

Avaliação de bezerros com quadro clínico de diarreia e incidência de Criptosporidiose em fazendas comerciais leiteiras no município de Coromandel – MG

Evaluation of calves with clinical framework of diarrhea and incidence of Cryptosporidiosis in commercial dairy farms in the municipality of Coromandel – MG

**Danielle Bianca Barros Silva¹
Estevão Vieira de Rezende²**

Resumo: A Criptosporidiose é responsável por uma das causas mais comuns de diarreia neonatal bovina, podendo causar grandes prejuízos e até mesmo a morte dos animais acometidos. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a incidência de *Cryptosporidium* spp. e verificar a correlação clínica entre a presença do protozoário e o quadro clínico de diarreia. Foram coletadas 100 amostras de fezes, de aproximadamente 10g, em bezerros com idade de até 30 dias, através de estimulação da ampola retal. As amostras foram identificadas individualmente e enviadas ao Laboratório de Microscopia e Parasitologia Animal do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM. Elas foram analisadas pelo protocolo de concentração por sedimentação em formol-éter, coradas pela técnica de coloração de Zielh-Neelsen modificado (ZNM) e classificadas de acordo com o número de oocistos contados em 20 campos microscópicos. Os resultados obtidos revelaram que 61% dos animais apresentavam diarreia. Destes, 41% (25 animais) foram positivos para *Cryptosporidium* spp. Conclui-se que ocorreu uma alta incidência de Criptosporidiose estando associada com o quadro clínico de diarreia.

Palavras-chave: Terneiros. *Cryptosporidium* spp. Trato gastrointestinal. Mortalidade.

Abstract: Cryptosporidiosis is responsible for one of the most common causes of neonatal bovine diarrhea, which can cause great damage and even death of affected animals. The objective of this study was to evaluate the incidence of *Cryptosporidium* spp. and verify the clinical correlation between the presence of the protozoa and the clinical picture of diarrhea. A total of 100 fecal samples were collected, approximately 10 g, in calves up to 30 days old, through stimulation of the rectal ampulla. Samples were identified and sent to the Laboratory of Microscopy and Animal Parasitology of the University Center of Patos de Minas -UNIPAM. The samples were analyzed by the protocol of concentration by sedimentation in formol-ether, stained by the modified Zielh-Neelsen staining technique (ZNM) and classified according to the number of oocysts counted in 20 microscopic fields. The results showed that 61% of the animals presented diarrhea. Of these, 41% (25 animals) were positive for *Cryptosporidium* spp. It is concluded that a high incidence of Cryptosporidiosis was associated with the clinical picture of diarrhea.

Keywords: Terriers. *Cryptosporidium* spp. Gastrointestinal tract. Mortality.

¹ Graduanda do curso de Medicina Veterinária do (UNIPAM). E-mail: daniellebarrosvet@outlook.com

² Docente do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM). E-mail: estevaovr@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A atividade leiteira tem um papel marcante na ordem econômica e social do agronegócio brasileiro, com uma participação efetiva no PIB da pecuária (ZOCCAL, 2012).

No Brasil, o leite é um dos seis produtos mais importantes da agropecuária, sendo imprescindível no suprimento de alimentos e responsável por gerar emprego e renda para a população (EMBRAPA, 2016).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, o Brasil é o quinto maior produtor mundial de leite, ficando atrás apenas de Estados Unidos, Índia, China e Rússia (FAO, 2013).

No ranking nacional, Minas Gerais ocupa o primeiro lugar entre os estados que mais produzem leite, o Estado do Rio Grande do Sul ocupou o segundo lugar no ano de 2014 e o Estado do Paraná se encontrou no terceiro lugar (EMBRAPA, 2016).

Vários fatores interferem na cadeia produtiva de bovinos, como determinadas doenças que podem estar presentes no início da vida dos bezerros e podem interferir no desenvolvimento e na produtividade desses animais quando alcançarem a idade adulta. Diarreia em bezerros é uma das causas que representa grande perda econômica na cadeia produtiva de bovinos (VARGAS JÚNIOR, 2014).

