

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
*Cryptosporidium* spp. EM CAPRINOS JOVENS DO  
MUNICÍPIO DE QUIXADÁ-CEARÁ**

**Roberta Lomonte Lemos de Brito  
Médica Veterinária**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
*Cryptosporidium* spp. EM CAPRINOS JOVENS DO  
MUNICÍPIO DE QUIXADÁ-CEARÁ**

**Roberta Lomonte Lemos de Brito**

**Orientador: Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani**

**Coorientador: Prof. Dr. Luiz da Silva Vieira**

**Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de  
Jaboticabal, como parte das exigências  
para a obtenção do título de Doutor em  
Medicina Veterinária, Área: Medicina  
Veterinária Preventiva**

**2014**

B862o Brito, Roberta Lomonte Lemos de  
Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp.  
em caprinos jovens do município de Quixadá-Ceará / Roberta  
Lomonte Lemos de Brito. -- Jaboticabal, 2014  
xvi, 88 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Katia Denise Saraiva Bresciani

Banca examinadora: Márcia Benedita de Oliveira Silva, Jancarlo  
Ferreira Gomes, Luis Antonio Mathias, Gilson Helio Toniollo

Bibliografia

1. Actina. 2. *Cryptosporidium meleagridis*. 3. *Cryptosporidium  
ubiquitum*. 4. *Cryptosporidium xiaoi*. 5. HSP 70. 6. Subunidade 18S  
rRNA. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 619:614.91:636.39

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM CAPRINOS JOVENS DO MUNICÍPIO DE QUIXADÃ-CEARÁ

**AUTORA:** ROBERTA LOMONTE LEMOS DE BRITO

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. LUIZ DA SILVA VIEIRA

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:



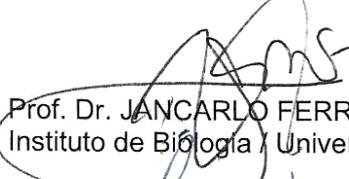
Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba



Profa. Dra. MARCIA BENEDITA DE OLIVEIRA SILVA

Departamento de Ciências Biológicas / UFTM / Uberaba/MG



Prof. Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES

Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas / Campinas/SP



Prof. Dr. LUIS ANTONIO MATHIAS

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 18 de junho de 2014.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROBERTA LOMONTE LEMOS DE BRITO – nascida na cidade de Vitória/Espirito Santo, em 21 de agosto de 1982, filha de Elizabeth Maria Lomonte e José Carlos Lemos de Brito (*in memoriam*). Ingressou na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em Ilhéus/BA, em 2002, iniciando a graduação em Medicina Veterinária no primeiro semestre desse ano. Durante o curso realizou atividades de ensino, pesquisa e extensão na área de Anatomia Animal, Parasitologia Veterinária e Ovinocaprinocultura, respectivamente, sendo bolsista de monitoria pela UESC, de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e de extensão pela PROEX-UESC, concluindo o curso em 2006. No ano seguinte, foi aprovada no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)/ Embrapa Caprinos e Ovinos, em Sobral/Ceará, atuando na linha de pesquisa “Produção e Sanidade de Pequenos Ruminantes”, foi bolsista da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), realizou um semestre de estágio em Docência na disciplina “Higiene Animal” com o prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro na UVA e teve dissertação defendida em março de 2009. Entre maio de 2009 e julho de 2010, foi bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), desempenhando atividades do projeto “Validação de ferramentas biotecnológicas para programas de controle das lentivirose de pequenos ruminantes” (Projeto N° 578527/2008 -1 do CNPq com Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Em agosto de 2010, ingressou como aluna de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP de Jaboticabal/SP. De maio de 2011 a setembro do mesmo ano foi bolsista de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e de novembro de 2011 a abril de 2014, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). No período de agosto a dezembro de 2011 realizou um semestre de estágio em Docência na disciplina “Epidemiologia Geral” com o prof. Dr. Luis Antonio Mathias na FCAV. Durante esse período executou atividades relacionadas ao projeto de pesquisa de doutorado na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/SP (FMVA/ UNESP) e na Embrapa Caprinos e Ovinos em Sobral/CE.

## **EPIGRAFE**

“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso, porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe só levo a certeza de que muito pouco sei ou nada sei...”

... É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir.

... Penso que cumprir a vida seja simplesmente compreender a marcha e ir tocando em frente. Como um velho boiadeiro levando a boiada, eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou, estrada eu sou...

... Todo mundo ama um dia, todo mundo chora, um dia a gente chega e no outro vai embora.

Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz”.

**Almir Sater e Renato Teixeira**

“...A oportunidade se antecipa para as pessoas que se esforçam em conhecer, e aprendem a gostar do que realmente precisam...”

**Padre Fábio de Melo**

## DEDICATÓRIA

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, ao Leandro Oliveira, meu querido esposo, pelo apoio e amor incondicional, e a minha família, que é minha vida, meu tudo...

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro durante toda a realização do estudo na qualidade de auxílio a projeto (PROCESSO N° 2010/52542-3), bolsa de doutorado e reserva técnica de bolsa (PROCESSO N° 2011/50049-0);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter concedido bolsa no início do programa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), Jaboticabal/SP, pela oportunidade em conquistar este sonho que é o título de “Doutor em Medicina Veterinária”, tenho muito orgulho de ser aluna desta instituição;

À Embrapa Caprinos e Ovinos, pela oportunidade do estágio durante a execução das análises de campo;

À Dra Katia Denise Saraiva Bresciani, pela paciência, amizade, respeito, atenção, orientação, disponibilidade, confiança e por acreditar no meu potencial;

Ao Dr Luiz da Silva Vieira, pela amizade, conselhos, confiança, orientação e disponibilidade, além do exemplo pessoal e profissional a ser seguido;

Ao Dr Marcelo Meireles, pela ajuda, atenção, ensinamentos e por disponibilizar sua equipe e estrutura física para a realização dessa pesquisa;

À Dra Márcia Benedita Oliveira, pela atenção, disponibilidade, treinamento e amizade, obrigada de coração por tudo;

Ao Dr Luis Antonio Mathias, pelo auxílio na estatística, orientação, apoio e pela oportunidade de realização do estágio de docência em Epidemiologia;

Aos doutores Alex Nakamura, Luiz Amaral, Estevam Hoppe, Jancarlo Gomes e Gilson Hélio, pelas valiosas contribuições e disponibilidade;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação da FCAV/UNESP, em especial Márcia, Gabriela, Antônio, Gibson e Diego, pela disponibilidade, atenção, respeito e carinho;

Aos professores vinculados ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, em especial Luis Antonio Mathias, Samir Issa,

Estevam Hoppe, Luiz Amaral, Adolorata e Glorinha e aos funcionários Marise, Márcia, Roseane, José, Assis, Lila e Diba pelo respeito, carinho e disponibilidade;

Aos professores, funcionários, alunos e estagiários da FMVA/UNESP, pela atenção, carinho, respeito e convívio;

Aos funcionários da Embrapa Caprinos e Ovinos em Sobral/CE, em especial Leandro Oliveira, Luiz Vieira, Felipe Machado, Expedito Barbosa, Galba, Pedro Herlando, Albuquerque, Helena, Rizaldo, Osmarilda, Raimundo Lobo, Jamile, Jomar, César, João Ricardo e Nóbrega, obrigada por terem contribuído para a realização deste estudo;

Aos funcionários, estagiários e terceirizados da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Ceará (EMATERCE) de Quixadá/CE, em especial a Dra Graça e o bolsista Wilami; sem o apoio e empenho de vocês este estudo não teria saído do papel, muito obrigada pela parceria e colaboração;

Aos 25 produtores rurais de Quixadá/CE visitados durante a realização deste estudo, muito obrigada por disponibilizarem os animais e seu tempo precioso, sem a colaboração de vocês não teria sido possível realizar esta pesquisa, a participação de todos foi imprescindível, aos senhores meu respeito e admiração;

A minha mãe Elizabeth Maria Lomonte, irmãos Romulo e Robson, sobrinhos Taylon, Gabriela, Christiana, Júlia, Eliza, Camila e Yasmim, cunhadas Karina, Angélica e Liliane. Obrigada pelo amor, amizade, orações, consolo, carinho e apoio, por serem tão presentes em minha vida apesar da distância física;

A família Inácio, por terem me acolhido em Araçatuba/SP, sou muito grata a Deus pela oportunidade de ter conhecido vocês, obrigada pelo convívio, amizade e carinho;

Às amigas Sandra Valéria Inácio, Dalilian Antoniete, Maximiana Mesquita, Maria Rosalba Moreira e Claudiane Moraes, pela dedicação, amizade, carinho, apoio e ajuda incondicional na execução desta pesquisa; sem vocês não teria conseguido; esta vitória também pertence a vocês;

Aos amigos de Jaboticabal/SP, Glaucenyra Pinheiro, Renata dos Santos, Mayara Rosolem, Alex Leite, André Buzzuti, Heloísa Godoy, Andrea Medina, Guilherme Sundfeld, Thalita, Daniele, Ana Fabrícia, Rafael Tonucci, Rafael, Thaís, Tatiane Aranha, Norival, Fransciele (Fan Fan), Adália, Gerardo, Neires, Joelma,

Mirelle, Fernanda, Lucas Shigaki, Luiz Silveira, Kelly, Carol Bellodi, Vanja, Marilena, Keyla, Ane, Helenara, Raquel, André Galvão e Paulo Henrique, pelo convívio, amizade, momentos de descontração e risadas;

Às amigas da “República do Pequi”, Renata Ferreira dos Santos e Glaucenyra Cecília Pinheiro, muito obrigada pelo acolhimento, apoio, amizade e conforto nos momentos que mais precisava, os amigos são os irmãos que escolhemos;

Aos amigos André Buzzuti e Heloísa Godoy, pela amizade, disponibilidade, apoio e carinho. Saibam que podem contar comigo sempre;

Às amigas Janete Madalena da Silva e Luana Antunes, pelo apoio, amizade, atenção por serem as irmãs que precisava em Araçatuba, vocês valem ouro;

Aos amigos de Araçatuba/SP, Sandra Valéria, Alex Nakamura, Jussara Yoshida, Silvana Gonzalez, Luana Antunes, Janete Madalena, Ana Carolina, Gisele, Tamires, Gleice, Dielson, Milena Viol, Monally, Tercília, Natália, Anaiza, Bruno, Silvana, Fernanda Müller, Priscila, Priscila Dalmagro e Marise;

Aos amigos de Sobral/CE, Dalilian, Maximiana, Rosalba, Humberto, Claudiane, Flávio, Valdete, Kevin, Brenner, Keyth, Wesley, Ismênia, Lauana, Evelyne, Fernando Henrique, Ana Carolina, Ana Márjory, Éden, Celyneude, Jorge, Germilda, Viviane Sousa, Vanderlan, Mikaele, Ana Clara, Zé Maria, Marco Bonfim, Erika, Sueli, Vinícius, Patrícia, Lúcia, Rosivaldo, Ângela Eloy, Diônes, Raimundo Lobo, Ana Maria, Hévila, Juliana, Tereza Duarte, Antônio César, Karina e Henrique, obrigada pela amizade, ajuda, carinho, convívio, momentos de descontração e alegria, é muito bom conviver com vocês;

A Deus, meu refúgio, consolo, fortaleza nas horas boas e ruins. Obrigada por tudo que sou, por me proteger nessas “andanças”, pela saúde, pelos milagres que faz em minha vida e pelo anjo chamado Leandro Silva Oliveira que enviou para Terra para cuidar de mim;

A você, Leandro, meu querido companheiro de todas as horas, agradeço imensamente pelo incentivo, respeito, apoio, força, paciência, amor incondicional e por compreender minha ausência. Obrigada por me fazer acreditar que os sonhos podem se tornar realidade. Essa conquista também é sua;

Agradeço imensamente a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente na minha formação pessoal e acadêmica, vocês foram fundamentais.

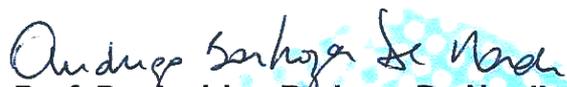
## SUMÁRIO

	PÁGINA
APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Histórico e espécies de <i>Cryptosporidium</i> que infectam caprinos.....	19
2.2. Agente etiológico e ciclo de vida.....	20
2.3. Transmissão para caprinos.....	22
2.4. Ocorrência da infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. em caprinos.....	23
2.5. Patogenia, sinais clínicos e patologia em caprinos.....	24
2.6. Diagnóstico.....	25
2.7. Prevenção da criptosporidiose para caprinos.....	27
2.8. Importância em Saúde Pública.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Local e amostra.....	30
4.2. Coletas das amostras de fezes e processamento.....	34
4.3. “Nested”-PCR com amplificação dos genes 18S rRNA, actina e HSP 70 de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	35
4.4. Caracterização das propriedades.....	38
4.5. Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	40
5.2. Identificação das espécies de <i>Cryptosporidium</i> .....	45
5.3. Avaliação das propriedades por meio de questionário.....	49
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES.....	54
8. REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICES.....	72
Apêndice A.....	73
Apêndice B.....	74
Apêndice C.....	83
Apêndice D.....	84

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 014465/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Fatores de risco para ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em cabritos**", sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Katia Denise Saraiva Bresciani está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de julho de 2012.

Jaboticabal, 03 de julho de 2012.



**Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi**  
Coordenador - CEUA

## OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM CAPRINOS JOVENS DO MUNICÍPIO DE QUIXADÁ-CEARÁ

**RESUMO** – O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência da infecção e realizar a caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em caprinos jovens do município de Quixadá, Ceará, Brasil. Participaram do estudo um total de 400 animais, com idade entre três e 360 dias, com e sem padrão racial definido, nos quais 154 eram machos e 246 fêmeas, procedentes de 25 estabelecimentos rurais distribuídos em três circuitos. Amostras de fezes foram obtidas diretamente da ampola retal dos cabritos e cadastradas de acordo com o aspecto e a coloração. Uma quantidade de 200 mg de cada amostra foi distribuída em microtubos de 2 mL e congeladas “in natura” a -20 °C, até o momento das extrações de DNA genômico do parasito com auxílio de kit comercial. Todas as amostras foram submetidas a “Nested”-PCR para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S RNA ribossômico. As positivas nesta amplificação foram testadas na “Nested”-PCR com os genes actina e HSP 70. As amostras que tiveram amplificação nesses três genes foram submetidas a “Nested”-PCR em triplicata e posterior sequenciamento nas direções “sense” e “anti-sense”. A ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em cabritos de Quixadá foi de 7,50% (30/400) e 64,00% (16/25) das propriedades tinham cabritos positivos. O distrito Tapuiará foi o que apresentou maior número de animais positivos, e a frequência no período seco e chuvoso foi de 9,55% (19/199) e 5,47% (11/201), respectivamente ( $P = 0,1218$ ). Das 30 amostras de fezes positivas, 50,00% (15/30) tinham aspecto normal e 70,00% (21/30) coloração normal, sugerindo que cabritos assintomáticos eliminam oocistos no ambiente. Não foi observada positividade para *Cryptosporidium* spp. em animais com 301 a 360 dias. Por meio do sequenciamento foi possível identificar que as espécies do coccídio detectadas nas fezes dos cabritos foram *Cryptosporidium xiaoi*, *Cryptosporidium ubiquitum* e *Cryptosporidium meleagridis*. Diferentes espécies do protozoário estão presentes em propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, Brasil. Os coccídios *C. ubiquitum* e *C. meleagridis* já foram descritos infectando humanos. O manejo sanitário, nutricional e reprodutivo adotado pelos caprinocultores e as características das propriedades não representaram fator de risco para os cabritos se infectarem pelo protozoário.

**Palavras-chave:** actina, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium ubiquitum*, *Cryptosporidium xiaoi*, HSP 70, subunidade 18S rRNA

## OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cryptosporidium* spp. IN GOATS KIDS IN THE TOWN OF QUIXADÁ – STATE OF CEARÁ

**ABSTRACT** – The present study aimed to evaluate the occurrence of infection and perform molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in goats kids from the town of Quixadá – state of Ceará – Brazil. A total of 400 animals, 154 males and 246 females, with aged between three and 360 days, with and without defined breed, from 25 farms distributed in three circuits, participated in this study. Stool samples were obtained directly from the goats rectum and registered in accordance to their appearance and coloring. An amount of 200 mg of each sample, were distributed in micro tubes of 2 mL and frozen “in nature” at -20 °C until the moment of extraction of the parasite genomic DNA using a commercial kit. All samples were submitted to Nested-PCR to amplify fragments of 18S subunit of ribosomal RNA. The positives samples in this amplification were tested in Nested-PCR with actin and HSP 70 genes. Samples that were amplified in these three genes were subjected to Nested-PCR triplicate and subjected to sequencing in sense and anti-sense directions. The occurrence of the infection by *Cryptosporidium* in goats kids of the town of Quixadá was 7.50% (30/400) and 64.00% (16/25) of the farms with positive goats. The Tapuiará district showed the highest number of positive animals and the frequency in dry and rainy period was 9.55% (19/199) and 5.47% (11/201), respectively (P = 0.1218). Considering 30 samples of positive stools, 50.00% (15/30) had normal appearance and 70.00% (21/30) normal coloring, suggesting that asymptomatic goats can eliminate oocysts in the environment. It was not observed positivity for *Cryptosporidium* spp. in animals aged between 301 and 360 days. Through sequencing, it was possible to identify that the species of coccidian found in the feces of the goats are *Cryptosporidium xiaoi*, *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium meleagridis*. Different species of protozoa are present in rural farms of Quixadá – state of Ceará – Brazil. The *C. meleagridis* and *C. ubiquitum* protozoa have been described infecting humans. Considering the health, nutritional and reproductive management adopted by goat farmers, as well as the characteristics of the property, any of these places presented risk factors for the goats kids infection by the protozoan.

