al., 2021). HEINE et al. (1984) explicam que, uma vez os bezerros se recuperam de uma infecção criptosporidial, eles se tornam resistentes a um segundo desafio com o mesmo coccídio. Espécies como *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* não têm sido associadas a sinais clínicos (FAYER et al., 2008).

2.6 Achados de necrópsia e lesões histopatológicas

Os achados macroscópicos em bezerros com criptosporidiose frequentemente incluem posterior sujo de fezes amolecidas ou líquidas, indicativo da ocorrência de diarreia, congestão/hiperemia em vasos sanguíneos intestinais e mesentéricos, distensão intestinal por gases ou líquido, conteúdo intestinal esverdeado e dilatação de vasos linfáticos. A

mucosa intestinal pode estar com edema evidente, além de hiperemia, petéquias e, em alguns locais, erosões e até mucosa achatada (VARGAS JUNIOR et al., 2014; KALKANOV et al., 2016; MENDONÇA et al., 2021).

Na histopatologia em hematoxilina e eosina os protozoários são visualizados como estruturas arredondadas, fracamente basofílicas, de 2 a 5 μm de diâmetro, na superfície apical dos enterócitos da borda das microvilosidades, podendo ser observadas miríades deles. Estão distribuídos na metade distal do intestino delgado, especialmente no íleo e, ocasionalmente, são encontrados no ceco e no cólon (ABDOU et al., 2013; VARGAS JUNIOR et al., 2014; UZAL et al., 2016; MENDONÇA et al., 2021). Diferentes estágios de desenvolvimento do parasito podem ser observados, com formação de um vacúolo parasitóforo, que pode ser visualizado como um halo não corado (HOLUBOVÁ et al., 2020).

Em consequência da proliferação de *C. parvum* há encurtamento e achatamento das vilosidades, com necrose e atrofia da mucosa intestinal. A atrofia das vilosidades resulta da secreção de toxinas do parasito, com agressão direta das células epiteliais. Entretanto, há outros mecanismos, com efeitos metabólicos ou físicos (HEINE et al., 1984). Em infecção grave os danos causados ao epitélio de revestimento intestinal são extensos, podendo levar a destruição de epitélio viloso (VARGAS JUNIOR et al., 2014; EL-DEEB et al., 2022; EL SHAFEI et al., 2023).

Os enterócitos que revestem as vilosidades atróficas do intestino delgado podem ficar mais basofílicos, colunares baixos a cuboide, com núcleos desordenados e superfície irregular. O mesmo pode ocorrer no intestino grosso parasitado (HEINE et al., 1984). Há também congestão na lâmina própria das áreas atingidas e infiltrado inflamatório mononuclear acentuado, composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, além de neutrófilos e raros eosinófilos (VARGAS JUNIOR et al., 2014; EL SHAFEI et al., 2018; EL-DEEB et al., 2022).

Na microscopia eletrônica visualizam-se estruturas arredondadas medindo 1,5 a 1,75 μm de diâmetro, as quais se encontram aderidas às microvilosidades dos enterócitos e correspondem aos diferentes estágios do agente, como os trofozoítos. As microvilosidades das células absorptivas podem estar com altura irregular e citoplasma vacuolizado. Quando *Cryptosporidium* sp. se liga à célula epitelial ocorre rompimento da membrana plasmática apical, onde o protozoário se projeta, e perda das microvilosidades. Pode ocorrer fusão de vilosidades em gravidade variável e hipertrofia das criptas de Lieberkühn (HEINE et al., 1984; VARGAS JUNIOR et al., 2014; UZAL et al., 2016).

2.7 Medidas de tratamento e controle

Delling et al. (2019) enfatizam que, frente à infecção por *C. parvum*, devem ser investigados os mecanismos de infecção e a resposta celular do hospedeiro, para assim contribuir para a melhora nas abordagens terapêuticas, tanto em humanos, como em animais domésticos.

Nos Estados Unidos há um único fármaco aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), órgão equivale à ANVISA no Brasil, para tratamento de criptosporidiose em humanos, que é o Nitazoxanide. Este fármaco é considerado relativamente eficaz em pacientes imunocompetentes e ineficaz em pacientes imunocomprometidos (EL SHAFEI et al., 2018). Já Abdou et al. (2013) reforçaram que o nitazoxanide, dentre outros compostos de nitroiazol salicilamida, apresenta vasta atividade antiparasitária. Apesar de ser licenciado para uso apenas em humanos, demonstrou reduzir a gravidade da diarreia em bezerros, bem como reduziu a excreção de oocistos (OLLIVETT et al., 2009).

O quimioterápico lactato de halofuginona, categorizado como uma quinazolinona sintética com atividade criptosporidiostática nos estágios de esporozoíto e merozoíto de *C. parvum*, é recomendado na dose de 120 µg/kg, diariamente, por sete dias consecutivos, mas pode ser tóxico na dose de 500 µg/kg/dia. Esse fármaco mostrou provável capacidade de retardar a infecção, além de atuar na redução ou interrupção da eliminação de oocistos diminuindo, com isso, a gravidade da criptosporidiose em bezerros. A eficácia também foi observada na diminuição da contaminação ambiental e dos riscos zoonóticos (JARVIER et al., 2005; MARTINS et al., 2007; DE WAELE et al., 2010).

Grinberg et al. (2002) utilizaram sulfato de paromomicina na dose de 100 mg/kg de peso corporal por 10 dias consecutivos. Observaram que o período pré-patente foi significativamente mais longo do que em animais não tratados; que a eliminação de oocistos e a diarreia recomeçaram somente após a suspensão do medicamento; e que o tratamento não diminuiu a incidência da doença nos animais tratados.

Não existem fármacos terapêuticos totalmente eficazes. A reposição de fluidos e eletrólitos pode garantir o balanceamento eletrolítico perdido em decorrência da diarreia, bem como o suporte nutricional é indicado até que ocorra a recuperação. Vários dias de cuidado intensivo e alimentação podem ser necessários até que a recuperação seja aparente. A nutrição parenteral pode ser considerada para bezerros de alto valor genético (MEGANCK et al., 2014).

Kim et al. (2022) enfatizam que o foco na prevenção é a principal estratégia, no

intuito de evitar e diminuir perdas econômicas na pecuária. Isso se deve à falta de fármacos disponíveis e eficientes para o tratamento de criptosporidiose.

O risco de infecção deve ser avaliado adequadamente, para que medidas profiláticas sejam implementadas, o que inclui o manejo de vacas na época do parto com intuito de evitar aglomeração de animais e contaminação ambiental e assim diminuir as perdas econômicas e evitar riscos para a saúde pública (VARGAS JUNIOR et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Necrópsia

Foram examinados bezerros de 0 a 12 meses encaminhados para necrópsia no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (SPV-UFLA), provenientes de propriedades das Mesorregiões Campo das Vertentes, Sul e Sudoeste de Minas Gerais, com e sem histórico de diarreia, no período de abril de 2021 a maio de 2023. As necrópsias foram realizadas pela equipe do Setor de Patologia Veterinária (SPV – UFLA), com avaliação macroscópica de todos os órgãos. Informações epidemiológicas e de manifestações clínicas foram registradas.

3.2 Exame citopatológico: Coloração especial de Ziehl Neelsen Modificado

Amostras de conteúdo intestinal foram colhidas na necrópsia, conservadas em câmara fria (0,5 a 2,0° C) até a realização da técnica histoquímica de Ziehl-Neelsen modificada para evidenciação de coccídios de *Cryptosporidium* sp. Foram pesados 2 g de cada amostra, colocados em tubo Falcon, adicionados 3,0 mL de éter e 4,0 mL de formol 10% e centrifugados a 3200 rpm por 10 min. O sedimento foi distendido sobre lâminas de microscopia, que foram secadas em estufa e fixadas com metanol P.A. Foram então colocados os reagentes fucsina fenicada (15 min), ácido clorídrico (5 s) e azul de metileno (3 min), respectivamente, com lavagem das lâminas em água corrente após cada reagente. Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente elas foram avaliadas em microscópio de luz (Obj. 100x) para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981; GARCIA et al., 1988; GUIMARÃES et al., 2009). Foram analisados 40 campos/lâmina e considerada a média de oocistos por campo, com a seguinte classificação quanto à intensidade de infecção: 0 (negativa)= ausência de oocistos; 1 (discreta) = 1 a 10 oocistos; 2 (moderada) = 11 a 20 oocistos; 3 (acentuada) = mais de 20 oocistos, classificação adaptada de Delafosse et al. (2015).

3.3 Coleta, fixação e processamento para exame histopatológico

Fragmentos de intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e grosso (ceco, cólon e reto), foram coletados em potes com formol a 10% individualmente e identificados. Foram também colhidos fragmentos de intestino e demais órgãos e tecidos em formol a 10% tamponado para avaliação histopatológica de rotina. Após 24-48 horas de fixação as amostras foram clivadas.

Após a clivagem, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Com micrótomo ajustado para 3-5 μm os blocos foram cortados, tanto para coloração de rotina, quanto para coloração especial.

Foi realizada a coloração de rotina Hematoxilina e Eosina (HE) (PROPHET et al., 1995; SUVARNA, LAYTON; BANCROFT, 2013), para caracterização de alterações histopatológicas nas amostras de intestino. A pesquisa de estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp. foi realizada na mucosa dos seis cortes de intestino, em objetiva de 40x, considerada também a classificação: ausente (0), ou presente, com a intensidade da infecção classificada em discreta (1), moderada (2) ou acentuada (3).

3.4 Coloração histoquímica de Ácido Periódico de Schiff

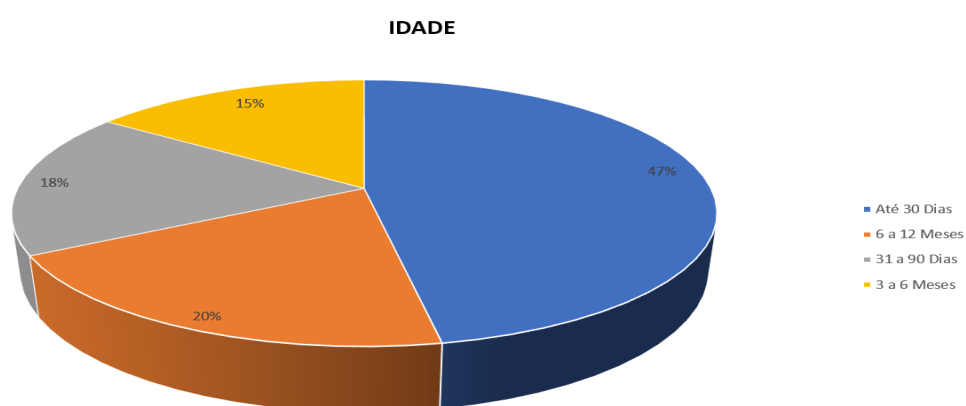
A coloração por Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi realizada em cortes de intestino dos bezerros após a análise em HE, nos casos positivos na citopatologia por ZNM e nos demais bezerros com até 30 dias de idade, para evidenciação de estruturas de *Cryptosporidium* sp. A técnica de PAS foi realizada conforme Prophet et al. (1995).