A Criptosporidiose é responsável por uma das causas mais comuns de diarreia em bezerros com idade de até 30 dias, representando até 37,2% dos casos (BLANCHARD, 2012). Em bezerros de até 15 dias de idade pode chegar até 45,8% dos casos (SANTÍN; TROUT; FAYER, 2008), sendo uma das maiores causas da diarreia neonatal bovina (MAWLY *et al.*, 2015).

Os bovinos podem ser infectados por quatro espécies de *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* (NUNES, 2015). Em um estudo realizado com 22 mil crianças na África e na Ásia, foi revelado que *Cryptosporidium parvum* era um dos quatro patógenos responsáveis pelas diarreias mais severas, sendo considerada a segunda causa mais grave de diarreia e morte em crianças, perdendo apenas para o Rotavírus (RYAN; FAYER; XIAO, 2014).

As propriedades epidemiológicas e clínicas da infecção revelam que a maioria dos casos de Criptosporidiose em bezerros é pela espécie de *C. parvum* (MEIRELES, 2010), mesmo tendo um papel controverso, pois pode ser encontrado em animais sadios, porém esse protozoário é considerado uma importante causa de diarreia em neonatos infectados naturalmente. Mas constantemente age como oportunista junto com outros enteropatógenos, levando a problema intestinal e diarreia (VARGAS JÚNIOR, 2014).

Essa doença pode causar graves prejuízos econômicos, com o atraso do crescimento e do desenvolvimento dos animais acometidos e até mesmo a morte pelo agravamento dos sinais clínicos (VARGAS JÚNIOR, 2015).

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

Este estudo teve como objetivo avaliar a incidência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros de até 30 dias e verificar a correlação clínica entre a presença do protozoário e o quadro clínico de diarreia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a colheita do material fecal dos 100 animais utilizados, foram selecionadas 18 fazendas comerciais leiteiras, de forma aleatória, no município de Coromandel – MG, de acordo com o número de animais no momento da coleta, até 30 dias de vida, com ou sem diarreia, sendo identificados os animais que apresentavam um quadro clínico de diarreia ou com histórico de ocorrência. Esses animais eram puros e/ou mestiços da raça Holandesa, sem distinção de sexo e criados em diferentes condições de manejo.

Para a colheita das amostras de fezes, utilizaram-se luvas de procedimento, sendo feita a estimulação da ampola retal dos bezerros e coletadas aproximadamente 10g de fezes, sem causar qualquer tipo de dor ou injúria aos mesmos.

Os procedimentos experimentais foram analisados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Patos de Minas, sendo aprovado sob o protocolo de número 68/18.

As amostras foram identificadas individualmente com a data de nascimento do animal, nome da propriedade e dia da coleta. Além disso, as fezes foram classificadas de acordo com sua consistência no momento da coleta.

As amostras foram analisadas pelo protocolo de concentração por sedimentação em formol-éter, que consistiu nos seguintes passos:

- 1- Pesaram-se 2g de fezes, diluindo-as em aproximadamente 10 mL de água ou 10 ml formalina (conservante), conforme figura 1;
- 2- Filtrou-se a suspensão fecal através de um tamis;
- 3- Colocaram-se 5-6 mL do filtrado fecal num tubo de 15 mL, conforme figura 2;
- 4- Acrescentaram-se 5-6 mL de éter;
- 5- Realizou-se a homogeneização e centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm;
- 6- Descartou-se o sobrenadante;
- 7- Realizou-se o esfregaço com o sedimento remanescente.

Após a secagem das lâminas, foi utilizada a Técnica de coloração de Zielh-Neelsen modificado (ZNM), conforme figura 3:

- 1- Fez-se o esfregaço fecal, deixando-o secar naturalmente;
- 2- Fixou-se o esfregaço pelo processo de fixação com metanol por 2 minutos e depois retirado o excesso de mesmo;
- 3- Cobriu-se a lâmina com carbol-fucsina (1g de Fucsina básica, 90mL de fenol 5%, 10mL de álcool absoluto) por 20 minutos;
- 4- Realizou-se a lavagem da lâmina em água corrente para retirar o corante primário;
- 5- Realizou-se a diferenciação pelo ácido sulfúrico a 5% por 30 segundos e repetida quando permaneceram resíduos fortes de fucsina;
- 6- Lavou-se novamente a lâmina em água corrente e cobriu-se a mesma com verde malaquita 0,5% por 2 minutos;
- 7- Realizou-se a última lavagem da lâmina em água corrente, retirando-se o excesso do corante e deixando a lâmina secar completamente;
- 8- Observaram-se, por fim, as lâminas ao microscópio (aumento de 1000X).