**Keywords:** actin, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium ubiquitum*, *Cryptosporidium xiaoi*, HSP 70, subunit 18S rRNA

## LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
18S rRNA	Subunidade 18S RNA ribossômico
°C	Grau Celsius
A1	Aspecto de “grude”
A2	Aspecto de cúbicas
A3	Aspecto de diarreia
A4	Aspecto de amolecida
A5	Aspecto de ressecada
ACT	Gene da actina
BSA	Albumina sérica bovina
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CPRD	Com padrão racial definido
CREBIO	Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica
EMATERCE	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Ceará
F1	“Primer” “forward” 1
F2	“Primer” “forward” 2
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FE	Faixa etária
FMVA	Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
HSP 70	Gene da proteína “heat-shock” de 70kDa
IC	intervalo de confiança
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
nPCR	“Nested”-PCR
OR	odds ratio
P1	Propriedade 1
P2	Propriedade 2
P3	Propriedade 3
P4	Propriedade 4
P5	Propriedade 5
P6	Propriedade 6
P7	Propriedade 7
P8	Propriedade 8
P9	Propriedade 9
P10	Propriedade 10
P11	Propriedade 11
P12	Propriedade 12
P13	Propriedade 13
P14	Propriedade 14
P15	Propriedade 15
P16	Propriedade 16
P17	Propriedade 17

P18	Propriedade 18
P19	Propriedade 19
P20	Propriedade 20
P21	Propriedade 21
P22	Propriedade 22
P23	Propriedade 23
P24	Propriedade 24
P25	Propriedade 25
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PI	Pós infecção
R1	“Primer” “reverse” 1
R2	“Primer” “reverse” 2
SPRD	Sem padrão racial definido
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UNESP	Universidade Estadual Paulista-“Júlio de Mesquita Filho”
UV	Ultravioleta
V1	Coloração normal
V2	Coloração verde
V3	Coloração verde-amarelada
V4	Coloração amarelada
V5	Coloração marrom com muco laranja
$\chi^2$	Qui-quadrado

## LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1. Ocorrência da infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. em cabritos de 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, pela “Nested”-PCR, no período de novembro de 2012 a maio de 2013.....	41
Tabela 2. Cabritos de três a 360 dias de idade, positivos (n=30) para <i>Cryptosporidium</i> spp., provenientes de 25 estabelecimentos rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas em novembro de 2012 a maio de 2013, de acordo com as variáveis períodos do ano, sexo, raça, idade, aspecto e coloração das fezes.....	43
Tabela 3. Percentual de amostras de fezes de 400 cabritos, provenientes de 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas no período de novembro de 2012 a maio de 2013, positivas e negativas para <i>Cryptosporidium</i> spp. por meio da “Nested”-PCR, em relação ao aspecto.....	44
Tabela 4. Percentual de amostras de fezes de 400 cabritos, provenientes de 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas no período de novembro de 2012 a maio de 2013, positivas e negativas para <i>Cryptosporidium</i> spp. por meio da “Nested”-PCR, em relação à coloração.....	45
Tabela 5. Análise de regressão logística de acordo com período do ano (seco e chuvoso), idade e coloração das fezes dos cabritos provenientes de 25 estabelecimentos rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas em novembro de 2012 a maio de 2013.....	45
Tabela 6. Identificação de espécies de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras fecais de caprinos provenientes de 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas no período de novembro de 2012 a maio de 2013, por meio de sequenciamento dos genes 18S rRNA, actina e HSP 70 e o percentual de identidade com base nas sequências do parasito depositadas no GenBank®.....	48
Apêndice D	
Tabela D1. Caracterização de 25 estabelecimentos rurais do município de Quixadá, Ceará, com criação de cabritos de três a 360 dias de idade, com e sem padrão racial definido, machos e fêmeas, a partir de questionário epidemiológico aplicado aos caprinocultores durante coletas em novembro e dezembro de 2012.....	84

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA	
Figura 1.	Localização do município de Quixadá, no Ceará, e dos três circuitos (C1, C2 e C3) em que foram realizadas coletas para obter a ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp., no período de novembro de 2012 a maio de 2013.....	33
Figura 2.	Ilustração da estação seca (a) durante período de novembro e dezembro de 2012, com precipitação pluviométrica média de 0,0 mm e chuvosa (b) em maio de 2013, com média de 150,7 mm, em uma propriedade rural do município de Quixadá, Ceará.....	33
Figura 3.	Distribuição espacial do número de cabritos positivos para <i>Cryptosporidium</i> spp. durante coletas em novembro de 2012 a maio de 2013, em 25 propriedades rurais do município de Quixadá, no Ceará e seus respectivos circuitos C1, C2 e C3. Mapas gerados no programa MapInfo® Professional versão 7.5.....	42
Figura 4.	Distribuição espacial das 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará e as regiões com (áreas em amarelo e vermelho) e sem (áreas em azul escuro) cabritos positivos para <i>Cryptosporidium</i> spp., durante coletas em novembro de 2012 a maio de 2013. Mapas gerados no programa MapInfo® Professional versão 7.5.....	42
Figura 5.	Cabritos de Quixadá, Ceará, positivos e negativos para <i>Cryptosporidium</i> spp. na “Nested”-PCR em diferentes faixas etárias.....	44
Figura 6.	Eletoforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, amostras 1X a 3X e 6X a 16X, provenientes de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, com amplificação de fragmentos do gene 18S rRNA de <i>Cryptosporidium</i> spp. com aproximadamente 840 pares de base (pb) e amostras 4X e 5X negativas, ou seja, sem amplificação (M = marcador de peso molecular 100pb, C+ = controle positivo <i>Cryptosporidium serpentis</i> , 1X a 16X amostras de campo e C- = controle negativo).....	46
Figura 7.	Eletoforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, amostras 1A, 6A, 9A e 16A sem amplificação do gene actina de <i>Cryptosporidium</i> spp., amostras 2A a 5A, 7A, 8A, 10A a 15A, provenientes de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, com amplificação de fragmentos do gene actina de <i>Cryptosporidium</i> spp. com aproximadamente 1066 pares de base (M = marcador de peso molecular 100pb, C+ = controle positivo <i>Cryptosporidium serpentis</i> , 1A a 16A	

	amostras de campo e C- = controle negativo).....	46
Figura 8.	Eletróforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, amostras 1H a 14H e 16H, provenientes de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, com amplificação de fragmentos do gene HSP 70 de <i>Cryptosporidium</i> spp. com aproximadamente 325 pares de base (pb) e amostra 15H sem amplificação (M = marcador de peso molecular 100pb, C+ = controle positivo <i>Cryptosporidium serpentis</i> , 1H a 16H amostras de campo e C- = controle negativo).....	47
	Apêndice C	
Figura C1.	Cadastro das amostras de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, durante período de novembro de 2012 a maio de 2013, em relação ao aspecto: “grude” (A1), cíbalas (A2), diarreia (A3), amolecida (A4) e ressecada (A5).....	83
Figura C2.	Cadastro das amostras de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, durante período de novembro de 2012 a maio de 2013, em relação à coloração: normal (V1), verde (V2), verde-amarelada (V3), amarelada (V4) e marrom com muco laranja (V5).....	83

## 1. INTRODUÇÃO

A exploração de caprinos vem se firmando como importante alternativa pecuária, gerando emprego e renda no Brasil (RIBEIRO; RIBEIRO, 2001; CAVALCANTE et al., 2005), principalmente na região Nordeste, onde estão concentrados 91,04% do rebanho caprino nacional (IBGE, 2011).

Nessa região, os animais estão distribuídos fundamentalmente em sistema de produção extensivo (CAVALCANTE et al., 2005), com predomínio de animais sem padrão racial definido (SPRD) que, em períodos críticos da seca, servem como fonte de proteína animal de custo reduzido (SILVA et al., 2005).

Esses sistemas de criação, na maioria das vezes, possuem pouco investimento financeiro, não adotam escrituração zootécnica (RIET-CORREA et al., 2013) e apresentam inúmeras falhas nos manejos reprodutivo, nutricional e sanitário, com diagnóstico tardio de agentes infecciosos, que não são controlados de maneira apropriada (PINHEIRO et al., 2000; 2003; 2006).

Dentre esses agentes, destacam-se os protozoários do gênero *Cryptosporidium*, que possuem distribuição cosmopolita e ocorrência da infecção variando de 0,00 a 67,70% (CASTRO-HERMIDA et al., 2005b; VENTURINI et al., 2006; DOMINGO et al., 2012; PAM et al., 2013). Esses parasitos acometem caprinos de qualquer faixa etária, padrão racial e sexo, sendo mais comumente relatado em cabritos com menos de cinco meses de vida (NOORDEEN et al., 2001).

Durante o desenvolvimento do ciclo de vida desses protozoários, há destruição e atrofia das vilosidades intestinais, que causa uma redução da absorção dos nutrientes, com consequente diarreia (SOLTANE et al., 2007; PARAUD; CHARTIER, 2012), que pode prejudicar o desempenho produtivo dos animais (AYANA; TILAHUN; WOSSENE, 2009) e gerar perdas econômicas significativas para os caprinocultores (VIEIRA et al., 1997; DE GRAAF et al., 1999).

Estudos sobre a presença do parasito em rebanhos caprinos no Brasil são escassos, principalmente na região Nordeste, onde as condições adversas do ambiente durante a estação seca podem prejudicar a sobrevivência do parasito no meio externo, revelando a necessidade de pesquisas que deem enfoque ao assunto.

Além disso, a identificação das espécies e dos genótipos de *Cryptosporidium* que infectam animais tem importância fundamental para a Saúde Pública (FÉRES et al., 2009), visto que algumas espécies apresentam potencial zoonótico. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência da infecção e realizar a caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em caprinos jovens do município de Quixadá, Ceará, Brasil.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A criptosporidiose tem emergido como causa significativa de perdas econômicas diretas e indiretas na caprinocultura nacional e internacional (OLSON et al., 1997; VIEIRA et al., 1997; VIEIRA, 1998; ZORANA; SOFIJA; SADRIŽAJ, 2006) por comprometer o desenvolvimento e a produção de caprinos, devido a redução no ganho de peso e na produção leiteira dos animais acometidos, especialmente quando mantidos em sistema de criação com falhas nos manejos sanitário e nutricional (FOREYT, 1990; VIEIRA et al., 1997; SOLTANE et al., 2007).

A ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos é menos relatada em sistemas extensivos de criação (TEMBUE et al., 2006) e mais em confinamento (BOMFIM et al., 2005; COSENDEY; FIUZA; OLIVEIRA, 2008; GEURDEN et al., 2008) e os principais fatores de risco relatados são as condições higiênico-sanitárias, como por exemplo, as fontes de água contaminadas e acúmulo de fezes nas instalações (CAUSAPÉ et al., 2002; BOMFIM et al., 2005).

As crias são mais susceptíveis ao parasitismo por *Cryptosporidium* spp. que os adultos, sendo observado até 100,00% de morbidade e 50,00% de mortalidade em diferentes rebanhos caprinos (ZORANA; SOFIJA; SADRIŽAJ, 2006; PAVLOVIC et al., 2010; DOMINGO et al., 2012; RIEUX et al., 2013; SANTÍN, 2013). O local de desenvolvimento do coccídio no intestino desses animais é a principal diferença encontrada em infecções experimentais e naturais (KOUDELA; JIRÍ, 1997).

Na infecção experimental, formas endógenas do parasito foram detectadas na borda das células do intestino delgado, principalmente associadas às vilosidades

dos enterócitos e raramente às criptas (KOUDELA; JIRÍ, 1997). Na natural, formas endógenas podem ser visualizadas no terço final do intestino delgado, ceco e cólon, sendo também observado aumento dos linfonodos mesentéricos (VIEIRA et al., 1997; VIEIRA, 1998).

Tanto na infecção natural como na experimental há desenvolvimento da imunidade humoral específica com produção de anticorpos que apresentam ação duradoura, que são capazes de bloquear os esporozoítos na borda das vilosidades dos enterócitos, proporcionando resistência contra a infecção (FAYER; PERRYMAN; RIGGS, 1989; FAYER; GUIDRY; BLAGBURN, 1990; GREENBERG; CELLO, 1996; MOSS et al., 2004; JOHNSON et al., 2004).

### **2.1. Histórico e espécies de *Cryptosporidium* que infectam caprinos**

A primeira descrição do gênero *Cryptosporidium*, que significa pequenos esporos ocultos, do grego “kryptos” = oculto (BOWMAN et al., 2006), foi em 1907, em estudo realizado por Tyzzer com camundongos de laboratório, sendo o parasito denominado de *Cryptosporidium muris* (TYZZER, 1910). Em 1912, o mesmo autor identificou *Cryptosporidium parvum*, que apresentava dimensões diminutas quando comparada à primeira.

Desde então, ocorreram relatos de diferentes espécies do parasito em diversas regiões do mundo infectando uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, inclusive ruminantes e seres humanos (BARKER; CARBONELL, 1974; FENG et al., 2007; KARANIS et al., 2007; MEIRELES et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008; BRESCIANI et al., 2008; BORGES et al., 2009; FAYER; SANTÍN, 2009; NAKAMURA et al., 2009; FAYER; SANTÍN; MACARISIN, 2010; LANGHOUT; REED; FOX, 2010; SEVÁ et al., 2010; CARDONA et al., 2011; FIUZA et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2011; AYINMODE; FAGBEMI; XIAO, 2012; INÁCIO et al., 2012; SILVERLÅS et al., 2012; PAZ E SILVA; LOPES; ARAÚJO-JUNIO, 2013; LI et al., 2014; PAZ E SILVA et al., 2014).

O primeiro relato da infecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos foi feito por Mason, Hartley e Tilt (1981) na Austrália e no Brasil, a presença do parasito nesses hospedeiros foi registrada em 1997 por Vieira e colaboradores.

Na literatura estão relatadas 30 espécies do gênero *Cryptosporidium* (ŠLAPETA, 2013), destas as descritas isoladas em fezes de caprinos foram *Cryptosporidium parvum* (CASTRO-HERMIDA et al., 2005a; CASTRO-HERMIDA; GONZÁLES-WARLETA; MEZO, 2007; GOMA et al., 2007; GEURDEN et al., 2008; QUÍLEZ et al., 2008; DOMINGO et al., 2012; RIEUX et al., 2013; KOINARI; LYMBERY; RYAN, 2014), *Cryptosporidium xiaoi* (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007; DÍAZ et al., 2010; RIEUX et al., 2013; KOINARI; LYMBERY; RYAN, 2014; WANG et al., 2014), *Cryptosporidium ubiquitum* (FAYER; SANTÍN; MACARISIN, 2010; LI et al., 2014; PARAUD et al., 2014; WANG et al., 2014), *Cryptosporidium hominis* (GILES et al., 2009; KOINARI; LYMBERY; RYAN, 2014) e *Cryptosporidium andersoni* (WANG et al., 2014).

Dentre as espécies do coccídio que acometem caprinos, *C. parvum* tem sido relatado como o principal agente causador de diarreia neonatal em cabritos (ROBERTSON, 2009; XIAO, 2010; PARAUD; CHARTIER, 2012), apresentando maiores complicações quando presente em infecções simultâneas com rotavírus, *Eimeria* spp. (SANFORD et al., 1991) e *Escherichia coli* (COELHO, 2011).

## 2.2. Agente etiológico e ciclo de vida

Coccídios do gênero *Cryptosporidium* pertencem ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina e Família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1980; PLUTZER; KARANIS, 2009), apresentam localização intracelular e extracitoplasmática ou epicelular (MARCIAL; MADARA, 1986) e parasitam o ápice das vilosidades das células intestinais de seus hospedeiros vertebrados, onde completam seu ciclo de vida monoxeno (FORTES, 2004; XIAO et al., 2004).

O ciclo de vida endógeno se inicia com a ingestão de oocistos esporulados pelo hospedeiro, que se rompem quando chegam ao intestino, liberando os esporozoítos, que penetram nas vilosidades dos enterócitos, levando à formação do vacúolo parasitóforo, que possui três membranas que pertencem ao coccídio e duas ao hospedeiro (MARCIAL; MADARA, 1986; FORTES, 2004).

O vacúolo parasitóforo proporciona ao parasito acesso absoluto às reservas nutricionais da célula hospedeira. Além de protegê-lo do sistema imune celular e da luz intestinal, que apresenta condições adversas para sua sobrevivência (MARCIAL; MADARA, 1986; THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008). Após a formação desse vacúolo, inicia-se a reprodução assexuada ou merogonia, com o desenvolvimento de duas gerações de esquizontes (FORTES, 2004; XIAO et al., 2004).

Ocorrem três divisões nucleares, nas quais são liberados oito e quatro merozoítos, que irão gerar os merontes do tipo I e II, respectivamente. Os quatro merozoítos da segunda merogonia darão início à reprodução sexuada ou esporogônica, com formação de micro e macrogametócitos, que originam os micro e macrogametas, respectivamente (TZIPORI; GRIFFITHS, 1998).

Os macrogametas, quando fecundados pelos microgametas, formam o zigoto ou oocisto, que podem ser de parede única e delgada ou de parede dupla e espessa e a esporulação ocorre dentro do hospedeiro. Os oocistos de parede fina, cerca de 20,00% dos oocistos gerados, são responsáveis pela autoinfecção, que pode resultar em enfermidade grave capaz de se estender por longo período de tempo (FORTES, 2004; PUGH, 2004; THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008).

Aproximadamente 80,00% dos oocistos gerados, podem ser de parede dupla e espessa, medem de quatro a seis micrometros e são eliminados esporulados nas fezes. Possuem quatro esporozoítos sem esporocisto e, quando chegam ao ambiente, infectam caprinos e outros hospedeiros vertebrados (MASON; HARTLEY; TILT, 1981; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; HUBER; BOMFIM; GOMES, 2004; THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008; GILES et al., 2009).

Em condições experimentais, cabritos com diarreia começam a evacuar oocistos no ambiente a partir do quarto dia pós-infecção (PI), com redução na eliminação aos sete dias PI, permanecendo até o 12º dia (KOUDELA; JIRÍ, 1997).

Em infecções naturais, essa persistência pode chegar até o 21º dia. Adultos também podem excretar oocistos, principalmente no período periparto (CASTRO-HERMIDA et al., 2005a; PARAUD; CHARTIER, 2012).

Noordeen et al. (2002) relatam que os oocistos quando conservados em dicromato de potássio a 2,50%, em temperatura de 4 °C, após seis meses de armazenamento, podem causar infecção quando inoculados experimentalmente em cabritos e camundongos de laboratório.

Os oocistos apresentam elevada resistência a vários agentes químicos, como a concentração de cloro utilizada para tratamento de água (XIAO et al., 2004), e às condições ambientais (BARTA; THOMPSON, 2006; KING et al., 2008), podendo sobreviver por longos períodos fora do hospedeiro em condições de temperatura e umidade adequados (PAVLOVIC et al., 2010).

Essa resistência advém de uma complexa barreira de proteção, constituída de dupla camada de lipoproteínas e carboidratos, que atribuem rigidez à sua parede dupla e espessa (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008; PLUTZER, KARANIS, 2009), o que é de grande importância para a dispersão, a sobrevivência e a infectividade do parasito (SILVA, 2004; 2009).

O tempo de sobrevivência dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. pode ser reduzido por congelamento, dessecação, exposição à luz ultravioleta e variações de temperatura (SMITH; NICHOLS, 2010). Os oocistos também são sensíveis ao ozônio e a temperaturas de 55°C por 30 segundos ou de 70°C por cinco segundos (FUJINO et al., 2002).

### **2.3. Transmissão para caprinos**

A principal porta de entrada para a infecção de caprinos é a oral, por meio da ingestão dos oocistos esporulados em água ou alimentos contaminados (PARAUD; CHARTIER, 2012).

Desta forma, atuam como meio de transmissão os alimentos, água, solo e ambientes com resíduos fecais de animais e/ou de humanos que contenham formas

evolutivas infectantes (SLIFKO; SMITH; ROSE, 2000; CAREY; LEE; TREVORS, 2004; BOMFIM et al., 2005; KARANIS et al., 2007; BOUZID; STEVERDING; TYLER, 2008; DIAS et al., 2008; XIAO; FAYER, 2008; SARI et al., 2009; CUMMINS; KENNEDY; CORMICAN, 2010; SMITH; NICHOLS, 2010).

Um aumento na eliminação de oocistos durante o parto e longos períodos de excreção por caprinos assintomáticos podem aumentar a probabilidade de que esses animais atuem como fontes de infecção para outros hospedeiros susceptíveis (NOORDEEN et al., 2001; SANTÍN, 2013).