Após a microtomia as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por uma hora para desparafinar e posteriormente eram hidratadas. Foram então colocadas em solução de ácido periódico a 0,5% por 15 minutos e posteriormente lavadas em água destilada. Em seguida, cada lâmina era coberta pelo reagente de Schiff por 10-15 minutos, monitorando-se a obtenção de coloração rósea. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada até remoção total do reagente e submetidas à coloração de Hematoxilina de Harris para contraste, por dois minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas em água destilada e submetidas aos processos de desidratação, diafanização e montagem em resina sintética. O coccídio foi evidenciado nos cortes intestinais como estruturas arredondadas azuis a arroxeadas, interrompendo focalmente a borda das microvilosidades intestinais, conforme descrito por El Shafei et al. (2018).

4 RESULTADOS

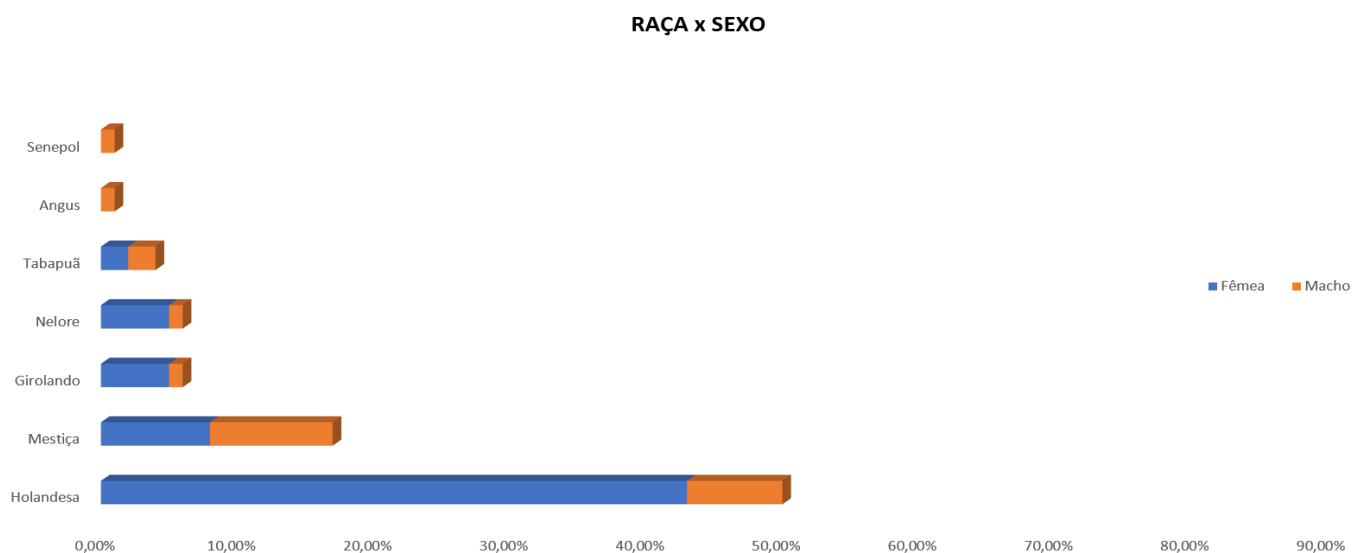
No período do estudo foram necropsiados 85 bezerros de 0 a 12 meses de idade no Setor de Patologia Veterinária da UFLA. Predominaram bezerros com até 30 dias (40/85) (GRÁFICO 1), seguidos de animais com 31 a 90 dias (15/85); 3 a 6 meses (12/85); e de 6 a 12 meses de idade (18/85).

Gráfico 1- Idade dos bezerros necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023.



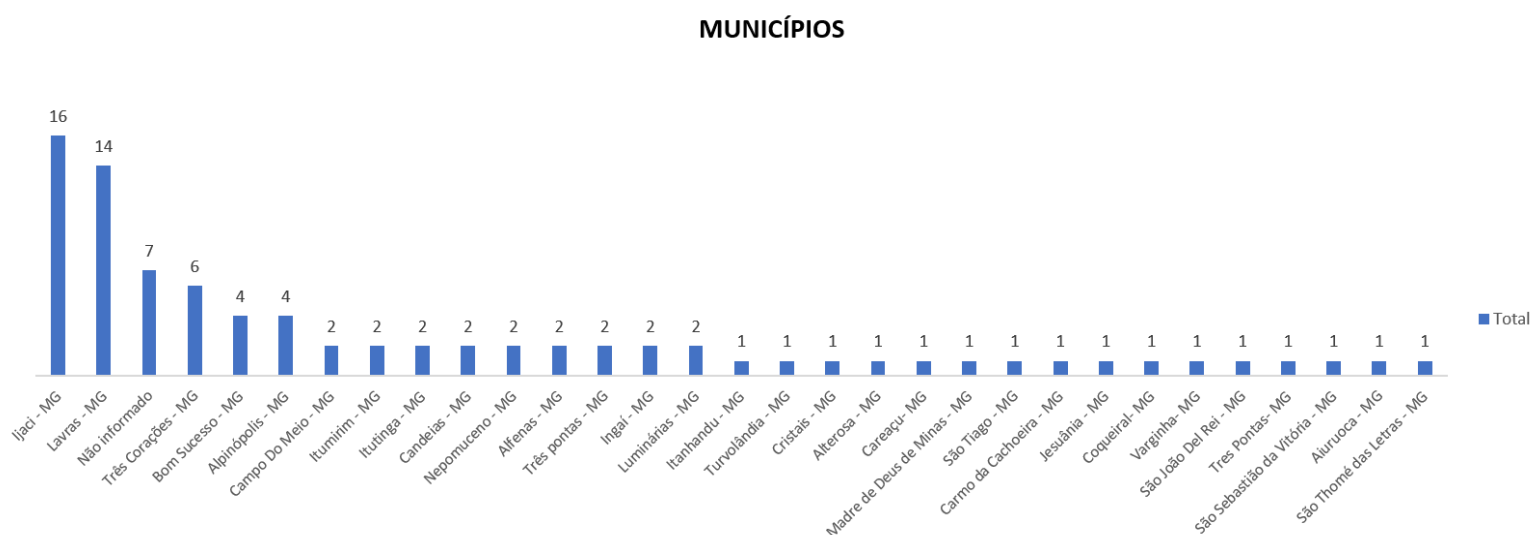
Quanto à raça dos bezerros necropsiados predominou a raça Holandês (49/85), mestiços (17/85), Girolando (6/85), Nelore (7/85), Tabapuã (4/85), Senepol (1/85) e Angus (1/85). Predominaram fêmeas (63/85), especialmente da raça Holandês (43/49), o que foi relacionado à importância da atividade pecuária leiteira na região do estudo (GRÁFICO 2).

Gráfico 2- Sexo e raça dos bezerros necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023.



Os sistemas de criação informados no histórico incluíram intensivo (55/85), especialmente para bovinos Holandês, com uso de baias ou gaiolas individuais para bezerros novos e baias coletivas para os bezerros maiores. Outros bezerros eram provenientes de sistema extensivo, a pasto (15/85) ou sistema semi-intensivo (6/85). Para nove casos não havia informação no histórico sobre sistema de criação. Os bezerros eram provenientes de diferentes municípios (GRÁFICO 3).

Gráfico 3- Procedência dos bezerros necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023.



Dos 85 bezerros 28 (33%) tiveram manifestação clínica de diarreia. Em nove foi identificada infecção por *Cryptosporidium* sp. Nestes bezerros (9/9) foi observado posterior sujo de fezes liquefeitas na necrópsia, confirmando a manifestação clínica. Eles procediam de Lavras (3/9), Ijaci (2/9), Alfenas (1/10), Alpinópolis (1/9), Madre de Deus de Minas (1/10) e Três Corações (1/9). Informações epidemiológicas e clínicas sobre estes bezerros são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1- Informações epidemiológicas e clínicas dos bezerros positivos para *Cryptosporidium* sp. em exame microscópico no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023.

Bezerro	Idade (dias)	Sexo	Raça	Dados epidemiológicos	Manifestações clínicas mais relevantes e medicações
1	13	F	HPB	Está com 12 bezerras lactentes, óbito de outras duas bezerras com diarreia na semana, em meses anteriores também teve óbitos. Diarreia começa com 5-7d de idade. Filha de novilha, mamou só 0,5L de colostro. Mantida em baia coletiva. Cura de umbigo com iodo 10%. Leite no balde, 3/3L manhã/tarde, não usa leite de descarte.	em regular estado corporal, diarreia há dois dias, líquida, amarelada e esverdeada, com estrias de sangue. Medicação com sulfadoxina + trimetoprima, enrofloxacino, florfenicol, polivitamínico, hidratante oral
2	10	F	HPB	Óbito de bezerras 2-18d de idade no último mês; morreram 19 de 42 bezerras lactentes em 15d. Histórico de falha cura de umbigo, que foi sanada. Vazio sanitário (5d) e desinfecção de baias com formol. Bezerras mantidas em galpão com baias individuais suspensas e cama de tifton. Queixa de poeira no galpão, vinda da estrada.	Nasceu fraca, não quis mamar, recebeu colostro via sonda, teve tosse e regurgitação. Dificuldade respiratória, crepitação pulmonar, febre, apatia e decúbito. Morrem em média 3d após início dos sinais. Medicação penicilina, fluorquinolona, cloridrato de bromexina, dipirona. Doramectina ao nascimento.
3	20	F	HPB	Usa baias de parição, mas nasceu em cama suja e não foi visto quando nasceu e se mamou colostro. Bezerros em gaiola suspensa até 30d.	Diarreia esverdeada aos 12d de idade, dificuldade para mamar e hipotermia. Medicação halofuginona por 7 dias, além de enrofloxacino, sulfa, meloxicam, dipirona e hidratação
4	11	M	Tabapuã	Mamou colostro na mãe, cura de umbigo com produto repelente comercial. Mantido em piquete com outros bovinos.	Dificuldade para mamar, pouco reflexo de sucção desde o nascimento. Apatia, desidratação intensa, crepitação pulmonar, estruturas umbilicais espessas. Medicação fluidoterapia, penicilina, gentamicina, mercepton e flunixin meglumine.
5	6	F	Nelore	Não recebeu colostro, nem cura de umbigo. Mantido em piquete com outros bovinos.	Desidratação severa, hipoproteinemia, sinais respiratórios e fratura completa rádio e ulna. Medicação vit. B1, dexametasona e DMSO (3d)
6	10	F	HPB	Diarreia frequente em bezerras de 7-15d. Metafilaxia com halofuginona (d2 a d9). Recebeu colostro da mãe (BRIX 20), em mamadeira 3L/refeição. Baias individuais.	Diarreia. Medicação florfenicol, doxiciclina + benzetimide (5 d), vitaminas, aminoácidos e minerais; meloxicam, toltrazuril, sulfa, vacina contra Salmonella, E. coli e Pasteurella