Figura 1: Pesagem das amostras



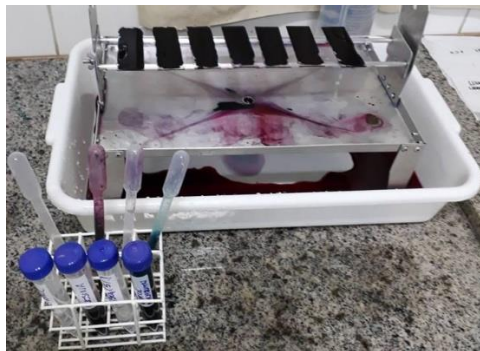
Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Figura 2: Filtrado fecal



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Figura 3: Coloração das lâminas



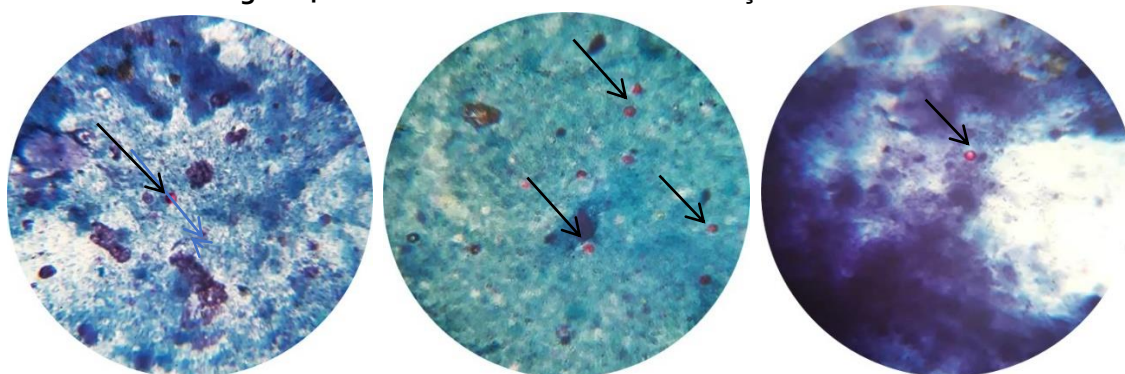
Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Seguindo os parâmetros descritos por Castro-Hermida *et al.* (2002), o número de oocistos eliminados foram avaliados semi - quantitativamente de acordo com a média do número de oocistos contados em 20 campos microscópicos selecionados aleatoriamente e atribuídos os seguintes escores:

- 1- Negativas quando nenhum oocisto for detectado após o exame de no mínimo 20 campos microscópicos (1000X);
- 2- Score 01 (1 oocisto por campo);
- 3- Score 2 (2-5 oocistos por campo);
- 4- Score 3 (6-10 oocistos por campo).

Visualmente os oocistos observados nas lâminas coraram-se do rosa ao vermelho ou púrpuro, sobre fundo verde, conforme a figura 4:

Figura 4: Oocistos encontrados na visualização das lâminas



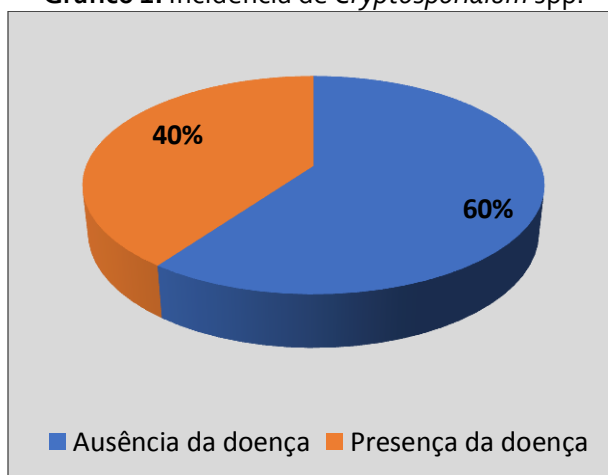
Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Os resultados da incidência do protozoário *Cryptosporidium* spp. e a correlação clínica entre a presença do protozoário e o quadro clínico de diarreia foram registrados e analisados por meio de estudos de estatística descritiva, revelando a média e frequência dos dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