Animais não parasitados mantidos em baias separadas de cabritos inoculados experimentalmente, mas em instalações próximas, podem ser acometidos naturalmente em até oito dias após a infecção experimental, demonstrando a elevada infectividade do parasito e que mesmo em boas condições de higiene há rápida transmissão, visto que o parasito é muito leve e pode ser disperso pelo ar facilmente (KOUDELA; JIRÍ, 1997).

#### **2.4. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos**

Estudos em diferentes regiões do planeta revelam que a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos varia entre abaixo de 5,00% e acima de 35,00%, com média de 15,00% (ROBERTSON, 2009). Em pesquisas na Polônia e Etiópia não foram encontrados cabritos infectados com esse protozoário (MAJEWSKA et al., 2000; AYANA; TILAHUN; WOSSENE, 2009).

Na França a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. no rebanhos rebanhos estudados variou de 0,00 a 20,00%, com frequência individual de 2,50% (CASTRO-HERMIDA et al., 2005b; DELAFOSSE et al., 2006).

Em pesquisas realizadas na China, a ocorrência foi de 3,48% (WANG et al., 2014). Na Papua-Nova Guiné, de 4,40% (KOINARI; LYMBERY; RYAN, 2014). Na Zâmbia, de 4,80% (GOMA et al., 2007). No Brasil, de 4,80% (BOMFIM et al., 2005) e 16,66% (COELHO, 2011).

Na Espanha foi de 9,00% (CASTRO-HERMIDA; GONZÁLES-WARLETA; MEZO, 2007). Na Bélgica, de 9,50% (GEURDEN et al., 2008). Nas Filipinas, de 18,00% (DOMINGO et al., 2012). Na Nigéria, de 24,00% (PAM et al., 2013). No Sri Lanka, de 28,50% (NOORDEEN et al., 2000). Na Sérvia, de 31,80% (ZORANA; SOFIJA; SADRIŽAJ, 2006) e na Argentina, de 67,70% (VENTURINI et al., 2006).

## 2.5. Patogenia, sinais clínicos e patologia em caprinos

A intensidade da infecção por *Cryptosporidium* spp. depende principalmente do estado imunológico e da idade do hospedeiro vertebrado (VIEIRA et al., 1997; DE GRAFF et al., 1999; SILVA et al., 1999; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; NOORDEEN et al., 2002; PAVLOVIC et al., 2010).

O período pré-patente e o patente em cabritos inoculados experimentalmente com  $6 \times 10^6$  oocistos são de quatro e oito dias, respectivamente (KOUDELA; JIRÍ, 1997), e com  $1 \times 10^6$  oocistos, são de cinco e 13 dias, respectivamente. Em alguns casos, após momentos em que o diagnóstico parasitológico em fezes apresenta resultado negativo, podem reaparecer oocistos nas fezes (SILVA et al., 1999).

A manifestação clínica pode variar de assintomática a grave, que ocasionalmente culmina em óbito. O sinal mais comum é a diarreia, que coincide com o período de maior eliminação dos oocistos (NOORDEEN et al., 2002). Os adultos acometidos normalmente não apresentam sinais clínicos e podem excretar essas formas infectivas, servindo como fonte de infecção para cabritos (NOORDEEN et al., 2000; 2002; PARAUD; CHARTIER, 2012; SANTÍN, 2013).

Em crias com idade inferior a 30 dias, o quadro mais comumente observado é diarreia aguda (FOREYT, 1990; VIEIRA et al., 1997; DE GRAAF et al., 1999; PUGH, 2004; ZORANA; SOFIJA; SADRIŽAJ, 2006), que ocorre durante cinco a 20 dias (PARAUD; CHARTIER, 2012). A diarreia provocada pelo parasito tem aspecto pastoso, coloração amarelada a marrom-amarelada (MASON; HARTLEY; TILT, 1981; SANTÍN, 2013).

No decorrer da infecção, a diarreia pode se tornar aquosa, sendo eliminada em forma de jatos (VIEIRA et al., 1997; VIEIRA, 1998). Também podem ser observadas desidratação, prostração, anorexia, perda de peso e apatia (SANTÍN, 2013), a princípio sem perda de apetite (KOUDELA; JIRÍ, 1997; VIEIRA et al., 1997; VIEIRA, 1998).

Em infecção experimental, pode ser notada redução no apetite e depressão em 72h PI. Inicialmente as fezes são aquosas, apresentam muco e a coloração variando entre marrom e amarela, com uma duração média de diarreia de 4,2 dias (KOUDELA; JIRÍ, 1997). Nesse período pode haver aumento na temperatura corporal e desidratação. No final da infecção, apresentam aspecto pastoso e amarronzado (SILVA et al., 1999).

Em exame histopatológico do intestino de cabritos aos 12 dias PI experimental, foi observada infiltração inflamatória com numerosas células mononucleares (SILVA et al., 1999) e neutrófilos no epitélio das vilosidades e lâmina própria do jejuno e do íleo. Na microscopia eletrônica pode ser observada hiperplasia da cripta, atrofia e destruição das vilosidades, além de fusão dessas estruturas (KOUDELA; JIRÍ, 1997; NOORDEEN et al., 2002).

## 2.6. Diagnóstico

Muitas ferramentas têm sido empregadas na identificação de *Cryptosporidium* spp., e as mais comumente utilizadas são a microscopia com contraste de fase utilizando métodos de concentração de protozoários em fezes como “Sheather” e água-tween-éter (GARCIA et al., 1983; FEITOSA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2011), de contraste com verde malaquita (ELLIOT; MORGAN; THOMPSON, 1999) e de coloração como a safranina azul de metileno (BAXBY; BLUNDELL; HART, 1984) ou a fucsina-carbólica no “Ziehl-Neelsen” modificado (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981) e no “Kinyoun” (ZORANA; SOFIJA; SADRIŽAJ, 2006).

Essas técnicas possuem a vantagem de serem mais baratas e de fácil execução que os imunológicos e os moleculares (MAGI et al., 2006; WEISEL et al.,

2006), porém apresentam como desvantagem a baixa sensibilidade, com possibilidade de resultados falso-negativos (CASEMORE, 1991), visto que os oocistos do parasito apresentam dimensões diminutas, sendo dificilmente observados nos esfregaços fecais após coloração (FAYER, 2010).

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* também podem ser diagnosticados por reação de imunofluorescência direta (ZIMMERMAN; NEEDHAM, 1995; BIALEK et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2011) e testes comerciais imunoenzimáticos com anticorpos que detectam o antígeno nas fezes (JOHNSTON et al., 2003).

Esses testes apresentam como vantagens melhores resultados de especificidade e sensibilidade quando comparados àquelas ferramentas de identificação que utilizam a microscopia (ARROWOOD; STERLING, 1989; ZIMMERMAN; NEEDHAM, 1995; JOHNSTON et al. 2003) e como desvantagem o alto custo para aquisição (BIALEK et al., 2002).

Com a biologia molecular para caracterização de *Cryptosporidium* é possível identificar espécies, genótipos e subtipos do coccídio (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000). Dentre esses, destaca-se a reação em cadeia de polimerase “Nested” (“Nested”-PCR), na qual são utilizados dois pares de “primers”, ocorrendo primeiramente uma amplificação do material genético alvo e posteriormente uma reamplificação, elevando a sensibilidade do teste (XIAO et al., 1999; 2000).

Para identificação das espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* são mais utilizados “loci” conservados da subunidade 18S RNA ribossômico (rRNA) e da proteína “heat-shock” de 70kDa (HSP 70). Também são utilizados “loci” da proteína de parede de oocisto (COWP),  $\beta$ -tubulina e da actina (XIAO et al., 1999; SULAIMAN; LAL; XIAO, 2002; CARVALHO, 2008). O que permite uma compreensão mais detalhada sobre a variedade genética do parasito e o entendimento das diversas apresentações clínicas da enfermidade (SANTÍN, 2013).

## 2.7. Prevenção da criptosporidiose para caprinos

Cabritos sem tratamento adequado podem vir a óbito após uma semana do aparecimento dos sinais clínicos ocasionados pela criptosporidiose (VIEIRA et al., 1997), e como não existem fármacos considerados efetivos contra o protozoário (NOORDEEN et al., 2000), medidas higiênicas e sanitárias devem ser adotadas com o intuito de impedir a transmissão do parasito (TEMBUE et al., 2006; FÉRES et al., 2009).

Desta forma, as fezes e as camas devem ser recolhidas das instalações com frequência e armazenadas em locais a que os caprinos não tenham acesso (DE GRAFF et al., 1999), como esterqueiras e biodigestores.

Caprinos infectados podem excretar níveis moderados a elevados de oocistos. Sendo assim, propriedades próximas a rios, lagos e outras fontes de água superficiais devem evitar que o material fecal proveniente desses animais contamine esses recursos hídricos, pois estes podem transportar oocistos e servir como meio de transmissão para seres humanos e outros animais (NOORDEEN et al., 2012).

Como métodos de prevenção deve-se isolar os animais que apresentam diarreia, promover o manejo alimentar adequado e a limpeza de mamadeiras e comedouros. Também é necessária a separação de animais por faixa etária e realizar limpeza de instalações com o uso de calor úmido e desinfetantes químicos como amônia quaternária, hipoclorito de sódio a 2,5% e evitar superlotação (DE GRAFF et al., 1999; CAUSAPÉ et al., 2002; BOMFIM et al., 2005; ZORANA; SOFIJA; SADRIŽAJ, 2006; PAVLOVIC et al., 2010).

O fornecimento de quantidades adequadas de colostro aos cabritos após o nascimento pode ajudar a minimizar os índices de morbidade e mortalidade em rebanhos com criptosporidiose, visto que cabritos nos primeiros meses de vida são totalmente dependentes das imunoglobulinas adquiridas pelo colostro (DE GRAFF et al., 1999; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; PAVLOVIC et al., 2010; NOORDEEN et al., 2012).

Os veterinários desempenham papel importante ao aplicar as estratégias necessárias para prevenir infecções futuras por *Cryptosporidium*, evitando assim

grandes perdas e a transmissão do parasito para seres humanos (ZORANA; SOFIJA; SADRIŽAJ, 2006).

Noordeen et al. (2012) acreditam que, no futuro, o controle da criptosporidiose poderá ser condicionado a uma associação entre imunoterapia e terapia com fármacos seletivos que tenham atividade parcial contra o parasito.

## 2.8. Importância em Saúde Pública

A criptosporidiose em humanos é cosmopolita e têm sido descrita tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunossuprimidos (FRANCO, 2007). As crianças, os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), os pacientes em quimioterapia ou os que fazem uso de medicação imunossupressora são os mais susceptíveis a infecção por *Cryptosporidium* spp. (XIAO; FAYER, 2008; FAYER, 2010).

Essa enfermidade foi incluída na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (“World Health Organisation Neglected Diseases Initiative”) por sua estreita relação com pessoas de baixo poder aquisitivo, condições de higiene precárias e péssima qualidade da água consumida (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006).

Uma atenção maior foi dada a veiculação hídrica de *Cryptosporidium*, após o surto Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos, em 1993, que envolveu 403.000 pessoas que apresentavam diarreia. Dessas, 285 tiveram confirmação laboratorial do parasito em amostras fecais (MAC KENZIE et al., 1994). No Brasil, a criptosporidiose em humanos não é de notificação compulsória, contudo os surtos devem ser informados à vigilância epidemiológica local, regional e central (BRASIL, 2010).

Várias espécies do coccídio têm sido descritas infectando humanos e a classificação dessas e de seus genótipos tem importância fundamental para a Saúde Pública (FÉRES et al., 2009; PLUTZER; KARANIS, 2009) e as principais

espécies do parasito incriminadas nos surtos em humanos com veiculação hídrica são *C. parvum* e *Cryptosporidium hominis* (CACCIÒ et al., 2005; FRANCO, 2007).

Dentre as espécies do coccídio relatadas na literatura, aquelas que apresentam caráter zoonótico são *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium cuniculus*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium fayeri*, *Cryptosporidium scrofarum*, *Cryptosporidium viatorum*, *Cryptosporidium pestis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. andersoni* e *C. ubiquitum* (THOMPSON, 2000; ABE; KIMATA; ISEKI, 2002; CACCIÒ et al., 2002; MONIS; THOMPSON, 2003; PENG et al., 2003; FAYER, 2004; XIAO et al., 2004; CACCIÒ et al., 2005; CASTRO-HERMIDA; GONZÁLES-WARLETA; MEZO, 2007; GEURDEN et al., 2008; QUÍLEZ et al., 2008; XIAO; FENG, 2008; PLUTZER; KARANIS, 2009; FAYER; SANTÍN; MACARISIN, 2010; XIAO, 2010; PARAUD; CHARTIER, 2012; SILVERLÁS et al., 2012; CACCIÒ et al., 2013; ŠLAPETA, 2013; KOINARI; LYMBERY; RYAN, 2014; LI et al., 2014).

### **3. OBJETIVOS**

Este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência da infecção e realizar a caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em caprinos jovens do município de Quixadá, Ceará, Brasil.

#### **3.1. Objetivos específicos**

Inicialmente, buscou-se estimar a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos jovens do município de Quixadá, Ceará.

Avaliar a infecção nos períodos seco e chuvoso e a distribuição espacial do número de animais positivos nas propriedades rurais, nos distritos e nos circuitos.

Identificar se as variáveis relativas aos animais, como sexo, raça e faixa etária, bem como a coloração e o aspecto das fezes, possuem associação com a presença do parasito nas amostras fecais.

Num segundo momento, identificar por meio do sequenciamento a espécie do parasito detectada nas amostras de fezes de cabritos que apresentaram amplificação de fragmentos de DNA de *Cryptosporidium* spp. nas “Nested”-PCR, com os genes da subunidade 18S rRNA, actina e HSP 70.

Por último, objetivou-se descobrir se os tipos de sistemas de criação adotados em propriedades rurais de Quixadá, Ceará, bem como algumas medidas de manejo sanitário, nutricional e reprodutivo, representam fator de risco para ocorrência da infecção pelo coccídio.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local e amostra**

O estudo teve aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista-“Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, com o Protocolo nº 014465/12 e foi realizado em criações caprinas do município de Quixadá, Ceará, Brasil.

Quixadá tem uma população de 80.605 habitantes numa área de 2.020 Km<sup>2</sup> e rebanho caprino de 9.750 animais distribuídos em 469 propriedades, o que representa 0,96% do rebanho Cearense (IBGE, 2011). Está localizada na região semiárida dos Sertões cearenses, a 04° 58' 15" de latitude Sul e 39° 00' 54" de longitude Oeste, altitude de 189 m e possui uma distância da capital Fortaleza de 167 Km.

A pluviosidade média no município é de 838,1 mm/ano, com temperatura elevada ao longo do ano, tendo média de 26,7 °C e umidade relativa do ar de 70%.

O clima na região é caracterizado por um período chuvoso de janeiro a junho e um seco de julho a dezembro.

Para obtenção do número amostral, foi adotada uma distribuição normal, com 5,00% de significância, considerando-se o grau de confiança de 95,00% ( $Z = 1,96$ ) e prevalência esperada de 50,00%, conseguindo-se assim o valor máximo da amostra. Primeiro estimou-se o número de indivíduos sem levar em consideração o tamanho da população, empregando-se a fórmula:

$$n' = \frac{p \cdot q \cdot Z^2}{d^2}$$

Em que:

$n'$  = número de indivíduos da amostra sem levar em consideração o tamanho da população

$p$  = prevalência esperada de 50,00%

$q = (1 - p)$

$Z$  = valor que corresponde ao grau de confiança de 95,00% ( $Z = 1,96$ )

$d$  = erro admitido de 5,00%

Levando em consideração o tamanho da população, o valor foi corrigido por meio da fórmula

$$n = \frac{N \cdot n'}{N + n'}$$

Em que:

$n$  = número de indivíduos da amostra levando em consideração o tamanho da população

$n'$  = número de indivíduos da amostra sem levar em consideração o tamanho da população

$N$  = tamanho da população de caprinos em Quixadá, CE, de 9.750 animais

Desta forma, obteve-se um total de 371 caprinos, porém esse valor foi aproximado para 400 animais. Foi adotado o critério de amostra não probabilística intencional, com coletas de fezes somente de crias. Para o cálculo do número de

propriedades, foi dividido o tamanho da população pelo número de estabelecimentos rurais de Quixadá, CE (9.750 animais /469 criadouros), conforme informações do site do IBGE em 2011.

O número médio de animais por propriedade foi de aproximadamente 21. Posteriormente o tamanho amostral foi dividido por este valor (400/21), sendo alcançado um resultado de 19 fazendas. Como muitas propriedades não possuíam mais de 20 animais aumentou-se o número de estabelecimentos rurais que participariam da pesquisa para 25, desta forma, sendo necessários em média 16 cabritos em cada uma.

Com auxílio de informações sobre os produtores rurais do município, fornecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Ceará (EMATERCE) unidade de Quixadá, foi possível identificar quais distritos possuíam mais propriedades. Os mais representativos foram agrupados em três circuitos (Figura 1) e para escolha dos proprietários optou-se por sorteio aleatório.

O circuito um (C1) englobou os distritos Califórnia (n = 5 propriedades), Daniel de Queiroz (n = 1) e São João dos Queirozes (n = 3). No circuito dois (C2) estavam os distritos Cipó dos Anjos (n = 6), Novo Contrato (n = 1) e Tapuiará (n = 2), cada um desses circuitos corresponderam a 36,00% das propriedades; e o circuito três (C3) Juatama (n = 1), Riacho Verde (n = 1) e Sede (n = 5), que equivale a 28,00% dos estabelecimentos rurais.

Para coleta das amostras foram realizadas viagens em dois momentos, o primeiro no período de novembro a dezembro de 2012 (n = 199 cabritos ao todo), caracterizando a estação seca (Figura 2) na região, com precipitação pluviométrica média de 0,0 mm, na ocasião foi aplicado um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) e um questionário epidemiológico (Apêndice B) a cada produtor, que englobava perguntas sobre sistema de produção, manejo nutricional, reprodutivo e sanitário que eram adotados na estação seca e na chuvosa.

Num segundo momento, foram realizadas coletas de fezes de um total de 201 caprinos jovens, em maio de 2013, que corresponde à estação chuvosa (Figura 2), com precipitação pluviométrica média de 150,7 mm (FUCEME, 2014), nas mesmas 25 propriedades visitadas durante a estação seca, para que fosse possível completar o total de 400 animais necessários no estudo.