7	11	F	HPB	Óbito de outros bezerros lactentes nos últimos 3 meses com diarreia e evolução rápida para a morte. Baías individuais.	Encontrada morta. Sinais de diarreia (posterior sujo de fezes liquefeitas)
8	6	M	HPB	Bezerros novos em baias individuais	Estava com diarreia, passou a berrar muito pela manhã, encontrado morto início da tarde.
9	12	F	HPB	Diarreia aos 20-30d de idade, Diarreia e óbito de mais duas bezerras e duas doentes. Fornecimento leite (8L /dia) em balde Milk Bar®. Gaiolas suspensas com cama de feno até 30d, depois baias coletivas. Cura umbigo iodo 10%. Quando diarreia colocam 2-3 bezerras juntas ao sol por pouco tempo sobre piso cimentado. Hidratação quando debilitação e, se febre, antibiótico.	Diarreia esbranquiçada, pastosa a líquida, início dia anterior ao óbito. Diminuiu consumo, anorexia no dia do óbito. Medicação enrofloxacina, flunixin meglumine, hidratação oral via sonda

F= fêmea; M= macho; d=dia; HPB= Holandês preto e branco, L= litro. Fonte: do Autor, 2023

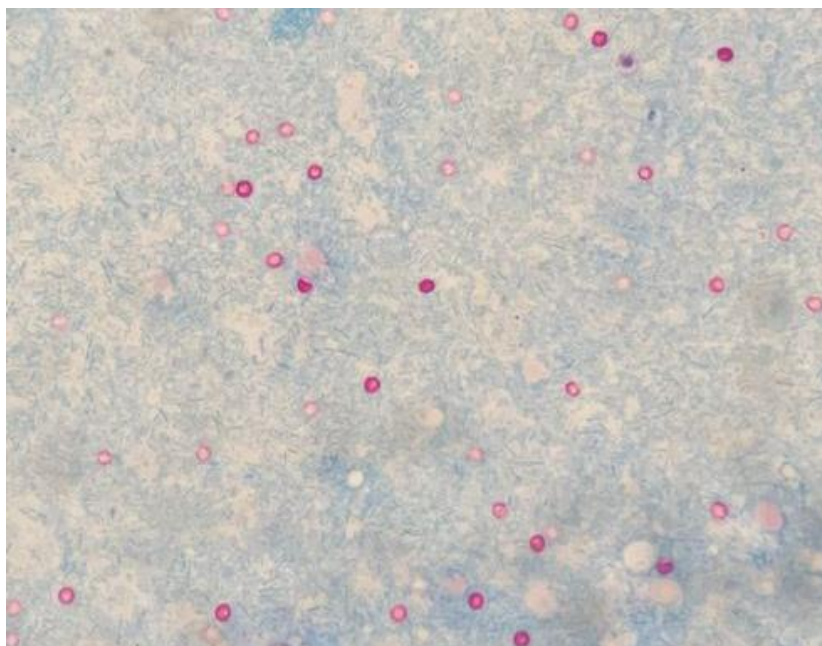
Seis bezerros com menos de um mês de idade foram positivos para *Cryptosporidium* sp. na coloração de ZNM (QUADRO 2), com observação de estruturas arredondadas coradas em magenta (FIGURA 1), no entanto esta técnica não foi empregada para 15 bezerros do estudo, encaminhados para necrópsia no período de abril a julho de 2021, quando a técnica de ZNM ainda não estava padronizada no SPV. Na histopatologia em HE estruturas arredondadas fracamente basofílicas compatíveis com o protozoário foram visualizadas na superfície dos enterócitos na mucosa intestinal (FIGURA 2). Estas estruturas foram evidenciadas pela coloração de PAS (FIGURA 3), visualizadas como estruturas azuis a arroxeadas na borda das microvilosidades intestinais, compatíveis com *Cryptosporidium* sp.

Quadro 2- Bezerros positivos para *Cryptosporidium* sp. em exame microscópico no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023 e o diagnóstico final

Bezerro	Técnica			Diagnóstico final
	ZNM	HE (local)	PAS (local)	
1	Não realizada	3 (íleo)	3 (íleo)	Criptosporidiose
2	0	1 (íleo)	1 (íleo)	Pneumonia aspirativa, onfalite
3	2	1 (jejuno, íleo, ceco e cólon)	1 (jejuno, íleo, ceco e cólon)	Sugestivo de Salmonelose e Criptosporidiose
4	2	1 (íleo e cólon)	1 (íleo e cólon)	Torção intestinal, onfalite, sepse e poliartrite
5	0	1 (duodeno e íleo)	1 (duodeno e íleo):	Fratura de rádio e ulna
6	3	1 (jejuno, íleo, ceco e colón)	1 (jejuno, íleo, ceco e colón)	Criptosporidiose
7	3	3 (jejuno e íleo)	3 (jejuno e íleo)	Criptosporidiose
8	3	1 (jejuno, íleo e cólon)	1 (jejuno, íleo e cólon)	Criptosporidiose
9	2	1 (íleo e ceco)	1 (íleo e ceco)	Úlcera abomasal perfurada, peritonite e Criptosporidiose

ZNM= Ziehl Neelsen Modificado; HE= Hematoxilina e Eosina; PAS= Ácido Periódico de Schiff. Ausente = 0; Discreta = 1; Moderada = 2; Acentuada = 3. Fonte: do Autor, 2023

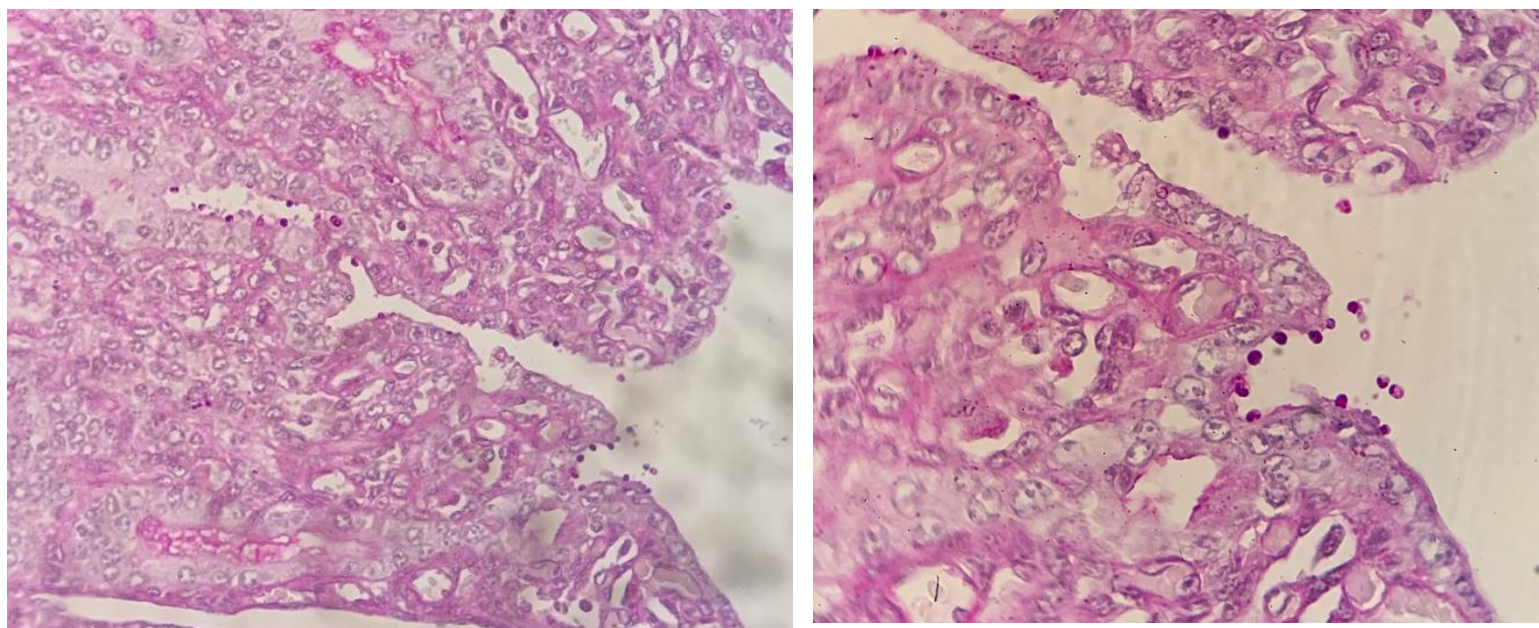
Figura 2 – Oocistos de *Cryptosporidium* sp. evidenciados pela coloração de Ziehl Neelsen modificada, em conteúdo intestinal de bezerros necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023.



Os oocistos de *Cryptosporidium* sp. são arredondados e se coram em magenta, Bezerro n. 8. Obj. 40x. Fonte: da Autora, 2023.

Quanto aos achados de necrópsia dos bezerros positivos para *Cryptosporidium* sp., na necrópsia do Bezerro n. 1 havia fezes amarelo-amarronzadas aderidas à região perianal e olhos deprimidos na órbita. No intestino delgado a mucosa estava avermelhada, com material amarelado friável aderido, além de conteúdo liquefeito amarronzado escasso. No ceco havia áreas pálidas de cerca de 3,0 x 4,0 cm, de contorno irregular e bem definido; no cólon havia conteúdo liquefeito róseo-amarronzado e os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de volume. Na histopatologia foram observados necrose superficial multifocal na mucosa do abomaso; hiperemia da mucosa do intestino delgado, com grande quantidade de estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp. na superfície do epitélio de íleo; e necrose transmural focalmente extensa no intestino grosso, com trombose e abundantes colônias bacterianas, além de dilatação de criptas, algumas contendo restos celulares.