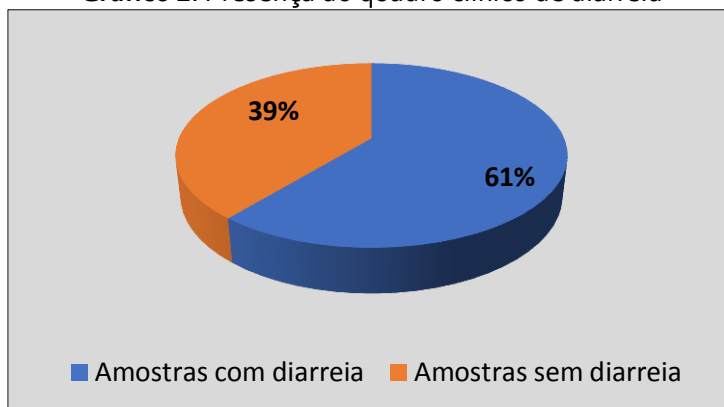
Foram identificados oocistos do gênero *Cryptosporidium* spp. nas fezes de 40 bezerros (40%), conforme o gráfico 1:

Gráfico 1: Incidência de *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Dados da pesquisa

A maioria das amostras de fezes coletadas apresentava consistência semilíquida a líquida, de coloração amarela ou branco-esverdeada, com alteração marcante em seu odor. Alguns animais apresentavam presença de sangue nas fezes (hematoquezia) e tenesmo. De um total de 100 amostras, 61% (61 amostras) apontaram a diarreia como principal sinal clínico e 39% (39 amostras) não apresentavam fezes diarreicas, de acordo com o gráfico 2:

Gráfico 2: Presença do quadro clínico de diarreia

Fonte: Dados da pesquisa

Dos animais que apresentavam diarreia, 41% (25 animais) tiveram diagnóstico positivo para *Cryptosporidium* spp. Os outros 59% (36 animais) foram negativos ao exame, conforme o gráfico 3:

Gráfico 3: Relação entre *Cryptosporidium* spp. e diarreia

Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com o estudo realizado por Niine *et al.* (2017), 92% dos animais apresentaram diarreia (132/144) e 84,7% (122/144) apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes, concordando com a alta incidência de diarreia e excreção de oocistos.

Em alguns estudos, não houve associação entre infecção por *C. parvum* e diarreia ou outros sinais clínicos foram encontrados (DE RYCKE *et al.*, 1986; HUETINK *et al.*, 2001). No entanto, os resultados de um trabalho realizado no Canadá mostraram um risco três vezes maior para os bezerros que eliminaram oocistos serem diarreicos do que os não infectados (TROTZ-WILLIAMS *et al.*, 2011). Outro exemplo é da Índia, onde os resultados mostram 1,59 vezes maior risco de um bezerro sofrer de diarreia se infectado (SINGH *et al.*, 2006), ambos concordando com este trabalho, em que uma elevada quantidade de animais apresentava diarreia e foram diagnosticados positivos para *Cryptosporidium* spp.

Segundo Kjellén (2007), em um estudo realizado no Vietnã, onde foram coletadas 120 amostras de fezes, dez amostras (8%) foram positivas para *C. parvum*. Quarenta e cinco (38%) foram coletados de bezerros que sofriam de diarreia. Quatro (9%) dos bezerros com diarreia

foram positivos para *C. parvum*, neste caso, a prevalência pode ser considerada baixa em comparação com o presente trabalho devido ao reduzido número de animais nas fazendas avaliadas.