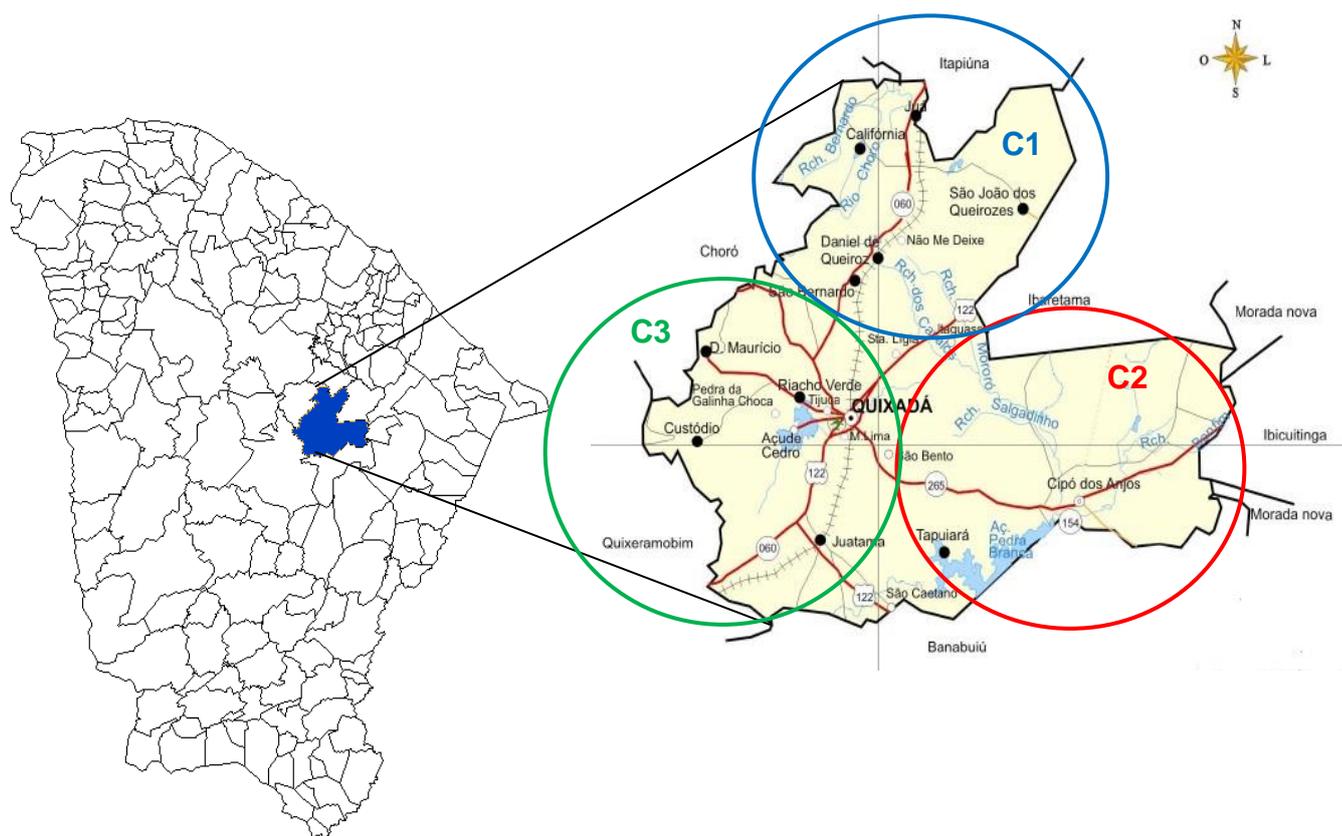


Figura 1. Localização do município de Quixadá, no Ceará, e dos três circuitos (C1, C2 e C3) em que foram realizadas coletas para obter a ocorrência de *Cryptosporidium* spp., no período de novembro de 2012 a maio de 2013. Fonte: Adaptado de Viana et al. (2009), com auxílio do programa MapInfo® versão 7.5.



Figura 2. Ilustração da estação seca (a) durante período de novembro e dezembro de 2012, com precipitação pluviométrica média de 0,0 mm e chuvosa (b) em maio de 2013, com média de 150,7 mm, em uma propriedade rural do município de Quixadá, Ceará. Fonte: Arquivo pessoal.

Os cabritos que tiveram fezes coletadas em novembro a dezembro de 2012 não participaram das coletas em maio de 2013, desta forma não houve repetição dos animais, sendo que os 400 animais que participaram do estudo eram diferentes uns dos outros.

Nas visitas de novembro a dezembro de 2012, foram obtidos os pontos de localização geográfica (latitude e longitude) com auxílio de GPS e-Trex modelo Vista (Garmin<sup>®</sup>, Kansas, Estados Unidos), para a confecção dos mapas de distribuição espacial do número de animais positivos para *Cryptosporidium* spp. com auxílio do programa MapInfo<sup>®</sup> Professional versão 7.5.

#### **4.2. Coletas das amostras de fezes e processamento**

Foram realizadas coletas de fezes diretamente da ampola retal de 400 cabritos, machos e fêmeas, com idade entre três e 360 dias, com padrão racial definido (CPRD) e sem padrão racial definido (SPRD).

As amostras de fezes, obtidas diretamente da ampola retal, foram armazenadas em sacos plásticos individuais devidamente identificados, refrigeradas e enviadas ao Laboratório de Parasitologia da Embrapa Caprinos e Ovinos em Sobral, Ceará, onde foram cadastradas de acordo com o aspecto e a coloração.

De acordo com o aspecto (Apêndice C, Figura C1), as fezes foram classificadas em “grude” (A1); cíbalas (A2); diarreia (A3); amolecida (A4) e ressecada (A5). Com relação à coloração (Apêndice C, Figura C2) em normal (V1); verde (V2); verde-amarelada (V3); amarelada (V4) e marrom com muco laranja (V5). Posteriormente 200 mg de cada amostra foram distribuídos em duplicata em microtubos graduados de dois mililitros (mL) e congelados a -20 °C “in natura”.

Uma alíquota de fezes congelada a -20 °C de cada animal foi encaminhada ao Laboratório de Ornitopatologia da FMVA/UNESP, para a extração de DNA genômico de *Cryptosporidium* spp. com auxílio do “QIAamp DNA Stool Mini Kit (50)” (Cat. N° 51504, Qiagen<sup>®</sup>, Valencia, Califórnia, Estados Unidos).

As amostras foram descongeladas, adicionadas do tampão ALT fornecido no kit e submetidas a cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 99 °C em termomixer digital, modelo Thermomixer compact (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha). Posteriormente, foi seguido o protocolo descrito pelo fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até o momento da “Nested”-PCR (nPCR).

#### **4.3. “Nested”-PCR com amplificação dos genes 18S rRNA, actina e HSP 70 de *Cryptosporidium* spp.**

Para amplificação de fragmentos da subunidade 18S RNA ribossômico (rRNA) na nPCR, foi utilizada metodologia descrita por Xiao et al. (2000), com os “Primer” “forward” 1 (F1) 5’ TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3’ e “Primer” “reverse” 1 (R1) 5’ CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3’, com amplificação de produto de 1.325 pares de base (pb) na reação primária e “Primer” “forward” 2 (F2) 5’ GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3’ e “Primer” “reverse” 2 (R2) 5’ AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3’ e produto de 826-840 pb na reação secundária. Esses oligonucleotídeos iniciadores amplificam fragmentos de DNA de todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* conhecidos.

Uma solução com volume final de 25 µL foi preparada contendo 2,5 µL de tampão para PCR 1x, Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) a 2,0 mM, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo, 200 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,6 µg/µL de albumina sérica bovina (BSA), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Cat. N° D4184, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e 2,5 µL de DNA-alvo, não quantificado. Para preparo dos reagentes da reação secundária foram utilizadas as mesmas quantidades, porém não foi usada a BSA (Cat. N° B8667, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Para controle positivo (C+) foram utilizados 2,5 µL de DNA previamente identificado como *Cryptosporidium serpentis* e como controle negativo (C-) 2,5 µL de água ultrapura no lugar do DNA-alvo. As amostras foram submetidas à desnaturação

inicial do DNA a 95°C por três minutos, seguida de 39 ciclos, cada um consistindo em desnaturação por 45 segundos a 95°C, 45 segundos de anelamento a 55°C e 60 segundos de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por sete minutos. Na reação secundária foi repetida essa programação (XIAO et al., 2000). As duas reações de nPCR ocorreram em termociclador Real-Plex<sup>2</sup>, modelo mastercycler epgradient S (Eppendorf<sup>®</sup>, Hamburg, Alemanha).

Após a segunda reação de nPCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Cat. N° A9539, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) a 1,5% com 5 µL de brometo de etídio. Em cada gel foi utilizado o C+ de *C. serpentis*, o C- e o marcador molecular de 100 pb (Cat. N° 15628-019, Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos). A corrida foi realizada a 100 V por 45 minutos, utilizando-se aparelho Power Pac 3000 (Bio-rad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos).

Os fragmentos amplificados foram visualizados com auxílio de aparelho que emitia luz ultravioleta (UV), e aquelas amostras que apresentaram bandas com aproximadamente 840 pb foram consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. e submetidas a nPCR com os genes actina (ACT) e da proteína “heat-shock” de 70kDa (HSP 70), que são mais polimórficos, para dar mais confiabilidade ao diagnóstico das espécies do parasito por meio do sequenciamento.

Para amplificação de fragmentos do gene ACT foi utilizada metodologia descrita por Sulaiman, Lal e Xiao (2002), com os oligonucleotídeos iniciadores F1 5' ATG RGW GAA GAA GWA RYW CAA GC 3' e R1 5' AGA ARC AYT TTC TGT GKA CAA 3', com amplificação de produto de 1095 pb na reação primária e F2 5' CAA GCW TTR GTT GTT GAY AA 3' e R2 5' TTT CTG TGK ACA ATW SWT GG 3' na reação secundária com produto de 1066 pb.

Uma solução com volume final de 25 µL foi preparada contendo 2,5 µL de tampão para PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> a 2,5 mM, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo, 200 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,6 µg/µL de BSA (Cat. N° B8667, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Cat. N° D4184, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e 2,5 µL de DNA-alvo, não quantificado. Para preparo dos reagentes da reação secundária foram utilizadas as mesmas quantidades, porém não foi usada a BSA. Para C+ foi utilizado

2,5 µL de DNA de *C. serpentis* e como C- 2,5 µL de água ultrapura no lugar da amostra de DNA.

Na reação primária as amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos, cada um consistindo em desnaturação por 45 segundos a 94°C, anelamento a 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C durante 60 segundos, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Essa programação foi repetida na reação secundária, com exceção do anelamento, que foi feito a 45°C por 45 segundos (SULAIMAN; LAL; XIAO, 2002).

Para amplificação de fragmentos do gene HSP 70 na nPCR, foi utilizada a metodologia descrita por Morgan et al. (2001), com os “primers” F1 5’ GGT GGT GGT ACT TTT GAT GTA TC 3’ e R1 5’ GCC TGA ACC TTT GGA ATA CG 3’, com amplificação de produto de 448 pb na reação primária e F2 5’ GCT GST GAT ACT CAC TTG GGT GG 3’ e R2 5’ CTC TTG TCC ATA CCA GCA TCC 3’ e produto de 325 pb na reação secundária.

Uma solução com volume final de 25 µL foi preparada com 2,5 µL de tampão para PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> a 2,0 mM, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo, 400 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,6 µg/µL BSA (Cat. N° B8667, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Cat. N° D4184, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e 2,5 µL de DNA-alvo, não quantificado. Para preparo dos reagentes da reação secundária foram utilizadas as mesmas quantidades, sem a BSA. Para C+ e C- foram usados os mesmos da ACT.

As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94°C por cinco minutos, seguida de 40 ciclos, cada um com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Essa programação foi repetida na reação secundária (MORGAN et al., 2001).

Aquelas que apresentaram amplificação de fragmentos de DNA de *Cryptosporidium* spp. nas reações de nPCR com os genes 18S rRNA, ACT e HSP 70 foram submetidas, em triplicata, a uma segunda reação de nPCR e eletroforese em gel de agarose (Cat. N° A9539, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) a 1,5% com brometo de etídio e posteriormente purificadas com auxílio do

“QIAquick Gel Extraction Kit (50)” (Cat. N° 28704, Qiagen®, Valencia, Califórnia, Estados Unidos ), conforme recomendações do fabricante.

As amostras purificadas tiveram o DNA de *Cryptosporidium* spp. quantificado em espectrofotômetro NanoDrop®, modelo ND-1000 (Thermo® Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos). Aquelas que apresentaram concentração mínima de 10 ng/μL foram aliqüotadas num volume de 20 μL em microtubos de 250 μL e enviadas para sequenciamento com “ABI Prism®” “Dye Terminator Cycling Sequence kit” (Applied Biosystems®, Warrington, Inglaterra, Reino Unido) no laboratório do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) na FCAV-UNESP em Jaboticabal, São Paulo.

As reações foram realizadas em duplicata, na direção “sense” e “anti-sense”, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores da reação secundária. As sequências foram alinhadas com o auxílio dos programas “CodonCode” versão 5.0.1, “Clustal W” (THOMPSON et al., 1997) e “BioEdit® Biological Sequence Alignment Editor” (HALL, 1999). Posteriormente foram comparadas no BLAST® (NCBI, 2014a) com sequências homólogas disponíveis no GenBank® (NCBI, 2014b).

#### **4.4. Caracterização das propriedades**

As propriedades foram caracterizadas com base nas informações obtidas no questionário epidemiológico e neste havia perguntas sobre o conhecimento que os produtores tinham a respeito da criptosporidiose, tipo de sistema de criação, se tinham assistência técnica e irrigação, aspectos sobre manejo nutricional como o fornecimento de concentrado e volumoso no cocho e manejo reprodutivo como a idade de castração dos machos e de cobertura das fêmeas.

Foram abordados também aspectos sobre o manejo em geral, como quais espécies eram criadas além dos caprinos, fonte de água utilizada para consumo destes animais e se os vasilhames de água ficavam dentro ou fora das instalações, se forneciam colostro para os recém-nascidos e em que idade ocorria o desmame e

sobre manejo sanitário, como a frequência de limpeza das instalações, se os dejetos ficavam expostos ou não, se havia problemas de diarreia e coprofagia.

Como sistema de criação intensivo foi considerado aquele em que os animais passavam o tempo todo confinados, com muita tecnificação (ordenhadeira mecânica, identificação por tatuagem), manejo sanitário, nutricional e reprodutivo bem controlados, escrituração zootécnica e pastejo rotacionado.

No semi-intensivo os animais passavam parte do tempo presos, com alguma tecnificação, anotação e identificação do rebanho (brinco, colares) e adoção de algumas medidas de manejo sanitário, nutricional e reprodutivo.

Por sua vez, no extensivo, os animais ficavam totalmente soltos no pasto, sem instalações e medidas de manejo nutricional sanitário e reprodutivo, sem identificação do rebanho ou anotações.

#### **4.5. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no programa Epi Info<sup>TM</sup>, versão 7. 1. 2. 0 (CDC, 2014) e efetuada em dois momentos. No primeiro cada variável independente (período seco e chuvoso; circuitos; idade; sexo; raça; aspecto e coloração das fezes) foi testada com a variável dependente (positividade para *Cryptosporidium* spp.) em uma análise univariada.

A medida de associação utilizada foi a odds ratio (OR) e obtidos os intervalos de confiança de 95% e significância determinada por meio do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou pelo teste exato de Fisher (ZAR, 1999). Este foi utilizado sempre que os valores com frequência esperada eram inferiores a cinco. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

A análise multivariada foi utilizada para estudar, de forma simultânea, os múltiplos efeitos que poderiam estar envolvidos na ocorrência da infecção pelo parasito. Foram selecionadas as variáveis que tiveram associação com a enfermidade e valor de  $P < 0,20$  e submetidas à regressão logística. Para

interpretação dos resultados, foi considerado significativo valor de  $P < 0,05$  (ZAR, 1999).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp.

A ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos jovens de 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, foi obtida por meio da nPCR (Tabela 1). O distrito de Tapuiará apresentou maior ocorrência com 18,75% (6/32), com todos os resultados positivos provenientes da propriedade 11 (P11), seguido da Sede, com 11,39% (9/79), com positividade nas propriedades P19, P20, P21 e P23.

Das 25 propriedades estudadas foram identificadas amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. em 64,00% (16/25). Pela distribuição espacial foi possível perceber que aquelas com mais animais positivos encontravam-se na região central do município de Quixadá, Ceará (Figura 3).

As áreas quentes do mapa (Figura 4), representadas pelas cores vermelha e amarela, demonstram as propriedades que tiveram maior número de animais positivos para *Cryptosporidium* spp. e as áreas frias, em azul escuro, correspondem às propriedades sem ocorrência da infecção.

Com relação aos períodos, circuitos, sexo e raça, não foi observada diferença estatística significativa entre essas variáveis e a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. (Tabela 2).

Dos caprinos jovens positivos para *Cryptosporidium* spp. na nPCR, 53,33% (16/30) tinham idade entre 121 e 180 dias e nenhum animal da FE6 (Figura 5) foi positivo ( $P = 0,0548$ ).

Tabela 1. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em cabritos de 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, pela “Nested”-PCR, no período de novembro de 2012 a maio de 2013.

<b>Circuito</b>	<b>Propriedade</b>	<b>Distrito</b>	<b>Cabritos Testados (n°)</b>	<b>Positivos na “Nested”-PCR (n°)</b>
C1	P1	São João dos Queirozes	16	0 (0,00%)
C1	P2	São João dos Queirozes	17	1 (5,88%)
C1	P3	São João dos Queirozes	16	4 (25,00%)
C1	P4	Califórnia	18	1 (5,55%)
C1	P5	Califórnia	16	0 (0,00%)
C1	P6	Califórnia	16	1 (6,25%)
C1	P7	Califórnia	16	1 (6,25%)
C1	P8	Califórnia	16	1 (6,25%)
C1	P9	Daniel de Queiroz	15	0 (0,00%)
C2	P10	Tapuiará	16	0 (0,00%)
C2	P11	Tapuiará	16	6 (37,50%)
C2	P12	Cipó dos Anjos	10	0 (0,00%)
C2	P13	Cipó dos Anjos	13	1 (7,69%)
C2	P14	Cipó dos Anjos	20	1 (5,00%)
C2	P15	Cipó dos Anjos	16	0 (0,00%)
C2	P16	Cipó dos Anjos	16	2 (12,50%)
C2	P17	Cipó dos Anjos	21	1 (4,76%)
C2	P18	Novo Contrato	15	0 (0,00%)
C3	P19	Sede	16	2 (12,50%)
C3	P20	Sede	15	2 (13,33%)
C3	P21	Sede	16	3 (18,75%)
C3	P22	Sede	17	0 (0,00%)
C3	P23	Sede	15	2 (13,33%)
C3	P24	Riacho Verde	16	0 (0,00%)
C3	P25	Juatama	16	1 (6,25%)
<b>TOTAL</b>			<b>400</b>	<b>30 (7,50%)</b>

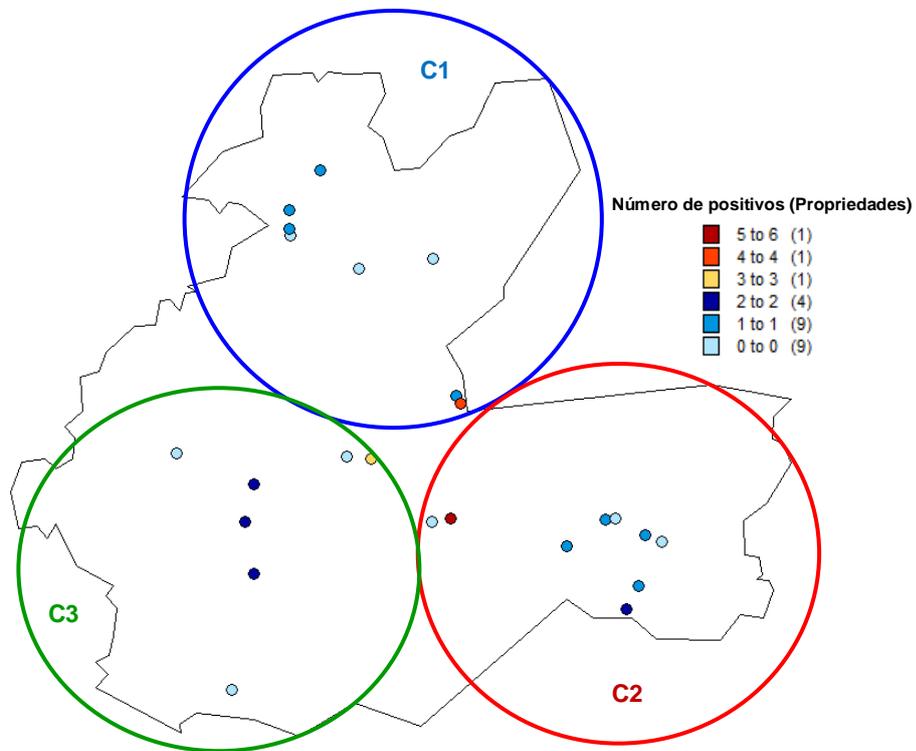


Figura 3. Distribuição espacial do número de cabritos positivos para *Cryptosporidium* spp. durante coletas em novembro de 2012 a maio de 2013, em 25 propriedades rurais do município de Quixadá, no Ceará e seus respectivos circuitos C1, C2 e C3. Mapas gerados no programa MapInfo® Professional versão 7.5.