Figura 3- Evidenciação de estruturas de *Cryptosporidium* sp. em corte histológico de intestino de bezerro diagnosticado com infecção por *Cryptosporidium* sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023.

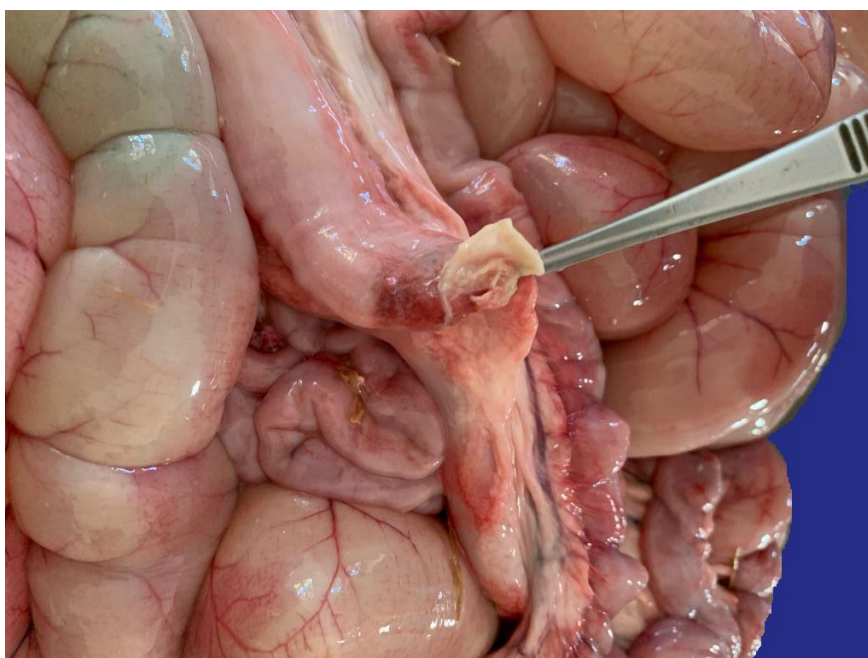


Observam-se estruturas arredondadas, azuis a arroxeadas na superfície dos enterócitos do íleo. Bezerro n. 1. (PAS, 40x e 100x). Fonte: da Autora, 2023.

Na necrópsia do Bezerro n. 2 foram observados regular estado corporal, mucosas conjuntivais e oral cianóticas e região perianal suja de fezes amarelo-amarronzadas, liquefeitas a pastosas. O umbigo estava espesso e avermelhado, com coleção de exsudato amarelado opaco em área de aproximadamente 2,0 cm, mais próximo à parede abdominal. A cavidade torácica estava repleta de líquido turvo, amarronzado e fétido. As pleuras visceral e parietal estavam espessas, com superfície irregular e opaca; o pulmão direito amarelado a acinzentado, com áreas arredondadas branco-amareladas a acinzentadas ao corte; o pulmão esquerdo tinha lobo medial vermelho-escuro, mais firme; e na traqueia havia material friável amarelado, com muco em terço caudal. No coração havia filamentos opacos amarelados friáveis na superfície cardíaca; e no rúmen havia placas amareladas opacas de aproximadamente 3,0 cm na mucosa, próximas a pregas da mucosa. No exame histopatológico havia extensas áreas de necrose em pulmão, com infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico no interior de alvéolos, brônquios e bronquíolos, e os septos interlobulares estavam acentuadamente distendidos por edema e fibrina. No intestino delgado foi observada dilatação de criptas e pequena quantidade de estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp. na superfície do epitélio de íleo, além de necrose linfóide multifocal.

No Bezerro n. 3 foram observados bom estado corporal, olhos deprimidos na órbita e fezes amolecidas aderidas à região perianal e cauda. Na cavidade abdominal havia material líquido, turvo-amarronzado, com grande quantidade de fibrina, além de aderências fibrinosas na superfície do fígado, que estava com bordas arredondadas e havia espessamento da parede da vesícula biliar. Áreas de aderência fibrinosa eram observadas na serosa de segmentos intestinais (FIGURA 4), o conteúdo intestinal estava líqüefeito, vermelho-amarelado e os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de volume. No exame histopatológico do duodeno havia necrose, encurtamento e achatamento de vilosidades, infiltrado inflamatório misto em mucosa e submucosa, associados a grande quantidade de colônias bacterianas. além de hiperplasia de folículos linfoides, observada também em jejuno e íleo. No ceco havia aumento em volume e número de células na serosa, associadas a grande quantidade de fibrina, infiltrado linfo-histioplasmocítico com neutrófilos e áreas de necrose. na superfície capsular. Em íleo, jejuno, ceco e cólon havia pequena quantidade de estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp., na superfície da mucosa.

Figura 4- Achados em parede intestinal na necrópsia de bezerra diagnosticada com infecção por *Cryptosporidium* sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023.



Área de avermelhamento da parede e coleção de fibrina na serosa do ceco, que resultou em aderência fibrinosa focalmente extensa. Bezerro n. 3 Fonte: SPV-UFLA, 2022.

Na necrópsia do Bezerro n. 4 foram observados bom estado corporal, mucosas conjuntivais e oral moderadamente pálidas e olhos muito deprimidos na órbita (FIGURA 5).

O umbigo estava espesso, com exsudato caseoso branco-amarelado ao corte. Na cavidade abdominal havia pequena a moderada quantidade de filamentos de fibrina sobre as vísceras. Duodeno e parte do jejuno tinham grande quantidade de conteúdo amarelo-amarronzado, turvo e liquefeito. No segmento final do jejuno e no íleo havia uma torção de 180° (FIGURA 6), o qual estava moderadamente arroxeadado, a mucosa opaca-acinzentada e segmentos intestinais posteriores sem conteúdo.

Figura 5 - Achados externos em necrópsia de bezerro diagnosticado com infecção por *Cryptosporidium* sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA.



Observam-se olhos fundos na órbita, indicativos de desidratação acentuada, e palidez moderada de mucosas. Bezerro n. 4 Fonte: SPV-UFLA, 2022

À histopatologia desse bezerro o intestino delgado tinha congestão moderada, extensas áreas de necrose de porção superficial da mucosa, associadas a restos celulares, bactérias cocoides, infiltrado inflamatório linfoplasmocítico e neutrofílico difuso discreto, além de áreas de hemorragia e dilatação de criptas contendo debris celulares. Poucas estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp. foram observadas na superfície mucosa de íleo e cólon.

Figura 6- Torção intestinal em necrópsia de bezerro diagnosticado com infecção por *Cryptosporidium* sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA.



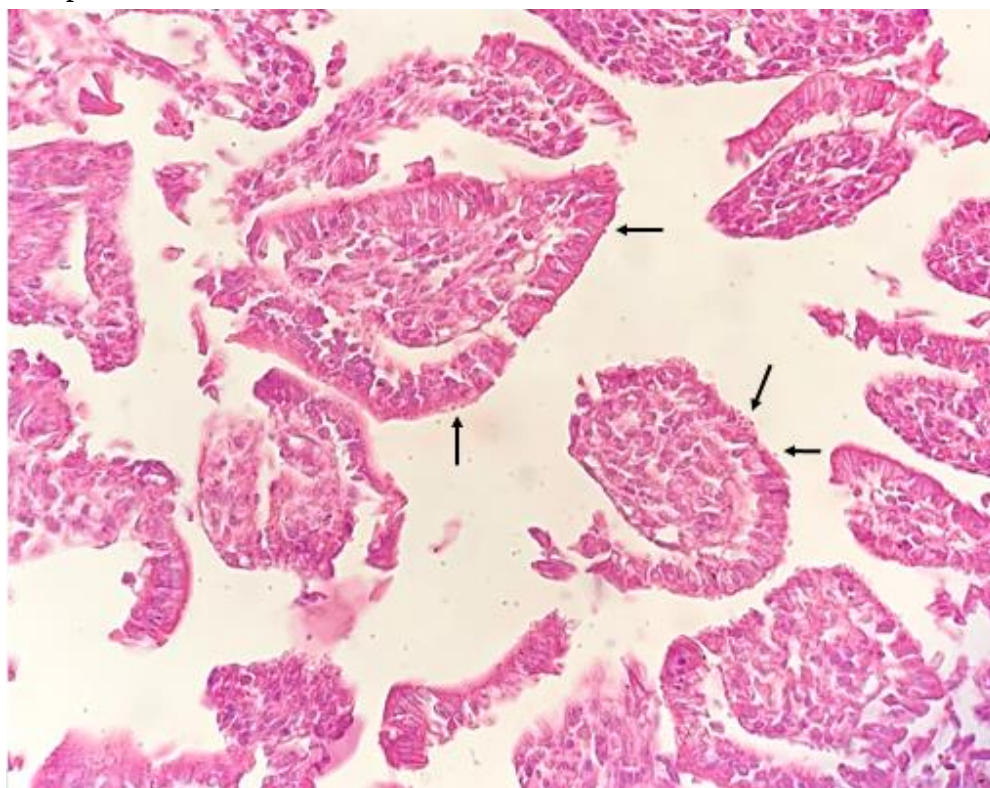
Observa-se torção de 180° em segmento da porção final de jejuno, com distensão de segmento anterior por conteúdo liquefeito e gases. Bezerro n. 4. Fonte: SPV – UFLA, 2022.

Na necrópsia do Bezerro n. 5 os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de volume. Na histologia havia hiperemia difusa acentuada em duodeno, jejuno e íleo. Em duodeno e íleo foi observada pequena quantidade de estruturas de *Cryptosporidium* sp.

Na necrópsia do Bezerro n. 6 os olhos estavam deprimidos na órbita e as mucosas pálidas, havia conteúdo liquefeito acinzentado em duodeno e porção inicial do jejuno e conteúdo brancacento pastoso no cólon. No exame histopatológico foram observadas estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp. na superfície do epitélio desprendido no íleo, além de infiltrado inflamatório discreto na mucosa, composto por eosinófilos e macrófagos, estes com citoplasma carregado de pigmento amarronzado e abundantes bactérias bacilares. Em jejuno, ceco e cólon havia pequena quantidade de estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp. na superfície da mucosa.