Em Minas Gerais, Ferreira *et al.* (2009) revelaram a prevalência de 9,2% do agente em amostras de fezes normais e diarreicas de bezerros entre 5 e 60 dias, utilizando kit ELISA para o diagnóstico, enquanto Batista *et al.* (2008) utilizaram o mesmo kit e observaram prevalência de 68%, porém todas as amostras processadas foram oriundas de fezes diarreicas de bezerros com 7 a 14 dias de idade. A alta frequência de associação do *Cryptosporidium* spp. com agentes bacterianos, principalmente *Salmonella* spp. e *E. coli*, pode ter ocorrido devido às condições ambientais favoráveis à manutenção de alta carga bacteriana, especialmente o alto índice pluviométrico do período experimental, e a alta densidade de bezerros, concordando com este trabalho que outros agentes podem estar associados aos casos de diarreia dos bezerros.

Segundo Barros (2015), em um estudo realizado em diversas explorações leiteiras da ilha Terceira, em Açores, foi demonstrado que 31,2% dos vitelos estudados se encontravam infectados por *Cryptosporidium* sp. e 54,9% das explorações estudadas possuíam um ou mais vitelos infectados, concordando com este presente trabalho, em que houve uma elevada porcentagem de fazendas identificadas como positivas para a doença.

Nos Açores, ilha de S. Miguel, Martins (2013) identificou a presença de *Cryptosporidium* sp. em 26% das amostras de fezes analisadas, valores inferiores aos deste trabalho. Também nos Açores, Fonseca e Silva (2000) reportaram uma proporção de *Cryptosporidium parvum* de 100% utilizando, no entanto, um teste imunoenzimático. Outros estudos realizados em vitelos reportaram incidências de 25,4% na zona Noroeste de Portugal Continental (MENDONÇA *et al.*, 2007) e 74,8% também no noroeste de Portugal Continental em animais até 12 semanas (MARTINS *et al.*, 2007). Em outro estudo realizado por Fonseca (2000), na zona de Montemor-o-Novo, foi obtida uma prevalência de 23,3%.

Foi encontrada uma incidência de 75% de propriedades leiteiras positivas neste estudo. Esse valor vai também ao encontro dos valores obtidos em outros estudos realizados por todo o mundo. Martins (2013) observou uma prevalência de 43% no estudo realizado na ilha de S. Miguel, Açores (valor inferior ao do presente estudo). De acordo com Carvalho *et al.* (2011), num estudo realizado no noroeste de Portugal continental, 100% das explorações possuíam vitelos infectados, no entanto todas as explorações possuíam histórico de diarreia. No Canadá foi obtida uma prevalência de 77% (TROTZ-WILLIAMS *et al.*, 2011). Porém, diversos fatores devem ser levados em consideração em relação a essas comparações, como a idade da população em estudo, se a população está limitada a vitelos diarreicos ou não diarreicos, se o estudo inclui uma amostra única por animal ou amostras colhidas ao longo do tempo e/ou a sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico utilizado.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que ocorreu uma alta incidência de *Cryptosporidium* spp., estando associada com o quadro clínico de diarreia. Estudos posteriores deverão ser conduzidos com o objetivo de definir um protocolo de tratamento eficiente, em que o risco de infecção seja mensurado adequadamente e medidas profiláticas possam ser adotadas a fim de diminuir a excreção de oocistos pelos animais.