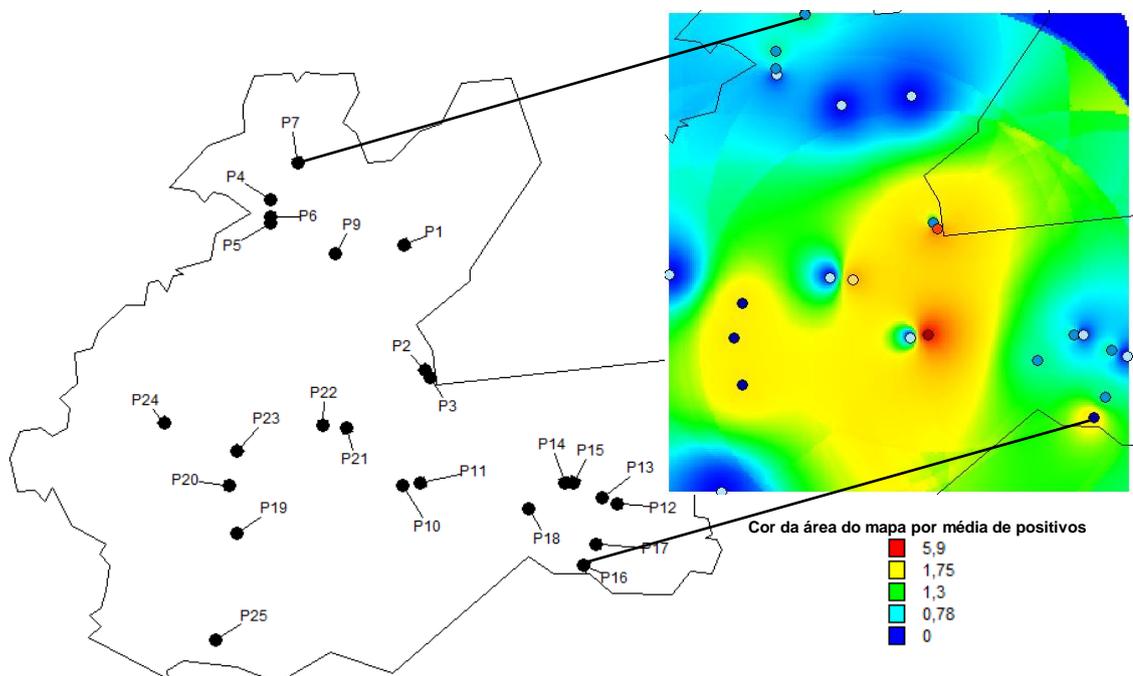


Figura 4. Distribuição espacial das 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará e as regiões com (áreas em amarelo e vermelho) e sem (áreas em azul escuro) cabritos positivos para *Cryptosporidium* spp., durante coletas em novembro de 2012 a maio de 2013. Mapas gerados no programa MapInfo® Professional versão 7.5.

Tabela 2. Cabritos de três a 360 dias de idade, positivos (n=30) para *Cryptosporidium* spp., provenientes de 25 estabelecimentos rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas em novembro de 2012 a maio de 2013, de acordo com as variáveis períodos do ano, sexo, raça, idade, aspecto e coloração das fezes.

Variável	N (+)	N (-)	% (+/total)	OR	IC-95%	$\chi^2$	P =
<b>Período do ano</b>							
Seco	19	180	9,55 (19/199)	1,8232	0,8441-3,9380	2,3937	0,1218 <sup>ns</sup>
Chuvoso	11	190	5,47 (11/201)				
<b>Circuito</b>							
2	11	132	7,69 (11/143)	1,2685	0,5092-3,1603	0,2618	0,6089 <sup>ns</sup>
1	9	137	6,16 (9/146)				
3	10	101	9,01 (10/111)	1,5072	0,5908-3,8449	0,7453	0,3880 <sup>ns</sup>
1	9	137	6,16 (9/146)				
3	10	101	9,01 (10/111)	1,1881	0,4856-2,9069	0,1429	0,7055 <sup>ns</sup>
2	11	132	7,69 (11/143)				
<b>Sexo dos animais</b>							
Fêmea	19	227	7,72 (19/246)	1,0881	0,5031-2,3536	0,0460	0,8301 <sup>ns</sup>
Macho	11	143	7,14 (11/154)				
<b>Raça</b>							
Sem padrão racial definido	24	292	7,59 (24/316)	1,0685	0,4221-2,7050	0,0195	0,8888 <sup>ns</sup>
Com padrão racial definido	6	78	7,14 (6/84)				

N (+) = número de positivos para *Cryptosporidium* spp. na "Nested"-PCR com gene 18S rRNA, N (-) = número de negativos para *Cryptosporidium* spp. na "Nested"-PCR, % (+/total) = percentual de positivos, OR = odds ratio, IC- 95% = intervalo de confiança de 95%,  $\chi^2$  = Qui-quadrado, \*com significância estatística de 5% e <sup>ns</sup>não significativo estatisticamente a 5%.

Em relação ao aspecto das fezes, foi possível observar que 51,75% (207/400) estavam normais, ou seja, na forma de cibalas, e nenhuma amostra A1 ou A3 foi positiva (P = 0,6572) para *Cryptosporidium* spp. (Tabela 3). Das que tiveram amplificação do gene da subunidade 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp. 50,00% (15/30) eram A2.

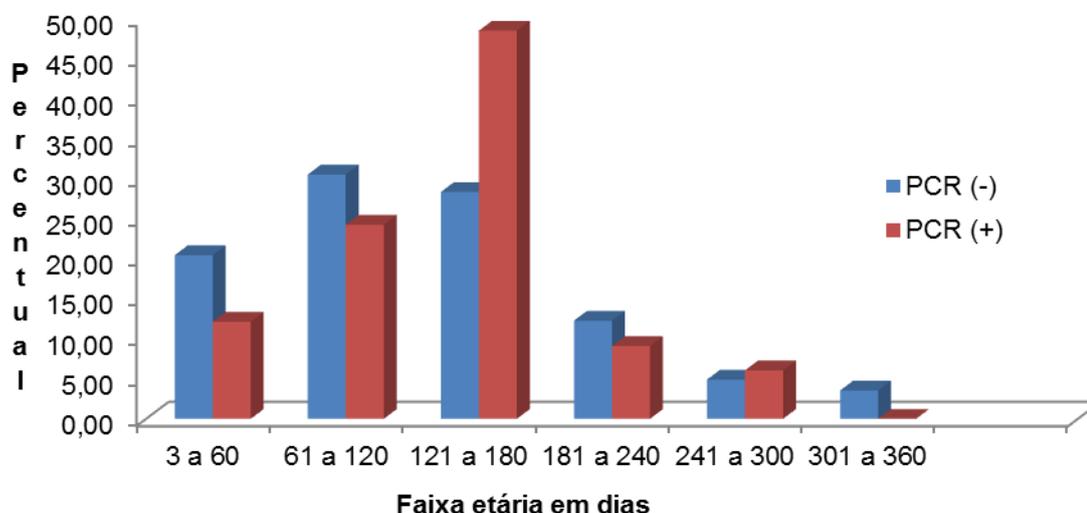


Figura 5. Cabritos de Quixadá, Ceará, positivos e negativos para *Cryptosporidium* spp. na “Nested”-PCR em diferentes faixas etárias.

De acordo com a coloração (Tabela 4), observou-se que 70,00% (21/30) das amostras de fezes que tiveram amplificação do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp. ( $P = 0,1676$ ) eram V1.

Tabela 3. Percentual de amostras de fezes de 400 cabritos, provenientes de 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas no período de novembro de 2012 a maio de 2013, positivas e negativas para *Cryptosporidium* spp. por meio da “Nested”-PCR, em relação ao aspecto.

“Nested”-PCR	ASPECTO*					TOTAL %
	A1 %	A2 %	A3 %	A4 %	A5 %	
Positivo	0,00 (0/4)	7,25 (15/207)	0,00 (0/7)	10,71 (9/84)	6,12 (6/98)	7,50 (30/400)
Negativo	100,00 (4/4)	92,75 (192/207)	100,00 (7/7)	89,29 (75/84)	93,88 (92/98)	92,50 (370/400)
TOTAL %	100,00 (4/4)	100,00 (207/207)	100,00 (7/7)	100,00 (84/84)	100,00 (98/98)	100,00 (400/400)

\*A1 = “grude”, A2 = cíbalas, A3 = diarreia, A4 = amolecida e A5 = ressecada.

As variáveis período do ano ( $P = 0,1218$ ), idade ( $P = 0,0548$ ) e coloração das fezes dos cabritos ( $P = 0,1676$ ) foram submetidas à análise de regressão logística (Tabela 5).

Tabela 4. Percentual de amostras de fezes de 400 cabritos, provenientes de 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas no período de novembro de 2012 a maio de 2013, positivas e negativas para *Cryptosporidium* spp. por meio da “Nested”-PCR, em relação à coloração.

“Nested”- PCR	COLORAÇÃO*					TOTAL %
	V1 %	V2 %	V3 %	V4 %	V5 %	
Positivo	7,12 (21/295)	5,13 (2/39)	4,00 (1/25)	10,34 (3/29)	25,00 (3/12)	7,50 (30/400)
Negativo	92,88 (274/295)	94,87 (37/39)	96,00 (24/25)	89,66 (26/29)	75,00 (9/12)	92,50 (370/400)
TOTAL %	100,00 (295/295)	100,00 (39/39)	100,00 (25/25)	100,00 (29/29)	100,00 (12/12)	100,00 (400/400)

\*V1 = normal, V2 = verde, V3 = verde-amarelada, V4 = amarelada e V5 = marrom com muco laranja.

Tabela 5. Análise de regressão logística de acordo com período do ano (seco e chuvoso), idade e coloração das fezes dos cabritos provenientes de 25 estabelecimentos rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas em novembro de 2012 a maio de 2013.

Variável	OR	IC-95%	P =
Período do ano	0,4030	0,1704-0,9532	0,0385*
Idade dos cabritos	1,2749	0,9036-1,7987	0,1667 <sup>ns</sup>
Coloração das fezes	1,3998	1,0138-1,9326	0,0410*

\*Significativo estatisticamente ( $P < 0,05$ ), <sup>ns</sup> não significativo estatisticamente ( $P > 0,05$ ), OR = odds ratio, IC- 95% = intervalo de confiança de 95%.

## 5.2. Identificação das espécies de *Cryptosporidium*

As eletroforeses em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio para os genes 18S rRNA, actina e HSP 70, apresentaram amplificação de bandas com aproximadamente 840 pb (Figura 6), 1066 pb (Figura 7) e 325 pb (Figura 8), respectivamente.

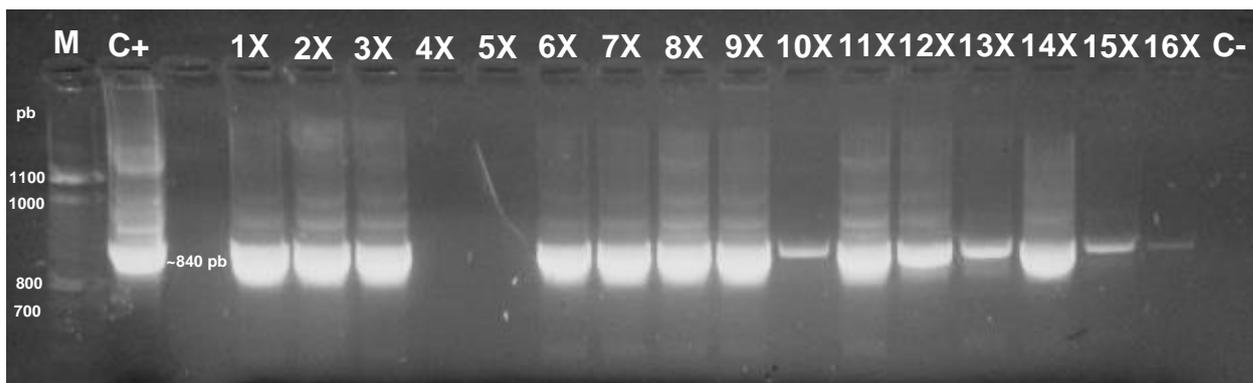


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, amostras 1X a 3X e 6X a 16X, provenientes de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, com amplificação de fragmentos do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp. com aproximadamente 840 pares de base (pb) e amostras 4X e 5X negativas, ou seja, sem amplificação (M = marcador de peso molecular 100pb, C+ = controle positivo *Cryptosporidium serpentis*, 1X a 16X amostras de campo e C- = controle negativo).  
Fonte: Arquivo pessoal.

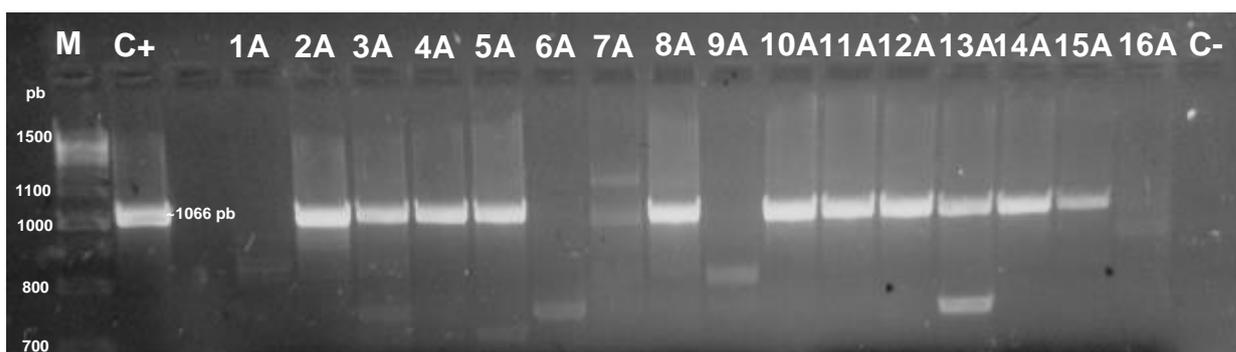


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, amostras 1A, 6A, 9A e 16A sem amplificação do gene actina de *Cryptosporidium* spp., amostras 2A a 5A, 7A, 8A, 10A a 15A, provenientes de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, com amplificação de fragmentos do gene actina de *Cryptosporidium* spp. com aproximadamente 1066 pares de base (M = marcador de peso molecular 100pb, C+ = controle positivo *Cryptosporidium serpentis*, 1A a 16A amostras de campo e C- = controle negativo).  
Fonte: Arquivo pessoal.

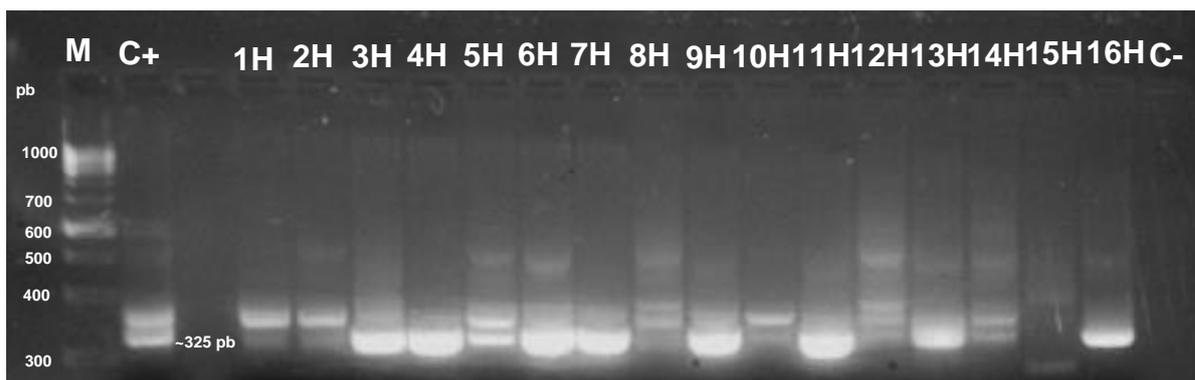


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, amostras 1H a 14H e 16H, provenientes de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, com amplificação de fragmentos do gene HSP 70 de *Cryptosporidium* spp. com aproximadamente 325 pares de base (pb) e amostra 15H sem amplificação (M = marcador de peso molecular 100pb, C+ = controle positivo *Cryptosporidium serpentis*, 1H a 16H amostras de campo e C- = controle negativo).

Fonte: Arquivo pessoal.

Por meio do sequenciamento foi possível identificar três espécies de *Cryptosporidium* (Tabela 6). Em 50,00% (8/16) das propriedades positivas não foi possível realizar o sequenciamento, porque as amostras estavam com a concentração de DNA abaixo de 10 ng/ $\mu$ L.

Em 75,00% (6/8) das propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, foi detectado *Cryptosporidium xiaoi*, e infecção mista entre esta espécie e *Cryptosporidium ubiquitum* foi observada em um animal da P2. Um cabrito teve identificação de *Cryptosporidium meleagridis* em suas fezes pelos genes 18S rRNA, actina e HSP 70 (Tabela 6).

A única sequência que não apresentou 100% de identidade com aquelas comparadas no GenBank<sup>®</sup>, foi a amostra da P23 com 99% de similaridade com *C. xiaoi* no gene HSP 70.

Tabela 6. Identificação de espécies de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de caprinos provenientes de 25 propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, com coletas no período de novembro de 2012 a maio de 2013, por meio de sequenciamento dos genes 18S rRNA, actina e HSP 70 e o percentual de identidade com base nas sequências do parasito depositadas no GenBank®.