Na necrópsia do Bezerro n. 7 foram observadas fezes líqüefeitas amareladas aderidas à região perianal, hipópio e mucosa abomasal avermelhada. No exame histológico havia grande quantidade de estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp. na superfície da mucosa de jejuno e íleo (FIGURA 7); e em quantidade moderada em ceco e cólon.

Figura 7- Morfologia de *Cryptosporidium* sp. em corte histológico de intestino de bezerro diagnosticado criptosporidiose no Setor de Patologia Veterinária da UFLA no período de abril de 2021 a maio de 2023.

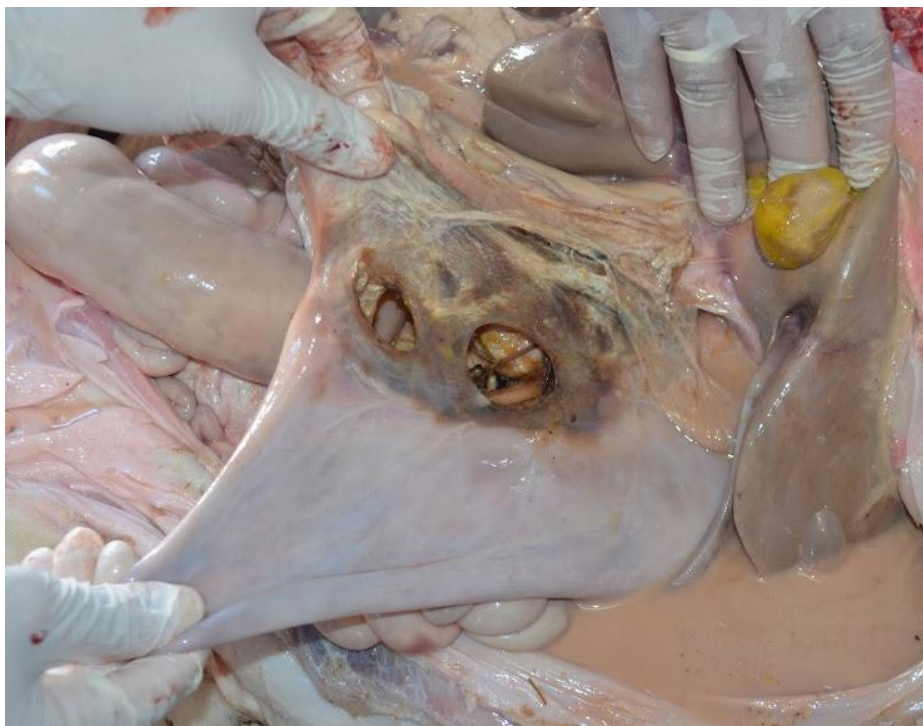


Observam-se estruturas arredondadas (setas), fracamente basofílicas na superfície das vilosidades intestinais do íleo Bezerro n. 7 (H.E., Obj. 40x). Fonte: da Autora, 2023.

Na necrópsia do Bezerro n. 8 havia fezes em região perianal e mucosas conjuntivais e oral hipocoradas. Na histopatologia foi observada pequena quantidade de estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp. na superfície da mucosa de jejuno, íleo e cólon.

Na necrópsia do Bezerro n. 9 foram observados posterior sujo de fezes, mucosas pálidas; conteúdo liquefeito, turvo róseo-amarronzado em cavidade abdominal associado a duas úlceras abomasais perfuradas (FIGURA 8). Ao exame histológico havia necrose extensa em mucosa e submucosa abomasais, associada a infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico; necrose superficial na mucosa do ceco, com grande quantidade de bactérias cocoides e cocobacilares. Na superfície da mucosa de íleo e ceco havia quantidade moderada de estruturas compatíveis com *Cryptosporidium* sp.

Figura 8- Úlcera abomasal perfurada em bezerro diagnosticado com infecção por *Cryptosporidium* sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA.



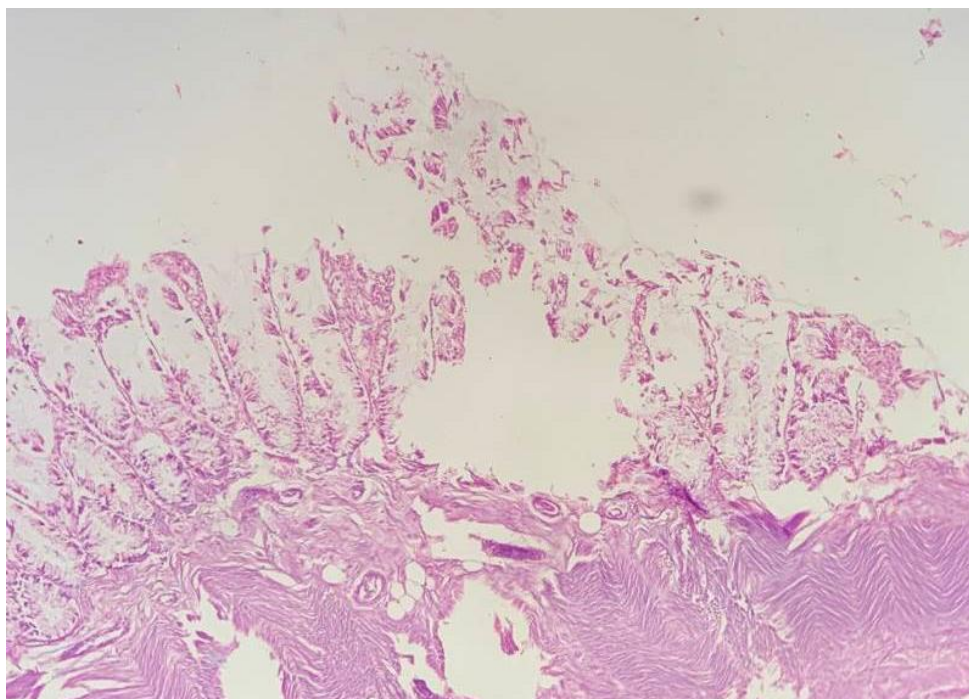
Observam-se duas úlceras transmuralis em antro pilórico e conteúdo turvo róseo-amarronzado em cavidade abdominal. Bezerro 9. Fonte: SPV – UFLA, 2023

Na histopatologia dos nove casos foram observadas estruturas de *Cryptosporidium* sp. na mucosa do íleo. Em quatro casos elas foram visualizadas também no jejuno, em três casos no ceco, em quatro casos no cólon e somente em um caso no duodeno.

Em cinco bezerros identificados com infecção por *Cryptosporidium* outros diagnósticos de necrópsia e histopatologia foram mais relevantes como causa do óbito, incluindo salmonelose, torção intestinal, onfalite, poliartrite e sepse, úlcera abomasal perfurada, pneumonia aspirativa e fratura de rádio e ulna.

Em sete dos nove bezerros positivos para *Cryptosporidium* havia alterações pós-mortais moderadas a acentuadas na mucosa intestinal, com desprendimento na avaliação histológica (FIGURA 9).

Figura 9- Alterações pós-mortais em intestino delgado de bezerro diagnosticado com infecção por *Cryptosporidium* sp. no Setor de Patologia Veterinária da UFLA.



Observa-se desprendimento da porção superficial da mucosa, o que prejudicou a visualização das estruturas parasitárias. Bezerro 6. (H.E. 10x). Fonte: da Autora, 2023.

Dos 85 bezerros avaliados neste estudo, exceto os positivos para infecção por *Cryptosporidium* sp., 20 tiveram diagnóstico de afecções pulmonares, como broncopneumonia supurativa (8/76), pleuropneumonia fibrinopurulenta (2/76), pneumonia aspirativa (4/76), Mannheimiose pneumônica (1/76), pneumonia broncointersticial (2/76), pneumonia broncointersticial com células sinciciais (1/76), pleuropneumonia abscedativa com pleurite fibrinosa (1/76), e pneumonia fibrinopurulenta aguda (1/76).

Sete dos 85 bezerros foram diagnosticados com salmonelose, em um deles associada a infecção por *Cryptosporidium* sp. (Bezerro 3). Na macroscopia desses bezerros o fígado estava aumentado de volume, difusamente alaranjado e com focos avermelhados subcapsulares aleatórios distribuídos por todo o órgão, além de evidênciação do padrão lobular. Em um caso a vesícula biliar estava aumentada de volume e com deposição de fibrina.

Também foram causas de morte nos bezerros avaliados outras doenças parasitárias, como babesiose bovina (4/85), anaplasmosse (2/85), eimeriose (1/85) e hemoncose (1/85). Dentre as doenças infecciosas destacaram-se colibacilose (2/85), necrobacilose (2/85) e carbúnculo sintomático (2/85), além de doenças virais, como a raiva (3/85).

Distúrbios físicos do sistema digestório, incluindo laceração de esôfago, ruminite necrosante multifocal acentuada aguda, ruptura abomasal, dilatação e laceração abomasal, úlcera abomasal, perfurada ou não (FIGURA 7), também tiveram ocorrência significativa, com nove casos (9/85), ultrapassando 10% das causas de morte.

4 DISCUSSÃO

A infecção por *Cryptosporidium* sp. foi mais frequente em bezerros da raça Holandês (7/9), com predomínio de fêmeas positivas. Esses dados foram relacionados à vocação para a pecuária leiteira na região do estudo, com procura significativa por animais da raça Holandês pela sua aptidão para a produção leiteira. Nos bezerros das raças Nelore e Tabapuã foi identificada falha na ingestão de colostro, pois um deles não tinha reflexo de sucção e o outro não recebeu colostro, nem cura de umbigo.

Os bezerros positivos para *Cryptosporidium* sp. tinham 6 a 21 dias idade. Dessì et al. (2020) também observaram manifestação da doença em bezerros de 6 a 22 dias de idade, destacando-os não apenas como hospedeiros suscetíveis, mas também como significativos reservatórios, especialmente quando excretam fezes diarreicas no ambiente. Dois bezerros diagnosticados com *Cryptosporidium* sp. tinham 6 dias de idade. Avendaño et al. (2018), que observaram liberação de oocistos em fezes de bezerros com apenas 3 dias de idade, indicaram infecção imediatamente após o nascimento. A predisposição à infecção tem sido relacionada a fatores individuais, como a idade e a imunidade. Na criptosporidiose, a idade e a imunidade do bezerro desempenham papel importante na ocorrência da infecção.

Para quatro dos nove bezerros positivos houve relato de diarreia recorrente na propriedade, afetando bezerras de até 30 dias de idade. Essa faixa etária coincide com a maior vulnerabilidade a *Cryptosporidium* sp., conforme indicado nos estudos de Blanchard (2012) e Dessì et al. (2020).