REFERÊNCIAS

- BARROS, S. V. A. D. **Contribuição para o estudo da criptosporidiose em vitélos de explorações leiteiras da ilha Terceira, Açores.** 2015. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, 2015.
- BLANCHARD, P. C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 3, p. 443-464, 2012.
- CARVALHO, L.M., MARTINS, S., SOUSA, S., BACELAR, J., CANNAS DA SILVA, J. **Cryptosporidium spp. as a major agent of calf diarrhea: Epidemiology and Control with Halofuginone Lactate in Portugal** [Editado em polaco]. *Lecznica Duzych Zwierzat*, 2, 35-41. Comunicação Oral a convite do Prof. Doutor Dariusz Bednarek e Dr. Marek Branicki. VII Konf. Bujatryczna w Puławach (VII Congresso de Buiatria da Polónia), Polish National Veterinary Research Institute, Pulawy, 15-16 de Abril, 2011.
- CASTRO-HERMIDA, J. A.; GONZÁLEZ-LOSADA, Y. A.; MEZO-MENÉNDEZ, M.; ARES-MAZÁS, E. A study of cryptosporidiosis in cohort of neonatal calves. **Vet. Parasitol.**, v.106, p. 11-17, 2002.
- DE RYCKE, J.; BERNARD, S.; LAPORTE, J.; NACIRI, M.; POPOFF, M. R.; RODOLAKIS, A. Prevalence of various enteropathogens in the feces of diarrheic and healthy calves. **Ann. Rech. Vet.**, v. 17, p. 159-168, 1986.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Gado do Leite – Importância Econômica.** Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> Acesso em 13 mar 2018.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Agriculture Outlook 2013-2022, 2013.
- FAYER, R. Taxonomy and delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p. 90-97, 2010.
- FERREIRA, M. G. **Prevalência dos principais enteropatógenos em bezerras da fase de aleitamento em explorações leiteiras semi - intensivas de duas bacias leiteiras do estado de Minas Gerais.** Dissertação apresentada a Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção de grau em Mestre em Ciência Animal, 2009.
- FONSECA, I.M.S.P., SILVA, J. C. Bovine Cryptosporidiosis: epidemiological study in Portugal. **Proceedings XXI Congresso Mundial de Buiatria**, Punta del Este, Uruguai, 4-8 Dez, 2000.
- FONSECA, I.M.S.P. **Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: caracterização genética de isolados de *Cryptosporidium parvum* de origem bovina.** Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 2000.
- HUETINK, R. E. C. *et al.* Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 53-67, 2001.

KJELLÉN, ANNA. **Cryptosporidium parvum infection in dairy calves in South Vietnam**. p. 07-19, 2007.

MARTINS, R.L. **Eimeriose e Cryptosporidiose em vitelos de explorações leiteiras da ilha de S. Miguel (Açores)**. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Coimbra: Escola Universitária Vasco da Gama, 2013.

MARTINS, S., SOUSA, S., MADEIRA DE CARVALHO, L.M., BACELAR, J., CANNAS 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**, 15, Part 2, 152-156; 2007.

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

MENDONÇA, C., ALMEIDA, A., CASTRO, A., DE LURDES DELGADO, M., SOARES, S., DA COSTA, J.M., CANADA, N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. **Vet Parasitol**, 147, 47-50, 2007.

MAWLY, J. A.; GRINBERG, A.; VELATHANTHIRI, N.; FRENCH, N. Cross sectional study of prevalence, genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* cycling in New Zealand dairy farms. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2015.

NIINE, T.; DORBEEK-KOLIN, E.; LASSEN, B.; ORRO, T. *Cryptosporidium* outbreak in calves on a large dairy farm: Effect of treatment and the association with the inflammatory response and short-term weight gain. **Research in veterinary Science**, 2017.

NUNES, D. E. R. **Deteção molecular de *Cryptosporidium* spp em amostras de fezes de bezerros de corte no Estado de Mato Grosso**. 42 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade de Cuiabá. Cuiabá, 2015.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667- 1685, 2014.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Veterinary parasitology**, v. 155, n. 1, p. 15- 23, 2008.

SINGH, P.; SASTRY, V. R. B.; GARG, A. K.; SHARMA, A. K.; SINGH, G. R.; AGRAWAL, D. K. Effect of long term feeding of expeller pressed and solvent extracted karanj (*Pongamia pinnata*) seed cake on the performance of lambs. **Anim. Feed Sci. Technol.**, 126 (1/2), p. 157-167, 2006.

TROTZ-WILLIAMS, L.A., JARVIE, B.D., PEREGRINE, A.S., DUFFIELD, T.F., LESLIE, K.E. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. **Vet. Rec.**, 168(19), 509; 2011.

VARGAS JÚNIOR, S. F. **Diarréia em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul**. 4of. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós- Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

VARGAS JÚNIOR, S. F., PEREIRA C. M., ADRIEN M.L., FISS, L., MOLARINHO K.R., SOARES M.P., SCHILD A.L. & SALLIS E.S.V. Surto de Criptosporidiose em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 749-752, 2014.

ZOCCAL, R. **Conjuntura do Mercado Lácteo**. Centro de Inteligência do Leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/content/conjuntura-do-mercado-l%C3%A1cteo>. Acesso em: 13 mar. 2018.