Propriedade	Positivos nPCR 18S rRNA (%)	Identidade (sequências depositadas no GenBank®)		
		Gene 18S rRNA	Gene actina	Gene HSP 70
P1	0 (0,00)	-	-	-
P2	1 (5,88)	100% <i>Cryptosporidium xiaoi</i> (JQ413443)	*	100% <i>Cryptosporidium ubiquitum</i> (EF362483)
P3	4 (25,00)	*	*	*
P4	1 (5,55)	100% <i>Cryptosporidium meleagridis</i> (AF112574)	100% <i>C. meleagridis</i> (JX471003)	100% <i>C. meleagridis</i> (AF221537)
P5	0 (0,00)	-	-	-
P6	1 (6,25)	*	*	*
P7	1 (6,25)	*	*	*
P8	1 (6,25)	*	*	*
P9	0 (0,00)	-	-	-
P10	0 (0,00)	-	-	-
P11	6 (37,50)	100% <i>C. xiaoi</i> (JQ413443)	*	*
P12	0 (0,00)	-	-	-
P13	1 (7,69)	100% <i>C. xiaoi</i> (GU553016)	*	*
P14	1 (5,00)	*	*	*
P15	0 (0,00)	-	-	-
P16	2 (12,50)	*	*	*
P17	1 (4,76)	*	*	*
P18	0 (0,00)	-	-	-
P19	2 (12,50)	100% <i>C. xiaoi</i> (JQ413443)	100% <i>C. xiaoi</i> (FJ896042)	*
P20	2 (13,33)	100% <i>C. xiaoi</i> (GU553016)	*	100% <i>C. xiaoi</i> (FJ896041)
P21	3 (18,75)	*	*	100% <i>C. ubiquitum</i> (EF362483)
P22	0 (0,00)	-	-	-
P23	2 (13,33)	*	100% <i>C. xiaoi</i> (FJ896042)	99% <i>C. xiaoi</i> (FJ896041)
P24	0 (0,00)	-	-	-
P25	1 (6,25)	*	*	*

\*Amostra com concentração de DNA abaixo que 10 ng/μL, insuficiente para realização do sequenciamento.

### 5.3. Avaliação das propriedades por meio de questionário

Com base nas informações obtidas no questionário epidemiológico aplicado aos 25 proprietários rurais do município de Quixadá, Ceará, no período de novembro e dezembro de 2012 (Apêndice D), foi possível observar que apenas idade de castração dos cabritos ( $\chi^2 = 10,6717$ , 3 gl e  $P = 0,0136$ ) apresentou significância estatística a 5%.

Sistema de criação intensivo não era adotado nos circuitos 1 e 2, e nos estabelecimentos rurais com o sistema semi-intensivo havia exploração para leite, carne ou misto (carne e leite). Uma propriedade não possuía informações sobre o manejo das crias, pois o rebanho tinha sido implantado apenas dois meses antes das coletas.

As variáveis idade de castração dos cabritos ( $P = 0,0136$ ), irrigação ( $P = 0,1153$ ) e “observaram coprofagia” ( $P = 0,1304$ ) foram submetidas à análise de regressão logística, e nenhuma delas foi estatisticamente significativa a 5%.

Os sistemas de criação bem como as medidas de manejo nutricional, reprodutivo e sanitário adotados nas propriedades rurais de Quixadá, Ceará, não representaram fatores de risco para os cabritos se infectarem pelo coccídio.

## 6. DISCUSSÃO

A ocorrência encontrada neste estudo por meio da nPCR com o gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp. está abaixo da encontrada na Espanha (CASTRO-HERMIDA; GONZÁLES-WARLETA; MEZO, 2007), na Bélgica (GEURDEN et al., 2008), na Nigéria (PAM et al., 2013), no Sri Lanka (NOORDEEN et al., 2000), na Sérvia (ZORANA; SOFIJA; SADRIŽAJ, 2006) e na Argentina (VENTURINI et al., 2006). Porém está próxima à relatada no Brasil, que é de 4,80% (BOMFIM et al., 2005) e 16,66% (COELHO, 2011).

A maior frequência do parasitismo por *Cryptosporidium* spp. na estação seca também foi relatada por Noordeen et al. (2000; 2001) no Sri Lanka, ressaltando a resistência que o coccídio tem às condições adversas do meio ambiente (BARTA; THOMPSON, 2006; KING et al., 2008), podendo sobreviver fora do hospedeiro por um longo período de tempo (PAVLOVIC et al., 2010) e infectar animais em qualquer época do ano.

Em épocas de seca, existe escassez de alimentos, sendo um problema maior para animais que são criados em sistemas extensivos sem nenhuma suplementação alimentar (NOORDEEN et al., 2000). Isto de certa forma pode ocasionar estresse (GOMA et al., 2007), além de comprometer a aquisição de nutrientes que entrarão na composição de várias biomoléculas, como proteínas, que irão constituir as imunoglobulinas.

Aliado a isso, durante a seca, os animais passavam mais tempo presos, em maior contato, e em algumas propriedades, os caprinos pastejavam apenas quatro horas por dia, permanecendo o restante do tempo na baia, defecando no cocho e nas instalações, contaminando o ambiente, o que poderia facilitar a transmissão do protozoário.

Na estação chuvosa, os animais das propriedades com sistema de criação semiextensivo e extensivo passam mais tempo pastejando e andando por longas distâncias à procura de alimento, o que faz com que a dispersão de oocistos aconteça em áreas muito amplas, o que pode ter contribuído para a menor ocorrência de infecção observada em propriedades de Quixadá, Ceará, corroborando Goma et al. (2007).

A elevada ocorrência de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. nos rebanhos estudados também foi observado por Noordeen et al. (2000), Geurden et al. (2008) e Wang et al. (2014), que encontraram 96,00%, 60,00% e 71,43% de positividade, respectivamente e está acima da encontrada por Goma et al. (2007), Bomfim et al. (2005) e Delafosse et al. (2006).

Os estabelecimentos rurais que tiveram maior número de cabritos positivos estão na região central de Quixadá. É comum a comercialização de animais em feiras livres na Sede do município, o que pode ter facilitado o transporte de infectados de uma propriedade para outra.

Com relação à idade, em pesquisas realizadas em diferentes partes do mundo, Zorana, Sofija e Sadrižaj (2006), Pavlovic et al. (2010), Domingo et al. (2012) e Rieux et al. (2013), observaram maior frequência de infecção em cabritos com idade abaixo de 47 dias. Para Noordeen et al. (2001), Bomfim et al. (2005), Zorana, Sofija e Sadrižaj (2006), Pavlovic et al. (2010) e Rieux et al. (2013), a FE dos cabritos de até 150 dias de idade é a mais susceptível e que apresenta maior eliminação de oocistos nas fezes.

Na maioria dos casos, durante o período de maior eliminação de oocistos, as fezes apresentam aspecto diarreico (CASTRO-HERMIDA et al., 2005a) e coloração amarelada a marrom-amarelada (MASON; HARTLEY; TILT, 1981; SANTÍN, 2013).

Nenhum cabrito do município de Quixadá com diarreia foi positivo para o protozoário e a FE mais acometida foi de 121 a 180 dias, isso provavelmente ocorreu porque em muitas propriedades os animais eram submetidos a manejos que poderiam causar estresse, como desmame e cobertura.

Cabritos com 301 a 360 dias de idade não foram acometidos pelo protozoário e assim foi observado que a susceptibilidade diminuiu com o avançar da idade, fato este também observado por Bomfim et al. (2005). Isso pode ser explicado pela produção de anticorpos, que apresentam ação duradoura e são capazes de bloquear os esporozoítos, na superfície dos enterócitos, levando a resistência contra a infecção (MOSS et al., 2004, JOHNSON et al., 2004).

Em pesquisas realizadas por Domingo et al. (2012) nas Filipinas e Pam et al. (2013) na Nigéria, também não foi observada diferença estatística significativa entre sexos.

Não foi observada associação entre a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e o aspecto das fezes dos cabritos, o que também foi observado por Goma et al. (2007). Apesar da significância estatística, a coloração das fezes pode não ter uma relação direta com o parasitismo, visto que esse fator é muito influenciado pela alimentação.

Das amostras positivas para o parasito, 50,00% tinham aspecto de cíbalas e 70,00% tinham coloração normal, evidenciando que a ocorrência em cabritos clinicamente assintomáticos pode ser alta, corroborando as observações de

Noordeen et al. (2000), Castro-Hermida; Gonzáles-Warleta; Mezo (2007) e Domingo et al. (2012).

As amostras de fezes dos caprinos jovens de Quixadá, CE, que apresentavam aspecto A1 e A3 não apresentaram positividade diagnóstica para *Cryptosporidium* spp. e poderiam estar com esse aspecto devido à alimentação ou outros agentes infecciosos que não foram pesquisados neste estudo.

Em apenas uma fazenda foi detectado *C. meleagridis*, com amplificação dos genes 18S rRNA, ACT e HSP 70. Os oocistos desse protozoário provavelmente foram excretados no ambiente pelas aves criadas na propriedade e posteriormente ingeridos pelos cabritos que eliminaram os mesmos.

Como não existem estudos que evidenciem a infecção por essa espécie em caprinos, não é possível afirmar que o coccídio esteja infectando esses ruminantes, que podem apenas estar carreando os oocistos. Este achado sugere que galinhas podem ser parasitadas por *C. meleagridis* e ser potenciais fontes de infecção para as pessoas do local, como também observado por Silverlås et al. (2012).

Espécies do parasito que comumente não são descritas em caprinos também foram detectadas por Koinari, Lymbery e Ryan (2014), como *Cryptosporidium* genótipo rato II em propriedades com agricultura familiar na Papua-Nova Guiné. Isso demonstra a possibilidade que os caprinos têm de atuarem como carreadores do parasito, eliminando no pasto os oocistos que irão infectar outras espécies animais que são hospedeiras das espécies do protozoário em questão, como o *C. meleagridis* encontrado na P4.

Infecção mista por *C. ubiquitum* e *C. xiaoi* foi observada em uma propriedade que não possuía criação de ovinos nem de bovinos. O protozoário *C. ubiquitum*, anteriormente classificado como genótipo de cervídeos, possui uma ampla variedade de hospedeiros e tem sido descrito infectando caprinos, ovinos, humanos e roedores, em diferentes regiões do mundo, sendo considerado um patógeno zoonótico emergente (FAYER; SANTÍN; MACARISIN, 2010; LI et al., 2014; PARAUD et al., 2014).

No Brasil, a infecção por *C. ubiquitum* em pequenos ruminantes havia sido demonstrada em ovinos do Rio de Janeiro (FIUZA et al., 2011) e de São Paulo (PAZ

E SILVA et al., 2014), sendo esta a primeira descrição de isolamento do parasito de fezes de caprinos.

A primeira descrição do parasito com características de *C. xiaoi* infectando pequenos ruminantes foi em 1974, em estudo realizado por Barker e Carbonell em ovinos, na ocasião o coccídeo foi denominado de *Cryptosporidium agni* e possuía características morfológicas semelhantes à *Cryptosporidium bovis* e *Cryptosporidium wrairi*.

Essa espécie de parasito, além de ser denominada de *C. agni*, já foi identificada também por *C. bovis* – genótipo like, em trabalhos de Feng et al. (2007) e Karanis et al. (2007), tendo como hospedeiros naturais iaques, uma espécie de bovinos de pelo longo, e caprinos, respectivamente.

Porém a identificação da espécie como *C. xiaoi* ocorreu em 2009 por meio de estudos morfológicos e moleculares com ovinos realizados por Fayer e Santín. Na ocasião, ao ser inoculado em cabritos não foi evidenciada infecção, gerando dúvida em relação à possibilidade de caprinos serem hospedeiros dessa espécie de parasito.

Porém em pesquisas realizadas por Díaz et al. (2010) e Rieux et al. (2013), *C. xiaoi* foi identificado em fezes de cabritos com diarreia e também foi descrito infectando caprinos assintomáticos de estabelecimentos rurais com agricultura familiar na Papua-Nova Guiné (KOINARI; LYMBERY; RYAN, 2014). No presente estudo, essa espécie de parasito foi encontrada em três propriedades (P2, P11 e P23) de Quixadá, CE em que não possuía criação de ovinos e apenas uma delas (P23) havia bovinos.

Com base nas observações deste estudo e de outros autores, sugere-se que possivelmente os caprinos possam mesmo ser hospedeiros de *C. xiaoi*. Este estudo em Quixadá, Ceará, é o primeiro que descreve a infecção por essa espécie de coccídeo em caprinos no Brasil.

A similaridade de 99% de *C. xiaoi* com a sequência original de Fayer e Santín (2009) isolado de ovino (GenBank® FJ896041), encontrada na amostra da P23 em análise com o gene HSP 70, ocorreu porque existe uma substituição do nucleotídeo A para G na posição 174.

*C. xiaoi* foi a espécie predominante em caprinos e responsável por 75,00% da infecção observada nas propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, diferentemente do observado por Wang et al. (2014) na China, onde a mais observada foi *C. ubiquitum*.

Os manejos nutricionais, reprodutivos e sanitários, bem como os demais aspectos avaliados na caracterização das propriedades, não representaram fator de risco para a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em animais do município de Quixadá, Ceará, discordando dos resultados encontrados por Bomfim et al. (2005), nas quais as condições higiênicas das instalações e o tipo delas representaram fator de risco para ocorrência da infecção.

A criação de outras espécies animais além de caprinos, bem como o manejo de cabritos recém-nascidos, a limpeza das instalações e o acesso dos animais as fontes de água não representaram fatores de risco para a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp., fato este também observado em estudos realizados por Bomfim et al. (2005), Delafosse et al. (2006) e Domingo et al. (2012).

## 7. CONCLUSÕES

A ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos jovens do município de Quixadá, Ceará, foi baixa, porém a alta frequência encontrada nos rebanhos estudados revela que o parasito encontra-se disseminado no município.

A maior ocorrência observada no período seco demonstra a capacidade que o parasito tem de resistir às condições adversas do ambiente.

Com a distribuição espacial foi possível observar que os distritos Tapuiará e Sede, foram os que apresentaram maior número de animais que tiveram amplificação do DNA do protozoário nas fezes, podendo-se concluir que a maior ocorrência foi evidenciada na região central do município estudado.

Por meio do sequenciamento foi possível identificar que as espécies do coccídio detectadas nas fezes dos cabritos em propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, Brasil, foram *C. xiaoi*, *C. ubiquitum* e *C. meleagridis*.

Os manejos nutricionais, reprodutivos e sanitários adotados pelos caprinocultores do estudo, bem como as características das propriedades, não representaram fatores de risco para os cabritos do município de Quixadá, Ceará, Brasil, serem acometidos pelo protozoário.

## 8. REFERÊNCIAS

ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 64, n. 2, p.165-168, 2002.

ARAÚJO, A. J. U. S.; KANAMURA, H. Y.; ALMEIDA, M. E.; GOMES, A. H. S.; PINTO, T. H. L.; DA SILVA, A. J. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 139-143, 2008.

ARROWOOD, M. J.; STERLING, C. R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 7, p. 1490-1495, 1989.

AYANA, D.; TILAHUN, G.; WOSSENE, A. Study on *Eimeria* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats at ELFORA export abattoir, Debre-zeit, Ethiopia. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 33, n. 5, p. 367-371, 2009.

AYINMODE, A. B.; FAGBEMI, B. O.; XIAO, L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in children in Oyo State, Nigeria: implications for infection sources. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 110, n. 1, p. 479-481, 2012.

BARKER, I. K.; CARBONELL, P. L. *Cryptosporidium agni* sp.n. from lambs, and *Cryptosporidium bovis* sp.n. from a calf, with observations on the oocyst. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Jena, v. 44, n. 4, p. 289-298, 1974.

BARTA, J. R.; THOMPSON, R. C. A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006.

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**, Cambridge, v. 92, p. 317-323, 1984.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K.; JOACHIM, A.; KNOBLOCH, J.; ZELCK, U. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Philadelphia, v. 43, n. 4, p. 283–288, 2002.

BOMFIM, T. C. B.; HUBER, F.; GOMES, R. S.; ALVES, L. L. Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy goats, associated with possible risk factors of the studied properties. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.134, n.1-2, p. 9-13, 2005.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; VERGARA-PARENTE, J. E.; FAUSTINO, M. A. G.; MACHADO, E. C. L. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. infection in antillean manatee (*Trichechus manatus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 60-61, 2009.

BOUZID, M.; STEVERDING, D.; TYLER, K. M. Detection and surveillance of water-borne protozoan parasites. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 302-306, 2008.

BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L.; ALCARAZ, A. **Parasitologia veterinária de Georgis**. Barueri: Manole, 2006. 422 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 8. ed. Brasília, 2010. 444 p. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas\\_infecciosas\\_parasitaria\\_guiaboiso.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guiaboiso.pdf)>. Acesso em: 31 out. 2010.

BRESCIANI, K. D. S.; AMARANTE, A. F. T.; LIMA, V. M. F.; MARCONDES, M.; FEITOSA, F. L. F.; TÁPARO, C. V.; SERRANO, A. C. M.; ISHIZAKI, M. N.; TOME, R. O.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V. Infecções por *Cryptosporidium* spp. em cães

de Araçatuba, SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 466-468, 2008.

CACCIÒ, S. M.; SANNELLA, A. R.; MARIANO, V.; VALENTINI, S.; BERTI, F.; TOSINI, F.; POZIO, E. A rare *Cryptosporidium parvum* genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, p. 128-131, 2013.

CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.

CACCIÒ, S.M.; PINTER, E.; FANTINI, R.; MEZZAROMA, I.; POZIO, E. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 1, p. 85-86, 2002.

CARDONA, G. A.; CARABIN, H.; GOÑI, P.; ARRIOLA, L.; ROBINSON, G.; FERNÁNDEZ-CRESPO, J. C.; CLAVEL, A.; CHALMERS, R. M.; CARMENA, D. Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 412-413, p. 101-108, 2011.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, London, v. 38, n. 4, p. 818-862, 2004.

CARVALHO, T. T. R. Estado atual do conhecimento de *Giardia* e *Cryptosporidium*. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 38, p. 1-16, 2008.

CASEMORE, D. P. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 44, n. 6, p. 445-451, 1991.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; DELAFOSSE, A.; PORS, I.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. **Veterinary Record**, v. 157, p. 623-627, 2005a.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; GONZÁLES-WARLETA, M.; MEZO, M. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galicia (NW Spain). **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 72, p. 96-100, 2007.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; PORS, I.; POUPIN, B.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* in goat kids in western France. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 259-264, 2005b.

CAUSAPÉ, A. C.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E.; LÓPEZ-BERNAD, F. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 104, p. 475-486, 2002.

CAVALCANTE, A. C. R.; NEIVA, J. N. M.; CÂNDIDO, M. J. D.; VIEIRA, L. S. **Produção de ovinos e caprinos de corte em pastos cultivados sob manejo rotacionado**. Sobral: Embrapa: CNPCO, 2005. 16 p. (Embrapa-CNPCO. Circular Técnica, 31).