Por outro lado, Cardoso et al. (2008) consideraram a suscetibilidade de bezerros em uma faixa etária mais ampla, permanecendo suscetíveis à infecção por *C. parvum* até dois meses de idade, especialmente em situações de falha na transferência de imunidade passiva através do colostro. Nesse contexto, informações relacionadas à colostragem são de grande relevância. Dois dos bezerros diagnosticados com criptosporidiose, com 6 e 20 dias de idade, não haviam recebido colostro. Para três bezerros havia falha ou ausência de cura de umbigo.

Práticas de manejo, tais como alojamento adequado, controle ambiental, cuidados neonatais (colostragem e cura de umbigo) frequentemente não são adotadas adequadamente pelos criadores. Nesse contexto, Feitosa et al. (2010) relacionaram falhas na transferência da imunidade passiva às principais causas de morte em bezerros de raças leiteiras, por baixa ou não ingestão de colostro, ou devido ao uso de substitutivos do leite, prática comum em propriedades de produção de leite.

Cardoso et al. (2008) também alertaram sobre a falha de transferência de imunidade passiva na mortalidade em bezerros com diarreia neonatal, e Coura et al. (2014) fizeram

referência à imunidade passiva para reduzir a frequência de diarreia em bezerros na primeira semana após o nascimento, proporcionando aumento da resistência natural.

Chartier et al. (2013) fizeram comparação entre a liberação de oocistos em bezerros com diarreia e em bezerros sem diarreia em um ambiente específico, resultando em contagens elevadas de oocistos em bezerros com sinais clínicos da doença. Eles apontaram que a situação é agravada quando bezerros com diarreia compartilham o mesmo espaço com bezerros sem sinais clínicos, resultando em maior densidade de animais por área, um manejo de colostragem mais complexo e menos tempo dedicado ao cuidado de cada bezerro pelos funcionários.

De fato, bezerros em ambientes coletivos, sejam eles baias coletivas ou piquetes, em determinado rebanho com alta frequência de um agente associado à superlotação faz o risco de transmissão horizontal ser potencialmente alto (WINDEYER et al., 2014).

Curtis et al. (2016) observaram risco maior de diarreia em bezerros nas primeiras semanas após o nascimento quando criados em baias coletivas. Assim, locais de criação que mantém elevado número de bezerros diarreicos na faixa etária de 7 a 21 dias com criptosporidiose permite que liberem oocistos totalmente esporulados resistentes a desinfetantes comuns e que podem permanecer viáveis por vários meses, mesmo em condições ambientais adversas de temperatura e umidade. E deve ser considerado que esse local provavelmente será abrigo para novos bezerros suscetíveis e sem a devida higienização, dessa forma a doença se mantém no ambiente de criação. Lichtmannsperger et al. (2019) também ressaltam que a contaminação ambiental tem o potencial de disseminar tanto a criptosporidiose bovina quanto a humana.

No estudo foi expressiva a proporção de bezerros criados em sistemas intensivos, como em baias ou gaiolas individuais e também baias coletivas. Esses sistemas são atualmente muito usados para bezerros na idade em que a doença aconteceu, até 30 dias. Esses dados chamam atenção para um aspecto relevante, a falta de higiene de utensílios usados no manejo dos bezerros, como mamadeiras e baldes, bem como as mãos dos tratadores. Portanto, a contaminação ambiental constitui fator determinante para a manutenção da doença, assim como a falta de imunidade específica do hospedeiro (SANTÍN 2020; DESSÌ et al., 2020).

O estado corporal dos bezerros positivos variou de bom a regular. Isso mostra a rápida evolução para o óbito, sem tempo suficiente para a perda de peso antes do óbito. Virtala et al. (1996) alertaram que o ganho de peso pode ser afetado pela diarreia, mas

também por doenças respiratórias e infecções umbilicais. Renaud et al. (2021) destacaram o prejuízo no ganho de peso com relação aos dias em que os bezerros ficaram com diarreia grave, em seu estudo com *Cryptosporidium parvum*, Rotavírus e Coronavírus.

A manifestação clínica mais frequente nos bezerros do estudo foi diarreia, o que também foi observado por Lombardelli et al. (2019). Sabe-se que a criptosporidiose é clinicamente indistinguível de muitas outras doenças diarreicas, portanto a causa da enterite deve ser investigada em laboratórios de diagnóstico e incluída no diagnóstico diferencial do complexo de diarreia neonatal (SANTIN et al., 2020). Além disso, frente à possibilidade de doença subclínica e à ineficácia ao tratamento, várias investigações laboratoriais podem ser necessárias, pois mesmo o achado de oocistos nas fezes não é suficiente para identificar a criptosporidiose clínica (CHARTIER et al., 2013). Os oocistos encontrados nos exames de conteúdo intestinal só foram observados em objetiva de imersão. Devido ao tamanho reduzido dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. (média de 4-6 μ m), além da característica de sua parede incolor, eles são difíceis de serem detectados em análises coprológicas de rotina, demonstrando baixa eficiência de diagnóstico (FREDES, RAFFO; MUÑOZ, 2007). Além disso, é comum laboratórios que realizam exames de rotina de fezes não incluírem um exame apropriado para a detecção de *Cryptosporidium* sp., e não há padronização para os protocolos de diagnóstico, conforme citado por Ahmed et al. (2018), o que se torna um problema. Para Teixeira et al. (2019) as técnicas de microscopia para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais bovinas devem ser consideradas rotineiras em laboratórios. E Ahmad et al. (2018) enfatizam a importância de utilizar amostras fecais frescas para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp.

A coloração de ZNM mostrou-se precisa no diagnóstico da infecção, graças às propriedades álcool-ácido-resistentes das camadas da parede dos oocistos, que apresentam coloração púrpura intensa em fundo corado em azul, ou aparecem como estruturas vermelhas, esféricas a ovóides. Lombardelli et al. (2019) usaram a coloração em uma investigação de criptosporidiose em bezerros na Argentina. Para Rodrigues et al. (2016) a confiabilidade da técnica de ZNM reside no fato não haver outras estruturas parasitárias com as dimensões de *Cryptosporidium* que tenham essas características álcool-ácido-resistente nos oocistos.

Rodrigues et al. (2016) utilizaram a técnica de ZNM e a técnica da Safranina modificada e observaram que a técnica de ZNM proporcionou melhor visualização dos oocistos, indicando-a também para o diagnóstico de infecções leves, quando o número de oocistos é baixo, apesar da técnica da Safranina ter sido descrita como tendo bom contraste, ser mais simples e mais rápida (BAXBY et al., 1984). Já Muñoz et al. (2014) consideraram

vantajosa a técnica de Auramine em relação à coloração de ZNM na análise de grande número de amostras ou para estudos epidemiológicos, por ser um método de execução mais rápida e leitura eficiente na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. Guimarães et al. (2009) também empregaram a coloração de ZNM, utilizando corantes prontos (Newprov) à base de fucsina, álcool-ácido e azul de metileno para a visualização de oocistos de *Cryptosporidium* sp. nos esfregaços fecais.

Na necrópsia de seis dos nove bezerros infectados por *Cryptosporidium* sp. observaram-se fezes aderidas na cauda e/ou na região perianal. Essa observação confirma a manifestação clínica de diarreia, muitas vezes não informada no histórico, sendo um achado de necrópsia importante em animais com criptosporidiose. Vargas Junior et al. (2014) também relataram posterior sujo devido à diarreia profusa aquosa amarelada, esverdeada a amarronzada em bezerros com criptosporidiose. Em quatro bezerros positivos os olhos estavam deprimidos na órbita, sinal clínico indicativo de desidratação decorrente da diarreia.

O aspecto do conteúdo intestinal à necrópsia variou de vermelho-amarelado, amarelo-amarronzado, acinzentado e brancacento, com consistência frequentemente liquefeita a pastosa. Em um estudo de Lichtmannsperger et al. (2020) na Áustria foi examinada a consistência e o aspecto das fezes e feita uma correlação com as espécies de *Cryptosporidium* sp. envolvidas. No referido estudo *C. parvum* foi identificada com frequência significativamente maior em bezerros com fezes líquidas ou aquosas. Já as espécies *C. ryanae* e *C. bovis* estavam presentes em fezes moles e líquidas, respectivamente, sem manifestação de diarreia aquosa. Em um dos bezerros do estudo o intestino grosso estava sem conteúdo, mas esta alteração foi atribuída à torção de íleo, com impedimento do trânsito intestinal além do segmento deslocado.

Em um dos casos foi observada mucosa intestinal avermelhada, que foi atribuída à enterite por *Cryptosporidium* sp. e em outro caso foi observada mucosa moderadamente arroxeadada e opaca-acinzentada, mas estava relacionada à torção de íleo. Vargas Junior et al. (2014) observaram, em um surto de criptosporidiose no Sul do Brasil, dilatação dos vasos linfáticos relacionados ao intestino. Este achado não foi relevante nos bezerros examinados neste estudo.

Outros achados macroscópicos descritos por Vargas Junior et al. (2014) foram dilatação das alças intestinais por gases ou líquidos e congestão em vasos sanguíneos mesentéricos e intestinais. Kalkanov et al. (2016) comentaram sobre o edema evidente na mucosa intestinal, por vezes mucosa hiperêmica, com petéquias e, em alguns locais, lesões erosivas e

até vilosidades achatadas. No entanto, nos quatro bezerros que tiveram a morte atribuída à criptosporidiose não havia alterações macroscópicas significativas no intestino. Dessa forma, a não visualização de lesão macroscópica não descarta o envolvimento do parasito (JEZKOVÁ et al., 2021) e alerta para a necessidade de coleta de amostras para exame parasitológico e histopatológico.

O achado de *Cryptosporidium* foi mais frequente no íleo. Abdou et al. (2013) destacaram o íleo como local de detecção de *Cryptosporidium* sp. na histopatologia, com visualização mais frequente de estágios endógenos de desenvolvimento de *Cryptosporidium* sp. Kim et al. (2022) também relataram encontrar numerosos organismos esféricos basofílicos de 2 a 6 µm em íleo e jejuno, aderidos à superfície da mucosa e na lâmina própria. Ježková et al. (2021), em uma pesquisa com nútrias (*C. myocastoris*), também relataram jejuno e íleo como os locais mais parasitados por *Cryptosporidium*, apesar de não observarem alterações macroscópicas nesses segmentos intestinais.

As estruturas de *Cryptosporidium* foram vistas na superfície dos enterócitos, algumas vezes se percebia um halo não corado em torno dos parasitos. Holubová et al. (2020) descreveram os estágios de desenvolvimento do parasito na histopatologia, envolvidos por um vacúolo parasitóforo. A coloração de PAS evidenciou o protozoário na mucosa intestinal nos cortes histológicos. Essa técnica também foi empregada no estudo de Jezková et al. (2021).

Em quatro dos nove bezerros positivos foi observada necrose na mucosa do intestino delgado e em dois foram também encontradas áreas de necrose no intestino grosso, no entanto em dois desses casos havia enfermidade concomitante, considerada mais importante para a patogenia da necrose intestinal. Achatamento de vilosidades foi visto no intestino delgado em apenas um caso. Heine et al. (1984) descreveram vilosidades atróficas, tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso parasitados.

Infiltrado inflamatório foi significativo em mucosa e submucosa de apenas um bezerro que teve criptosporidiose como causa da morte. Era discreto e composto por macrófagos e eosinófilos. A escassez de alterações inflamatórias nos bezerros avaliados foi atribuída a localização superficial dos parasitos, o que naturalmente limita a resposta inflamatória, e, principalmente, a participação de desidratação grave decorrente de diarreia grave na progressão para a morte dos bezerros. El Shafei et al. (2018) compararam grupos de camundongos experimentalmente infectados por *Cryptosporidium* sp. e notaram infiltrado significativo de linfócitos, macrófagos e polimorfonucleares para a lâmina própria, como parte dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o parasito. Observaram também que em indivíduos imunocompetentes a resposta inflamatória era mais precoce e acentuada que em

camundongos imunossuprimidos. Outra observação desses autores foi de que a inflamação diminuiu em animais imunocompetentes, porém se manteve e de forma mais grave em grupos imunossuprimidos.

Dois dos bezerros positivos para *Cryptosporidium* na técnica de ZNM, com intensidade de infecção classificada como moderada e acentuada, haviam sido medicados com halofuginona, ressaltando que para um desses bezerros a criptosporiose foi a causa da morte. Jarvier et al. (2005) comentaram sobre a relação do uso de lactato de halofuginona com retardo do início da diarreia, que pode ser atribuído ao atraso na infecção por *C. parvum*. Para De Waele et al. (2010) o retardo no início da diarreia com utilização de lactato de halofuginona em bezerros, além de mostrar-se eficaz na redução dos sinais clínicos diminuiu a contaminação ambiental com oocistos de *Cryptosporidium* sp. Por outro lado, Martin et al. (2020) afirmaram que o uso indiscriminado desse medicamento favorece a proliferação de patógenos oportunistas, alterações na microbiota gastrintestinal, com seleção e proliferação de bactérias resistentes.

Apesar do progresso na obtenção de fármacos para o tratamento da criptosporidiose, sabe-se que ainda não existem fármacos específicos eficazes no combate a *Cryptosporidium* sp. Além disso, no histórico foram identificadas medicações com antibióticos como penicilina, gentamicina, doxiciclina, enrofloxacina, fluorquinolona, terramicina, sulfadoxina+trimetoprima, sulfas e florfenicol. Essas informações evidenciam opções por tratamentos não guiados por diagnóstico médico veterinário e uso indiscriminado de antimicrobianos aumentando, por sua vez, o risco eminente de multirresistência a antimicrobianos.

Desprendimento do epitélio superficial da mucosa intestinal foi observado em vários bezerros, positivos para *Cryptosporidium* ou não. Essa alteração é pós-mortal e resultou limitações na visualização do enteropatógeno, especialmente na coloração em HE, pois o parasito é visualizado na superfície da mucosa intestinal, região que se desprende facilmente. Além de dificultar a evidênciação do protozoário na histopatologia, dificulta a visualização das demais alterações macroscópicas e microscópicas. Autores como Lucena et al. (2010) e Souza et al. (2015) relacionam a frequência dessas alterações em laboratórios de diagnóstico veterinário à demora na condução dos animais à necropsia e a falhas na fixação do material. As alterações pós-mortais prejudicam a interpretação diagnóstica, gerando resultados com limitações ou inconclusivos.

Um dos bezerros tinha salmonelose associada a criptosporidiose. Adaska et al. (2017) relataram infarto cecal em bezerros neonatos associado a enteropatógenos como *E. coli* e

Salmonella sp. Apesar da salmonelose, considerada uma doença importante em bezerros de até 30 dias de idade, frequentemente estar associada a diarreia, podem ocorrer casos na forma septicêmica (Guizelini et al., 2019), que não necessariamente levarão a manifestação clínica entérica, como o sorotipo *S. Dublin*, capaz de causar septicemia grave em bovinos de todas as idades.

5 CONCLUSÕES

Infecção por *Cryptosporidium* sp. foi identificada somente em bezerros com 6 a 21 dias de idade, a maioria deles com posterior sujo de fezes liquefeitas à necropsia, evidência de manifestação clínica de diarreia. O exame *post mortem* foi uma importante ferramenta diagnóstica, além de permitir coleta de amostras de conteúdo intestinal de qualidade para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp.

A infecção por *Cryptosporidium* sp. frequentemente esteve associada a afecções respiratórias, doenças bacterianas como Salmonelose, e doenças decorrentes de falhas de manejo.

O exame de conteúdo intestinal dos bezerros corado pela técnica de ZNM foi eficaz para o diagnóstico de infecção por *Cryptosporidium* sp. e a técnica a histoquímica de PAS foi útil para evidenciar as estruturas no parasito em cortes histológicos de intestino.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, A. G.; HARBA, N. M.; AFIFI, A. F.; ELNAIDANY, N. F. Assessment of *Cryptosporidium parvum* infection in immunocompetent and immunocompromised mice and its role in triggering intestinal dysplasia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e593-e600, 2013.
- ADASKA, J. M.; MOELLER, R. B.; BLANCHARD, P. C.; ALY, S.S. Infarto cecal em bezerros neonatos: um estudo retrospectivo. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 2, p. 242-244, 2017.
- AHMED, S.A.; KARANIS, P. Comparison of current methods used to detect *Cryptosporidium* oocysts in stools. **International Journal of hygiene and environmental health**, v. 221, n. 5, p. 743-763, 2018.
- ASSIS-BRASIL, N. D.; PEREIRA, C. M.; HINNAH, F.L. et al. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 423- 430, 2013.
- BRASIL, N. D. A.; HINNAH, F. L.; FISS, L.; SALLIS, E. S.; GRECCO, F. B.; LADEIRA, S. R., SCHILD, A. L. Doenças respiratórias em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 33 surtos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 745-751, 2013.
- AVENDAÑO, C.; RAMO, A.; CASTIBLANCO, C.V. et al. Genetic uniqueness of *Cryptosporidium parvum* from dairy calves in Colombia. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1317-1323, 2018.
- BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C. A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **The Journal of Hygiene**, v. 92, p. 317-323, 1984.
- BOTTEON, R. D. C. C. M.; BOTTEON, P. D. T. L.; SANTOS JÚNIOR, J. D. C. B. S. et al. Frequência de diarreia em bezerros mestiços sob diferentes condições de manejo na região do médio Paraíba Rio de Janeiro e Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 153-160, 2008.
- BLANCHARD, P.C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, p. 443-464, 2012.
- CARVALHO, J. G.; CARVALHO, A. U.; HEINEMANN, M. B.; COELHO, S. G.; PAES, P. R.; MOREIRA, G. H.; VESPASIANO, L. C.; FACURY FILHO, E. J. Estudo longitudinal da infecção por enteropatógenos em bezerros neonatos, com diarreia, sob diferentes estratégias de aleitamento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 529-536, 2014.
- CURTIS, G. C.; ARGO, C. M.; JONES, D. et al. Impact of feeding and housing systems on disease incidence in dairy calves. **Veterinary Record**, p. 103895, 2016.
- CHARTIER, C.; RIEUX, A.; DELAFOSSE, A.; LEHEBEL, A.; PARAUD, C. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh calf faeces: characteristics of two simple tests and evaluation of a semi-quantitative approach. **Veterinary Journal**, v. 198, p. 148-152, 2013.

DELAFOSSÉ, A.; CHARTIER, C.; DUPUY, M. C.; DUMOULIN, M.; PORS, I.; PARAUD, C. *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, n. 4, p. 406-412, 2015.

DELLING, C.; DAUGSCHIES, A.; BANGOURA, B.; DENGLER, F. *Cryptosporidium parvum* alters glucose transport mechanisms in infected enterocytes. **Parasitology Research**, v. 118, p. 3429-3441, 2019.

DESSI, G.; TAMPONI, C.; VARCASIA, A.; SANNA, G.; PIPIA, A. P.; CARTA, S. SALIS, F.; DIAZ, P.; SCALA, A. *Cryptosporidium* infections in sheep farms from Italy. **Parasitology Research**, v. 119, p. 4211-4218, 2020.

DE WAELE, V.; SPEYBROECK, N.; BERKVEN, D.; MULCAHY, G.; MURPHY, T. M. Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: use of halofuginone lactate in two different calf rearing systems. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 96, n. 3-4, p. 143-151, 2010.

EL-DEEB, W.; IACOB, O.; FAYEZ, M.; ELSOHABY, I.; ALHAIDER, A.; MKRTCHYAN, H. V.; ALHUMAM, N. Assessment of the immune response of clinically infected calves to *Cryptosporidium parvum* infection. **Agriculture**, v. 12, n. 8, p. 1151, 2022.

EL-SEEDY, F.R.; ABED, A.H.; YANNI, H.A.; ABD EL-RAHMAN, S.A.A. Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. n1, p. 45-51, 2016.

EL SHAFEI, O.K.; SAAD, A.G.E.; HARBA, N.M.; SHARAF, O.F.; SAMAKA, R.M.; FARAG, S.A. Therapeutic effect of phenyl vinyl sulfone and nitazoxanide on experimentally infected mice with cryptosporidiosis. **Menoufia Medical Journal**, v. 31, n. 3, p. 786, 2018.

FAYER, R.; SPERR, C.A.; DUBEY, J.P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER, R. **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 1-42.

FAYER, R.; GASBARRE, L.; PASQUALI, P.; CANALS, A.; ALMERIA, S.; ZARLENGA, D. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 49-56, 1998.

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

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 260-266, 2007.

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

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

FEITOSA, F.L.F.; CAMARGO, D.G.; YANAKA, R.; MENDES, L.C.N.; PEIRÓ, J.R.; BOVINO, F.; LISBOA, J.A.N.; PERRI, S.H.V.; GASPARELLI, E.R.F. Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, às 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 696-704, 2010.