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **EpiInfo™**. Disponível em: <<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/7/index.htm>>. Acesso em: 03 fev. 2014.

COELHO, W. M. D. **Detecção molecular e subtipagem de *Cryptosporidium* spp. em caprinos, ovinos, bovinos, leitões e equinos jovens**. 2011. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

COSENDEY, R. I. J.; FIUZA, V. R. S.; OLIVEIRA, F. C. R. Importância do manejo na criptosporidiose em criações de ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, supl. 1, p. 209-214, 2008.

CUMMINS, E.; KENNEDY, R.; CORMICAN, M. Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* in tap water in Ireland. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 4, p. 740-753, 2010.

DE GRAAF, D.C.; VANOPDENBOSH, E.; ORTEGA-MORA, L.M.; ABBASSI, H.; PEETERS, J. E. A review of the cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, London, v. 29, n. 8, p. 1269-1287, 1999.

DELAFOSSÉ, A.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; BAUDRY, C.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. Herd-level risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy-goat kids in western France. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 77, n. 1-2, p. 109-121, 2006.

DIAS, G. M. F.; BEVILACQUA, P. D.; BASTOS, R. K. X.; OLIVEIRA, A. A.; CAMPOS, G. M. M. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 6, p. 1291-1300, 2008.

DÍAZ, P.; QUÍLEZ, J.; ROBINSON, G.; CHALMERS, R. M.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. Identification of *Cryptosporidium xiaoi* in diarrhoeic goat kids (*Capra hircus*) in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 172, n. 1-2, p. 132-134, 2010.

DOMINGO, C. Y. J.; DIONISION, R. D. C. A.; LANZANIDA, G. C.; CORALES, R. M. I. Human and caprine cryptosporidiosis among smallhold farms in Aurora province, Philippines. **Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Laguna, v. 38, n. 1, p. 53-62, 2012.

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

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

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

FAYER, R.; GUIDRY, A.; BLAGBURN, B. L. Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulin from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 58, n. 9, p. 2962-2965, 1990.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, London, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

FAYER, R.; PERRYMAN, L. E.; RIGGS, M. W. Hyperimmune bovine colostrums neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst challenge. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 75, n. 1, p. 151–153, 1989.

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 164, n. 2-4, p. 192-200, 2009.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 172, n. 1-2, p. 23-32, 2010.

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

FENG, Y.; ALDERISIO, K. A.; YANG, W.; BLANCERO, L. A.; KUHNE, W. G.; NADARESKI, C. A.; REID, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 20, p. 6475–6483, 2007.

FÉRES, F. C.; LOMBARDI, A. L.; CARVALHO, M. P. P.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; CADIOLI, F. A.; MEIRELES, M. V.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, F. L. F. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 1002-1005, 2009.

FIUZA, V. R. S.; COSENDEY, R. I. J.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SANTÍN, M.; FAYER, R.; OLIVEIRA, F. C. R. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, n. 3-4, p. 360-362, 2011.

FOREYT, W. J. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Maryland Heights, v. 6, n. 3, p. 655-670, 1990.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 2004. p. 114-115.

FRANCO, R. M. B.; Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. Waterborne protozoa: relevance in public health. **Revista Panamericana de Infectologia**, Córdoba, v. 9, n. 1, p. 36-43, 2007.

FUCEME. Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. **Séries históricas:** pluviometria anual (mm). Disponível em: <[http://www.funceme.br/produtos/script/chuvas/Download\\_de\\_series\\_historicas/downloadHistoricos/postos/121.txt](http://www.funceme.br/produtos/script/chuvas/Download_de_series_historicas/downloadHistoricos/postos/121.txt)>. Acesso em: 13 jan. 2014.

FUJINO, T.; MATSUI, T.; KOBAYASHI, F.; HARUKI, K.; YOSHINO, Y.; KAJIMA, J.; TSUJI, M. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Schaumburg, v. 64, n. 3, p. 199-200, 2002.

GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D. A.; BREWER, T. C.; SHIMIZU, R. Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 18, n. 1, p. 185-90, 1983.

GEURDEN, T.; THOMAS, P.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 1-2, p. 142-145, 2008.

GILES, M.; CHALMERS, R.M.; PRICHARD, G.; ELWIN, K.; MUELLER-DOBLIES, D.; CLIFTON-HADLEY, F.A. *Cryptosporidium hominis* in a goat and sheep in the UK. **Veterinary Record**, London, v. 164, n. 1, p. 24-25, 2009.

GOMA, F. Y.; GEURDEN, T.; SIWILA, J.; PHIRI, I. G. K.; GABRIEL, S.; CLAEREBOUT, E.; VERCRUYSSSE, J. The prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in small ruminants in Zambia. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 77-80, 2007.

GREENBERG, P. D.; CELLO, J. P. Treatment of severe diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* with oral bovine immunoglobulin concentrate in patients with AIDS. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, Philadelphia, v. 13, n. 4, p. 348-354, 1996.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, n. 41, p. 95-98, 1999.

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

HUBER, F.; BOMFIM, T.C.; GOMES, R.S. Comparação da eficiência da coloração pelo método da safranina a quente e da técnica de centrífugo-flutuação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivo de rebanho caprino em Quixadá, Ceará.** Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=24&i=P>>. Acesso em: 01 jun. 2011.

INÁCIO, S. V.; BRITO, R. L. L.; ZUCATTTO, A. S.; COELHO, W. M. D.; AQUINO, M. C. C.; AGUIRRE, A. A. R.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. Cryptosporidiosis in mares and foals of the northwest region of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 355-358, 2012.

JOHNSON, J. K.; SCHMIDT, J.; GELBERG, H. B.; KUHLENSCHMIDT, M. S. Microbial adhesion of *Cryptosporidium parvum* sporozoites: purification of an inhibitory lipid from bovine mucosa. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 5, p. 980-990, 2004.

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

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Water-borne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, London, v. 5, n. 1 p. 1-38, 2007.

KARANIS, P.; PLUTZER, J.; HALIM, N. A.; IGORI, K.; NAGASAWA, H.; ONGERTH, J.; LIQING, M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 101, n. 6, p. 1575-1580, 2007.

KING, B. J.; HOEFEL, D.; DAMINATO, D. P.; FANOK, S.; MONIS, P. T. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 104, n. 5, p. 1311-1323, 2008.

KOINARI, M.; LYMBERY, A. J.; RYAN, U. M. *Cryptosporidium* species in sheep and goats from Papua New Guinea. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 141, p. 134-137, 2014.

KOUDELA, B.; JIRÍ, V. Experimental cryptosporidiosis in kids. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 4, p. 273-281, 1997.

LANGHOUT, M. Z.; REED, P.; FOX, M. Validation of multiple diagnostic techniques to detect *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in free-ranging western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) and observations on the prevalence of these protozoan infections in two populations in Gabon. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 41, n. 2, p. 210–217, 2010.

LEVINE, N. D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 66, n. 5, p. 830–834, 1980.

LI, N.; XIAO, L.; ALDERISIO, K.; ELWIN, K.; CEBELINSKI, E.; CHALMERS, R.; SANTIN, M.; FAYER, R.; KVAC, M.; RYAN, U.; SAK, B.; STANKO, M.; GUO, Y.; WANG, L.; ZHANG, L.; CAI, J.; ROELLIG, D.; FENG, Y. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, n. 2, p. 217–224, 2014.

MAC KENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 331, n. 3, p. 161-167, 1994.

MAGI, B.; CANOCCHI, V.; TORDINI, G.; CELLESI, C.; BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**, Secaucus, v. 98, n. 2, p. 150–152, 2006.

MAJEWSKA, A. C.; WERNER, A.; SULIMA, P.; LUTY, T. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 89, n. 4, p. 269–275, 2000.

MARCIAL, M. A.; MADARA, J. L. *Cryptosporidium*: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells. **Gastroenterology**, Maryland Heights, v. 90, n. 3, p. 583-594, 1986.

MASON, R. W.; HARTLEY, W. J.; TILT, L. Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. **The Journal of the Australian Veterinary Association**, Chichester, v. 57, n. 8, p. 386-388, 1981.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F.; GENNARI, S. M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 166-170, 2007.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infectious, Genetic and Evolution**, Madison, v. 3, n. 4, p. 233-244, 2003.

MORGAN, U. M.; MONIS, P. T.; XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.; O'DONOGHUE, P.; GASSER, R.; MURRAY, A.; FAYER, R.; BLAGBURN, B. L.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. Molecular and phylogenetic characterisation of *Crptosporidium* from birds. **International Journal for Parasitology**, London, v. 31, n. 3, p. 289-296, 2001.

MOSS, D. M.; MONTGOMERY, J. M.; NEWLAND, S. V.; PRIEST, J. W.; LAMMIE, P. J. Detection of *Cryptosporidium* antibodies in sera and oral fluids using multiplex bead assay. **The Journal of Parasitology**, London, v. 90, n. 2, p. 397-404, 2004.

NAKAMURA, A. A.; SIMÕES, D. C.; ANTUNES, R. G.; SILVA, D. C.; MEIRELES, M. V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 1-2, p. 47-51, 2009.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **BLAST<sup>®</sup> – Basic Local Alignment Search Tool** (Standard Nucleotide BLAST). Disponível em: <[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)>. Acesso em: 03 abr. 2014a.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **GenBank**<sup>®</sup>. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 03 abr. 2014b.

NOORDEEN, F.; FAIZAL, A. C. M.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; HORADAGODA, N. U.; ARULKANTHAN, A. Excretion of *Cryptosporidium* oocysts by goats in relation to age and season in the dry zone of Sri Lanka. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 79-85, 2001.

NOORDEEN, F.; HORADAGODA, N. U.; FAIZAL, A. C. M.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; RAZAK, M. A. A.; ARULKANTHAN, A. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* isolated from asymptomatic adult goats to mice and goats kids. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 217-225, 2002.

NOORDEEN, F.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; FAIZAL, A. C. M.; HORADAGODA, N. U.; ARULKANTHAN, A. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats in selected locations in three agroclimatic zones of Sri Lanka. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 93, p. 95-101, 2000.

NOORDEEN, F.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; HORADAGODA, N. U.; ABDUL-CAREEM, M. F. *Cryptosporidium*, an important enteric pathogen in goats-A review. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 106, n. 2-3, p. 77-82, 2012.

OLSON, M. E.; THORLAKSON, C. L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D. W.; MCALLISTER, T. A. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 68, n. 4, p. 375-381, 1997.

PAM, V. A.; DAKUL, D. A.; KARSHIMA, N. S.; BATA, S. I.; OGBU, K. I.; DANIEL, L. N.; UDOKANINYENE, A. D.; KEMZA, S. Y.; IGEH, C. P.; HASSAN, A. A. Survey of *Cryptosporidium* species among ruminants in Jos, Plateau State, North-Central Nigeria. **Journal of Veterinary Advances**, Uromia, v. 3, n. 2, p. 49-54, 2013.

PARAUD, C.; CHARTIER, C. Cryptosporidiosis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 93-97, 2012.

PARAUD, C.; PORS, I.; RIEUX, A.; BRUNET, S. High excretion of *Cryptosporidium ubiquitum* by peri-parturient goats in one flock in western France. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 202, n. 3-4, p. 301-304, 2014.

PAVLOVIC, I.; IVANOVIC, S.; ŽUJOVIC, M.; TOMIC, Z. Goat cryptosporidiosis and its importance at goat production pathology. **Biotechnology in Animal Husbandry**, Zemum, v. 26, n. 3-4, p. 187-192, 2010.

PAZ E SILVA, F. M.; LOPES, R. S.; ARAÚJO-JUNIOR, J. P. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 22-28, 2013.

PAZ E SILVA, F. M.; LOPES, R. S.; BRESCIANI, K. D. S.; AMARANTE, A. F. T.; ARAUJO JÚNIOR, J. P. High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. **Acta Parasitologica**, Warsaw, v. 59, n. 1, p. 193-196, 2014.

PENG, M. M.; WILSON, M. L.; HOLLAND, R. E.; MESHNICK, S. R.; LAL, A. A.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 90, n. 3, p. 175-180, 2003.

PINHEIRO, R. R.; CHAGAS, A. C. S.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F. **Viroses de pequenos ruminantes**. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2003. 30 p. (Série Documentos, 46).

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000.

PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAUJO, S. C.; ANDRIOLI, A. Desenvolvimento de Dot-blot para detecção de anticorpos para o Vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 101, n. 557-558, p. 51-56, 2006.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 3-4, p. 187-199, 2009.

PUGH, D. C. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. 513 p.

QUÍLEZ, J.; TORRES, E.; CHALMERS, R.M.; HADFIELD, S.J.; DEL CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Genotype and subtype characterization of *Cryptosporidium*

in lambs and goat kids in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 19, p. 6026-6031, 2008.

RIBEIRO, E. L. A.; RIBEIRO, H. J. S. S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 229-235, 2001.

RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S. V. D.; PEREIRA FILHO, J. M.; AZEVEDO, S. S. A.; MELO, D. B.; BATISTA, J. A.; MIRANDA NETO, E. G.; RIET-CORREA, F. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido paraibano: caracterização, principais limitantes e avaliação de estratégias de intervenção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 345-352, 2013.

RIEUX, A.; PARAUD, C.; PORS, I.; CHARTIER, C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned kids in a dairy goat farm in western France. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, n. 1-3, p. 268-272, 2013.

ROBERTSON, L. J. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 137, n. 7, p. 913-921, 2009.

SANFORD, S. E.; JOSEPHSON, G. K. A.; REHMTULLA, A. J.; BAKER, K. C. Cryptosporidiosis, rotaviral, and combined cryptosporidia and rotaviral infections in goat kids. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 32, n. 10, p. 626, 1991.

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

SARI, B.; ARSLAN, M. O.; GICIK, Y.; KARA, M.; TASCI, G. T. The prevalence of *Cryptosporidium* species in diarrhoeic lambs in Kars province and potential risk factors. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 41, n. 5, p. 819-826, 2009.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative". **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest

fragments in Teodoro Sampaio municipality, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 249-253, 2010.

SILVA, G. A.; SOUZA, B. B.; ALFARO, C. E. P.; AZEVEDO, S. A.; NETO, J. A.; SILVA, E. M. N.; SILVA, A. K. B. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semiárido Paraibano. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 7-14, 2005.

SILVA, M. B. O. Caracterização genética de *Cryptosporidium parvum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 20-22, 2004.

SILVA, M. B. O. Criptosporidiose. In: CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, A. B. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 171-192.

SILVA, M. B. O.; LIMA, J. D.; VIEIRA, L. S.; VITOR, R. W. A. Experimental cryptosporidiosis by *Cryptosporidium parvum* in dairy goats kids. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 150, n. 10, p. 827-830, 1999.

SILVERLÅS, C.; MATTSSON, J. G.; INSULANDER, M.; LEBBAD, M. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. **International Journal for Parasitology**, London, v. 42, n. 11, p. 963-967, 2012.

ŠLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology**, London, v. 43, p. 957-970, 2013.

SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, London, v. 30, n. 12-13, p.1379-1393, 2000.

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

SOLTANE, R.; GUYOT, K.; DEI-CAS, E.; AYADI, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in seven species of farm animals of Tunisia. **Parasite**, Les Ulis, v. 14, n. 4, p. 335-338, 2007.

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

TEIXEIRA, W. F. P.; COELHO, W. M. D.; SOUTELLO, R. V. G.; OLIVEIRA, F. P.; HOMEM, C. G.; NUNES, C. M.; MEIRELES, M. V. Diagnóstico de criptosporidiose em amostras fecais de bezerros por imunofluorescência direta e microscopia de contraste de fase. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1057-1062, 2011.

TEMBUE, A. A. M.; ALVES, L. C.; BORGES, J. C. G.; FAUSTINO, M. A. G.; MACHADO, E. L. C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ovinos no município de Ibimirim, Estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 9, n. 1, p. 41-43, 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal Parasitology**, London, v. 30, n. 12-13, p. 1259-1267, 2000.

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

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Experimental Biology and Medicine**, London, v. 5, n. 1, p. 12-13, 1907.

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, Boston, v. 23, n. 3, p. 487-509, 1910.

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

TZIPORI, S.; GRIFFITHS, J. K. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. **Advances in Parasitology**, Maryland Heights, v. 40, n. 5, p. 4-36, 1998.

VENTURINI, L.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; UNZAGA, J. M.; VENTURINI, M. C.; MORÉ, G. *Cryptosporidium parvum* em animais domésticos y em monos de un zoológico. **Parasitología Latinoamericana**, Santiago de Chile, v. 61, n. 1-2, p. 90-93, 2006.

VIANA, C. M. P.; SOUSA, F. J.; LIMA, K. A.; NASCIMENTO, M. M. S. **Perfil Básico Municipal-Quixadá**. Fortaleza: Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará (IPECE). Gerência de Estatística Geografia e Informação (GEGIN), 2009. 17 p.

VIEIRA, L. S. **Surto e criptosporidiose em caprinos lactentes**. Sobral: Embrapa/CNPACO, 1998. 2 p. (Comunicado Técnico, 45).

VIEIRA, L. S.; SILVA, M. B. O.; TOLENTINO, A. C. V.; LIMA, J. D.; SILVA, A. C. Outbreak of cryptosporidiosis in dairy goats in Brazil. **The Veterinary Record**, London, v. 140, n. 6, p. 427-428, 1997.

WANG, R.; LI, G.; CUI, B.; HUANG, J.; CUI, Z.; ZHANG, S.; DONG, H.; YUE, D.; ZHANG, L.; NING, C.; WANG, M. Prevalence, molecular characterization and zoonotic potential of *Cryptosporidium* spp. in goats in Henan and Chongqing, China. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 142, p. 11-16, 2014.

WEISEL, T.; DITTRICH, S.; MÖHL, I.; ADUSU, E.; JELINEK, T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. **Clinical Microbiology and Infection**, Chichester, v. 12, n. 7, p. 656-659, 2006.

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

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, London, v. 38, n. 11, p. 1239–1255, 2008.

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

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

XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. C.; LAL, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5499-5502, 2000.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 930 p.

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

ZORANA, M.; SOFIJA, K.; SADRIŽAJ, K, Z. *Cryptosporidium* infection in lambs and goats kids in Serbia. **Acta Veterinaria**, Belgrade, v. 56, n. 1, p. 49-54, 2006.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA**

**Medicina Veterinária Preventiva**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Declaro, por meio deste termo, que concordei em ser entrevistado e participar da pesquisa de campo referente ao projeto de pesquisa intitulado "Fatores de risco para ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em cabritos". Que tem como objetivo determinar a ocorrência, fatores de risco e a caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em caprinos de propriedades rurais do município de Quixadá, Ceará, desenvolvido pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista-"Júlio de Mesquita Filho" e faz parte do projeto de tese da aluna Roberta Lomonte Lemos de Brito. Fui informado(a), que a pesquisa é coordenada pelos Doutores: Katia Denise Saraiva Bresciani, Marcelo Vasconcelos Meireles e Luiz da Silva Vieira, a quem poderei consultar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone nº (88) 31127572. Afirmando que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Fui informado(a) dos objetivos estritamente acadêmicos do estudo. Minha colaboração se fará de forma anônima, por meio de entrevista onde fornecerei informações sobre a minha propriedade rural, e permitirei a realização de exames de fezes e coleta de sangue de caprinos, ovinos e outras espécies animais (caso haja contato com os caprinos) da propriedade. O acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelos pesquisadores. Além disso, será mantido o caráter confidencial das informações fornecidas ao entrevistador. Estou ciente de que, caso eu tenha dúvida ou me sinta prejudicado, poderei contatar os pesquisadores responsáveis ou seus orientados. Os pesquisadores do projeto me ofertaram uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Fui ainda informado(a) de que posso me retirar desse(a) projeto de pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo para meu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Nome do participante: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Propriedade: \_\_\_\_\_

Localização: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do proprietário

Eu, Roberta Lomonte Lemos de Brito declaro que forneci ao participante todas as informações referentes ao meu projeto de doutorado.