FOSTER, D.M; SMITH, G.W. Pathophysiology of diarrhea in calves. **Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 13-36, 2009.

FREDES, F.; RAFFO, E.; MUÑOZ, P. Short Note: First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adélie penguin from the Antarctic using acid-fast stain. **Antarctic Science**, v. 19, n. 4, 437-438, 2007.

GARCIA, L.S.; BREWER, T. C.; BRUCKNER, D. A. Incidence of *Cryptosporidium* in all patients submitting stool specimens for ova and parasite examination: monoclonal antibody IFA method. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 11, n. 1, p. 25-27, 1988.

GARRO, C. J.; MORICI, G. E.; UTGÉS, M. E.; TOMAZIC, M. L.; SCHNITTGER, L. Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, n. 2, p. 36-41, 2016.

GOOKIN, J.L.; NORDONE, S.K.; ARGENZIO R.A. Host responses to *Cryptosporidium* infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 1, p. 12-21, 2002.

GUIMARÃES, A. M.; GUEDES, E.; CARVALHO, R. A. Ocorrência de *Giardia* spp. em bezerros leiteiros no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 652-653, 2001.

GUIMARÃES, L.B.; FACURY FILHO, E. J.; CARVALHO, A.U.; FERREIRA, P.M.; RIBEIRO, M.F.B.; FERREIRA, M.G.; FREITAS, M.D. Comportamento da excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. em bezerros infectados naturalmente. **Ciência Animal Brasileira** (Supl.1), p. 660-665, 2009.

GUIZELINI, C. C.; PUPIN, R. C.; LEAL, C. R.; RAMOS, C. A.; PAVARINI, S. P.; GOMES, D. C.; LEMOS, R. A. Salmonellosis in calves without intestinal lesions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 580-586, 2019.

- GRAAF, D. C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L. M. et al. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 1269-1287, 1999.
- GRINBERG, A.; MARKOVICS, A.; GALINDEZ, J.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; KOSAK, A.; TRANQUILLO, V. Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate. **Veterinary Record**, v. 151, p. 606-608, 2002.
- HEINE, J.; POHLENZ, J. F. L.; MOON, H. W.; WOODE, G. N. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 150, n. 5, p. 768-775, 1984.
- HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, n. 3-4, p. 594-596, 1981.
- HOLUBOVÁ, N.; TŮMOVÁ, L.; SAK, B.; HEJZLAROVÁ, A.; KONEČNÝ, R.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. **Parasites & Vectors**, v. 13, p. 1-17, 2020.
- ICHIKAWA-SEKI, M.; MOTOOKA, D.; KINAMI, A. et al. Specific increase of *Fusobacterium* in the faecal microbiota of neonatal calves infected with *Cryptosporidium parvum*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 12517, 2019.
- JARVIE, B. D.; TROTZ-WILLIAMS, L. A.; MCKNIGHT, D. R.; LESLIE, K. E.; WALLACE, M. M.; TODD, C. G.; SHARP, P. H.; PEREGRINE, A. S. Effect of halofuginone lactate on the occurrence of *Cryptosporidium parvum* and growth of neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 5, p. 1801-1806, 2005.
- JEŽKOVÁ, J.; LIMPOUCHOVÁ, Z.; PREDIGER, J.; HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; KONEČNÝ, R.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium myocastoris* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the species adapted to the nutria (*Myocastor coypus*). **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 813, 2021.
- JONES, S.L.; BLIKSLAGER, A.T. Role of the enteric nervous system in the pathophysiology of secretory diarrhea. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 3, p. 222-228, 2002.
- KALKANOV, I.; DINEV, I.; DIMITROV, K. et al. Clinical and morphological investigations in a spontaneous *Cryptosporidium enteritis* outbreak in calves. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 19, n. 4, p. 334-339, 2016.
- KIM, J.; PARK, J. G.; MATTHIJNSSENS, J.; LEE, J. H.; BAE, Y. C.; ALFAJARO, M. M.; PARK, S. I.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 291-303, 2011.
- KIM, J.; LEE, K.; ROH, S.G.; KIM, H.Y.; KIM, J.W.; SO, B.; CHOI, E.J. Clinical cases of zoonotic *Cryptosporidium parvum* (subtype IIdA15G1) infections in Korean goats. **Veterinarni Medicina**, v. 67, n. 3, p. 156-162, 2022.

KLEIN-JÖBSTL, D.; IWERSEN, M.; DRILLICH, M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 5110-5119, 2014.

LARSON, R. L.; TYLER, J. W. Reducing calf losses in beef herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 21, n. 2, p. 569-584, 2005.

LEITCH, G. J.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. **Journal of Biomedical Research**, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2012.

LICHTMANNSPERGER, K.; HARL, J.; FREUDENTHALER, K. et al. *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium ryanae*, and *Cryptosporidium bovis* in samples from calves in Austria. **Parasitology Research**, v. 119, p. 4291-4295, 2020.

LOMBARDELLI, J.A.; TOMAZIC, M.L.; SCHNITTGER, L. L.; TIRANTI, K. I. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves and GP60 subtyping of diarrheic calves in central Argentina. **Parasitology Research**, v. 118, p. 2079–2086, 2019.

LUCENA, R.B.; PIEREZAN F.; KOMMERS G.D.; IRIGOYEN L.F.; FIGHERA R.A.; BARROS C.S.L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p.428-434, 2010.

MARTIN, C. C.; BASQUEIRA, N. S.; RAMOS, J.S. et al. Influence of early use of antimicrobial on the health and performance of Holstein calves in the first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 1, p. 17-28, 2020.

MARTINS, S.; SOUSA, S.; MADEIRA DE CARVALHO, L. M.; BACELLAR, J.; DA SILVA, J. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Northwest Portugal dairy calves and efficacy of halofuginone lactate on the prevention of Cryptosporidiosis. **Cattle Practice**, v. 15, n. 2, p. 152–156, 2007.

MEGANCK, V.; HOFLACK, G.; OPSOMER, G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2014.

MENDONÇA, F. L.; CARVALHO, J. G.; SILVA, R. J.; FERREIRA, L. C.; CERQUEIRA, D. M.; ROGGE, H. I.; ANDRADE, J. P.; FERREIRA, L. D.; ARAÚJO, M. V. V.; MOREIRA, T. F.; CARVALHO, A. U.; FACURY-FILHO, E. J. Use of a natural herbal-based feed additive containing isoquinoline alkaloids in newborn calves with cryptosporidiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 300, p. 109615, 2021.

MILLEMANN, Y. Diagnosis of neonatal calf diarrhoea. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 160, n. 8/9, p. 404-409, 2009.

MOHTESHAMUDDIN, K.; HAMDAN, L.; ALKAABI, A. B.; BARIGYE, R. *Cryptosporidium parvum* and other enteric pathogens in scouring neonatal dairy calves from the Al Ain region, United Arab Emirates. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, p. 100435, 2020.

MUÑOZ A, P.; MERCADO P, R.; MORALES T, G.; BRAVO O, V.; RAFFO C, E. *Cryptosporidium* spp., comparative diagnosis and geospatial distribution in diarrheic calves from dairy farms, Valdivia, Chile. **Revista MVZ Córdoba**, v. 19, n. 1, 2014.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P.; PACHECO, M. D.; et al. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 419-424, 2007.

OLLIVETT, T. L.; NYDAM, D. V.; BOWMAN, D. D.; ZAMBRISKI, J. A.; BELLOSA, M. L.; LINDEN, T. C.; DIVERS, T. J. Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1643-1648, 2009.

OUAKLI, N.; BELKHIRI, A.; DE LUCIO, A. et al. *Cryptosporidium*-associated diarrhoea in neonatal calves in Algeria. **Veterinary Parasitology**, v. 12, p. 78-84, 2018.

PETRY, F. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, n. 5, p. 586-601, 2004.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Manual de métodos histotecnológicos do Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos da América**. Washington, 1995. c. 21, p. 228.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF K.W. et al. **Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, pigs and Goats**. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. 2156 p.

RENAUD, D. L.; ROT, C.; MARSHALL, J.; STEELE, M. A. The effect of *Cryptosporidium parvum*, Rotavirus, and Coronavirus infection on the health and performance of male dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 2151-2163, 2021.

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

ROMERO R.; PEDROZO R.; VERA E. La cryptosporidiosis en los terneros recién nacidos. Su etiología, patogenia, síntomas, tratamiento y profilaxis. **Revista de Ciencia y Tecnología**, v. 3, p. 99-108, 2001.

RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. **International Journal of Parasitology**, v. 45, n. 6, p. 367-373, 2015.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L. et al. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 103-117, 2004.

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

SANTÍN, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 223-238, 2020.

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

SILVERLÅS, C.; BOSAEUS-REINECK, H.; NÄSLUND, K.; BJÖRKMAN, C. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 155-161, 2013.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B.; GRIMASON, A.M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 133-142, 2005.

SOUZA, R.I.C.; SANTOS, A.C.; RIBAS, N.L.K.S.; COLODEL, E.M.; LEAL, P.V.; PUPIN, R.C.; CARVALHO, N.M.; LEMOS, R.A.A. Doenças tóxicas de bovinos em Mato Grosso do Sul. **Semina, Ciências Agrárias**, v. 36 n. 3, p. 1355-1368, 2015.

SUVARNA, S.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. The hematoxylin and eosin. In: **Bancroft's theory and practice of Histological Techniques**. 7th. ed. Churchill Livingstone: London, 2013. p. 172-186.

TEIXEIRA, W. F. P.; VIEIRA, D.S.; LOPES, W. D. Z.; ESPERANÇA, M. F.; BRESCIANI, K. D. S. Criptosporidiose bovina: aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos. **PubVet**, v. 13, p. 158, 2019.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 10, p. 1047-1058, 2002.

UZAL, F.A.; PLATTNER, B.L.; HOSTETTER J.M. Alimentary System. In: MAXIE, M.G. (ed) **Pathology of Domestic Animals**. 6. ed. St. Louis : Elsevier, 2016. Cap 1. v. 2. p. 239-241.

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

VIRTALA, A.M.; MECHOR, G.D.; GRÖHN, Y.T.; ERB, H.N. The effect of calthood diseases on growth of female dairy calves during the first 3 months of life in New York State. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1040–1049, 1996.

WINDEYER, M.C.; LESLIE, K.E.; GODDEN, S.M.; HODGINS, D.C.; LISSEMORE, K.D.; LEBLANC S.J. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 2, p. 231-240, 2014.