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## APÊNDICE B



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA  
Medicina Veterinária Preventiva

## QUESTIONÁRIO DO PROJETO

OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM CAPRINOS JOVENS (N°  
processo na FAPESP: 2011/50049-0)

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## CARACTERÍSTICAS GERAIS DO PRODUTOR E DA PROPRIEDADE

Propriedade (Código de Identificação): \_\_\_\_\_

Localidade/Distrito/Município: \_\_\_\_\_

## GPS:

LOCAIS	LATITUDE SUL	LONGITUDE OESTE
Casa do produtor		
Estábulo 1		
Pasto 1		
Açude		
Fonte de água		

**1 - Informações gerais**

01. Nome do Entrevistado: \_\_\_\_\_

02. Entrevistado é: ( ) proprietário ( ) filho(a) ( ) Cônjuge do proprietário

03. Sexo: ( ) M ( ) F

04. Telefone: \_\_\_\_\_

05. Distância da propriedade a sede do município (Km): \_\_\_\_\_

06. Tamanho da propriedade (ha): \_\_\_\_\_

07. N° de pessoas que vivem na mesma residência: \_\_\_\_\_

08. Nível de escolaridade do produtor:

( ) Analfabeto

( ) Alfabetizado

( ) Primeiro grau incompleto

( ) Primeiro grau completo

( ) Segundo grau incompleto

( ) Segundo grau completo

( ) Técnico de nível médio (agrícola, contabilidade, etc..) ( ) Curso superior

## 2 - Informações gerais da produção agrícola e pecuária

09. Animais criados na propriedade (Rebanho atual)

Animais	Quantidade
Bodes reprodutores	
Cabras matrizes	
Cabritos (as) acima de 8 meses	
Cabritos (as) até 8 meses	
Carneiros reprodutores (cabeças)	
Ovelhas matrizes(cabeças)	
Borregos (as) acima de 8 meses	
Borregos (as) até 8 meses	
Touros	
Vacas	
Garrotes. Novilhas e bezerros	
Eqüídeos de tração, eqüinos, muares e asininos	
Suínos	
Aves (galinhas, capotes, perus, patos, etc.)	
Outros	

## 3 - Informações sobre a infra-estrutura da propriedade

10. Benfeitorias e instalações

Item	Sim	Não	Quantidade
Casa			
Banheiro			
Fossa			
Galpão			
Aprisco			
Sala de ordenha para cabra			
Sala de abate			
Estábulo para gado			
Curral e/ou brete			
Cisterna			
Açude e/ou barreiro			
Poço			
Silo			
Energia elétrica			
Sistema de irrigação p/ capineira e/ou pasto			
Capineira (em hectare)			
Área de pastagem (em hectare)			
Cercas internas e externas			

## 4 - Informações sobre o sistema de produção de Caprinos

11. Há quanto tempo cria caprinos? \_\_\_\_\_

12. Qual o motivo de criar caprinos? \_\_\_\_\_

13. Na maior parte do ano qual tipo de sistema adota?

( ) Intensivo (altamente tecnificado, animais presos o tempo todo, pastejo rotacionado...)

( ) Semi-intensivo (alguma tecnificação, algumas medidas de manejo alimentar, sanitário e reprodutivo...)

( ) Extensivo (não faz nenhuma anotação do rebanho, não adota nenhuma medida de manejo, animais totalmente soltos...)

14. Faz alguma identificação dos animais do rebanho? (Múltipla escolha).

[( )] Nenhuma

[( )] Utiliza brincos numerados: \_\_\_\_\_

[( )] Marca a orelha: \_\_\_\_\_

[( )] Ferra os animais: \_\_\_\_\_

[( )] Colar (numerado e/ou colorido): \_\_\_\_\_

[( )] Outras (descreva): \_\_\_\_\_

15. Faz alguma anotação em relação ao rebanho? (Múltipla escolha).

[( )] Nenhuma

[( )] Reprodução (descreva): \_\_\_\_\_

[( )] Produção (descreva): \_\_\_\_\_

[( )] Numero de animais (descreva): \_\_\_\_\_

[( )] Nascimentos (descreva): \_\_\_\_\_

[( )] Contas (descreva): \_\_\_\_\_

[( )] Outras (descreva): \_\_\_\_\_

16. Realiza controle contábil (entradas e saídas) das atividades da propriedade?

( ) Não ( ) Sim

17. Participou de alguma capacitação neste ano sobre caprinocultura? (Múltipla escolha).

( ) Não ( ) Sim, qual?

[( )] Cursos [( )] Palestra [( )] Dia de Campo

[( )] Outro (especificar) \_\_\_\_\_

Que tema que foi abordado? \_\_\_\_\_

18. a) O que achou de interessante? \_\_\_\_\_

b) Aplicou algum conhecimento? ( ) Não ( ) Sim

c) Fez alguma diferença? ( ) Não ( ) Sim

19. Utiliza assistência técnica? ( ) Não ( ) Sim. Qual(is) instituição(ões) e a frequência?

\_\_\_\_\_

20. Entrega leite para o programa governamental? ( ) Não ( ) Sim

21. Qual a produção média de leite por dia? \_\_\_\_\_

22. Além do leite, existe outra fonte de renda com a caprinocultura, assinalar as opções a seguir: (Múltipla escolha)

- Venda de cabritas de recria  Venda de matrizes  Venda de reprodutores  
 Venda de cabrito pós desmame para abate  Venda de esterco  
 Venda de derivados do leite feito na própria propriedade, queijos, doces, iogurtes etc.

23. Quais as raças de caprinos existentes na propriedade? (Múltipla escolha)

- Sem Raça Definida  Anglo-nubiana  Saanen  
 Boer  Moxotó  Canindé  
 Alpinas  Toggenburg  
 Cruzadas/ mestiças (descreva as raças):  
 Outra raça (citar):

24. Quais os métodos de cobertura ou práticas reprodutivas adotam? (Múltipla escolha)

- a.  Inseminação artificial  
b.  Monta natural controlada  
c.  Monta natural não controlada  
d.  Combinadas (descrever) \_\_\_\_\_  
e.  Nenhuma

25. De onde vem a maioria dos reprodutores e matrizes? Escolha as alternativas e estabeleça a ordem de importância (1,2,3 ...), dentre as escolhidas.

- Compra sêmen de empresas comerciais  
 Compra em exposição  
 Adquire de outros rebanhos conhecidos/vizinhos  
 Adquire nas feiras de outros rebanhos desconhecidos  
 Do próprio rebanho  
 Outros (descreva) \_\_\_\_\_

26. Quais as razões de descartes anuais de animais? Escolha as alternativas e estabeleça a ordem de importância (1, 2, 3 ...), dentre as escolhidas. (Múltipla escolha).

- Idade  
 Defeitos (Queixo alongado, ausência de maxilar, testículo muito pequeno...)  
 Não pare pelo menos uma vez por ano  
 Pare mas não cria pelo menos um vez por ano  
 Animal problemático (pula cerca, ladrão)  
 Por outras razões (especificar) \_\_\_\_\_

27. Separa as matrizes caprinas do restante do rebanho antes de parir?

- Não  Sim

28. Quais os cuidados que toma quando nasce cabrito?

- a) Nenhum  b) Corte e desinfecção do umbigo

c) Deixa-o para mamar na mãe logo após o nascimento, após quanto tempo são separadas das matrizes? \_\_\_\_\_

d) Outros (citar): \_\_\_\_\_

29. a) Quanto tempo (dias) depois, as crias são soltas com as matrizes? \_\_\_\_\_

b) Nesse período tem contato com outras espécies animais? ( ) Não ( ) Sim. Qual (is)? \_\_\_\_\_

30. O aleitamento das crias é natural (quando mama direto da cabra) ou artificial (quando leite é oferecido em mamadeira)?

( ) natural ( ) artificial

31. Quando é natural o cabrito mama em que horário?

( ) Em tempo integral durante os primeiros dias, até quantos dias \_\_\_\_\_

( ) Somente de dia quando ficam com as mães e são separadas a noite

( ) Somente a noite quando pernoitam com as mães

( ) Outra forma \_\_\_\_\_

32. Quando é artificial, o que é oferecido:

( ) leite de cabra ( ) leite de vaca ( ) Sucedâneo

E quantas vezes por dia: \_\_\_\_\_

33. A cada 10 cabritos nascidos, quantos morrem ao nascer? \_\_\_\_\_ e ao desmame? \_\_\_\_\_

34. Qual é a idade do desmame? \_\_\_\_\_

35. Castra os cabritos machos?

( ) Não, porque? \_\_\_\_\_

( ) Sim, em que idade?

a) Aos dois meses de idade

b) Aos três meses de idade

c) Aos quatro meses de idade

d) Aos cinco meses de idade

e) Outro (descreva)

36. Os animais pastejam em área de caatinga por quanto tempo? \_\_\_\_\_

37. Fornece volumoso ao rebanho no cocho?

( ) Não ( ) Sim. Em qual período do ano? \_\_\_\_\_

38. Qual tipo de volumoso é fornecido?

Volumoso	Área (ha)

39. Fornece concentrados aos caprinos? ( ) Não

( ) Sim. Qual período do ano? \_\_\_\_\_

40. Qual o tipo de concentrado é fornecido?

Concentrado	Proporção

41. É dado sal aos caprinos?

( ) Não

( ) Sim, sal comum.

( ) Sim, sal comum + sal mineral para ovinos e/ou caprinos.

( ) Sim, sal comum + sal mineral comprado pronto.

( ) Sim, sal comum + sal mineral misturado na propriedade.

42. Utiliza estratégias de reserva alimentar para o rebanho caprino: ( ) Não

( ) Sim. Qual o tipo de estratégia? (Múltipla escolha).

[( )] Feno

[( )] Silagem

[( )] Banco de proteínas

### **5 - Informações sobre enfermidades e manejo sanitário**

43. Já ouviu falar em criptosporidiose? ( ) Não ( ) Sim, o que é na sua opinião?

\_\_\_\_\_

44. Já ouviu falar em CAE? ( ) Não ( ) Sim, o que é na sua opinião? \_\_\_\_\_

45. Já ouviu falar em Toxoplasmose? ( ) Não ( ) Sim, o que é na sua opinião? \_\_\_\_\_

46. Já ouviu falar em Neosporose? ( ) Não ( ) Sim, o que é na sua opinião? \_\_\_\_\_

47. Quais as principais doenças apresentadas pelo rebanho (1, 2, 3,...)? (Múltipla escolha).

[( )] mastite/mamite [( )] linfadenite [( )] boqueira [( )]

pododermatite [( )] CAE (Artrite Encefalite Caprina) [( )] raiva

[( )] clostridíose [( )] catarro (broncopneumonia) [( )] diarreia

[( )] bicheira (miíse) [( )] micoplasmose [( )] verminose [( )] outras

(especifique): \_\_\_\_\_

48. Utilizou algum medicamento para controle das doenças? ( ) Não ( ) Sim. Qual (is)?

\_\_\_\_\_

49. Aplica algum tipo de vacina no rebanho?

Não       Sim, de clostridiose       Sim, de raiva

Sim, de outras ou múltiplas (descrever)

50. Combate às verminoses?

Não

Sim. Quais as principais práticas utilizadas no rebanho. (Múltipla escolha).

Usa vermífugo.

Usa o FAMACHA.

Utiliza um calendário para a vermifugação.

Sim, faz rotação de pastos/caatinga.

Sim, separa animais jovens e adultos.

Troca de medicamento com periodicidade.

Só uso quando aparece algum animal doente

51. Como procede com a utilização do vermífugo

uso oral       uso injetável

52. Qual medicamento mais utiliza para controlar a verminose no rebanho? \_\_\_\_\_

53. Quanto tempo permanece com mesmo vermífugo? \_\_\_\_\_

54. Aplica vermífugo de quanto em quanto tempo? \_\_\_\_\_

55. a) Quando foi a última aplicação de vermífugo? \_\_\_\_\_

b) Qual foi utilizado? \_\_\_\_\_

56. Quando utilizou medicamentos procedeu com o descarte do leite e respeitou a carência do produto para o consumo ou venda de carne (animal que foi descartado para venda ou consume de sua carne)?

Não       Sim. Qual período de carência? \_\_\_\_\_

57. Quando observa diarreia nos animais, o que faz? \_\_\_\_\_

58. Quando aplica medicamento nos casos de diarreia, qual é? \_\_\_\_\_

59. Já observou coprofagia?  Não       Sim

60. Coloca cal na entrada dos bretes e/ou chiqueiros na estação chuvosa?

Não, não tem bretes, currais e chiqueiro.

Não, não coloca

Coloca

61. Quando compra um animal de fora, utiliza algum procedimento de incorporação do mesmo ao rebanho? (Múltipla escolha).

Nenhum

Deixa separado dos demais por \_\_\_\_\_ dias

Solicita atestado/exames

vermífuga

combate bicheiras/piolhos

vacina (quais?)

Outros (especifique)

62. Qual a frequência de limpeza das instalações?

diariamente

semanalmente

quinzenalmente

mensalmente

semestralmente

anualmente

nenhuma

outra: \_\_\_\_\_

63. Os dejetos dos caprinos recolhidos na limpeza são colocados aonde? \_\_\_\_\_

64. Os dejetos ficam expostos ( ) ou cobertos ( )?

65. O que faz com o esterco dos caprinos? (Múltipla escolha).

Vende

Aduba culturas

Outros (especifique) \_\_\_\_\_

66. Caso tenha respondido que aduba as culturas, qual procedimento adota antes de utilizá-lo? \_\_\_\_\_

67. a) Qual a área da instalação utilizada para prender os animais? \_\_\_\_\_

b) Quantos animais em média ficam presos nesse espaço? \_\_\_\_\_

c) Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

d) Outras espécies ficam juntas? ( ) Não

( ) Sim. Quais? \_\_\_\_\_

68. A água oferecida aos caprinos e do consumo humano é proveniente de:

Fonte de água	Caprinos	Humanos
Cacimba		
Açude		
Lagoa		
Poço Profundo		
Cisterna		
Poço artesiano		
Rio		

69. Os caprinos tem acesso a essas fontes de água? ( ) Não ( ) Sim

70. a) Outras espécies animais tem acesso a essas fontes de água? ( ) Não ( ) Sim.

b) Quais espécies? \_\_\_\_\_

c) Com que frequência? \_\_\_\_\_

71. A água é oferecida aos caprinos em:

( ) Vasilhames dentro das instalações ( ) Vasilhames fora da instalações

( ) Os caprinos e ovinos bebem direto na fonte

72. Há presença de: ( ) pombos ( ) cães ( ) gatos ( ) outros: \_\_\_\_\_

73. Quantos cães \_\_\_\_\_ e quantos gatos \_\_\_\_\_ domésticos existem na propriedade?

74. De que os gatos e os cães se alimentam?

Alimentos	Cães	Gatos
Ração		
Sobra de alimentos		
Leite		
Vísceras de animais abatidos na propriedade		

75. Nesta área é comum a presença de canídeos \_\_\_\_\_ ou felídeos \_\_\_\_\_ selvagens?

76. Na propriedade existe alguma instalação utilizada para estocar alimentos destinados à suplementação de caprinos? ( ) Não ( ) Sim

77. Animais domésticos ou selvagens têm acesso a estas instalações?

( ) Não ( ) Sim. Quais? \_\_\_\_\_

## APÊNDICE C



Figura C1. Cadastro das amostras de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, durante período de novembro de 2012 a maio de 2013, em relação ao aspecto: “grude” (A1), cibalas (A2), diarreia (A3), amolecida (A4) e ressecada (A5).

Fonte: Arquivo pessoal.



Figura C2. Cadastro das amostras de fezes de cabritos do município de Quixadá, Ceará, durante período de novembro de 2012 a maio de 2013, em relação à coloração: normal (V1), verde (V2), verde-amarelada (V3), amarelada (V4) e marrom com muco laranja (V5).

Fonte: Arquivo pessoal.

## APÊNDICE D

Tabela D1. Caracterização de 25 estabelecimentos rurais do município de Quixadá, Ceará, com criação de cabritos de três a 360 dias de idade, com e sem padrão racial definido, machos e fêmeas, a partir de questionário epidemiológico aplicado aos caprinocultores durante coletas em novembro e dezembro de 2012.

Variáveis	N (+)	N (-)	% (+/total)	OR	IC-95%	P =
<b>Conhecimento sobre criptosporidiose</b>						
Não	13	7	65,00 (13/20)	1,2381	0,1657-9,2530	1,0000 <sup>ns</sup>
Sim	3	2	60,00 (3/5)			
<b>Sistema de criação</b>						
Intensivo	2	0	100,00 (2/2)	-	-	1,0000 <sup>ns</sup>
Semi-intensivo	9	5	64,29 (9/14)			
Intensivo	2	0	100,00 (2/2)	-	-	0,4909 <sup>ns</sup>
Extensivo	5	4	55,55 (5/9)			
Semi-intensivo	9	5	64,29 (9/14)	1,4400	0,2605-7,9612	1,0000 <sup>ns</sup>
Extensivo	5	4	55,55 (5/9)			
<b>Assistência técnica</b>						
Não	5	2	71,43 (5/7)	1,5909	0,2394-10,5728	1,0000 <sup>ns</sup>
Sim	11	7	61,11 (11/18)			
<b>Irrigação</b>						
Sim	11	3	78,57 (11/14)	4,4000	0,7699-25,1458	0,1153 <sup>ns</sup>
Não	5	6	45,45 (5/11)			
<b>Fornece concentrado</b>						
Não	3	1	75,00 (3/4)	1,8462	0,1628-20,9398	1,0000 <sup>ns</sup>
Sim	13	8	61,90 (13/21)			
<b>Fornece volumoso</b>						
Sim	12	6	66,67 (12/18)	1,5000	0,2506-8,9772	0,6729 <sup>ns</sup>
Não	4	3	57,14 (4/7)			
<b>Idade da castração dos machos</b>						
Não castra	8	2	80,00 (8/10)	24,0000	1,7411-330,8204	0,0152*
Em torno dos 90 dias	1	6	14,29 (1/7)			

Não castra	8	2	80,00 (8/10)			
Em torno dos 120 dias	4	0	100,00 (4/4)	0,0000	-	1,0000 <sup>ns</sup>
Não castra	8	2	80,00 (8/10)			
Em torno dos 150 dias	2	1	66,67 (2/3)	2,0000	0,1149-34,8242	1,0000 <sup>ns</sup>
Em torno dos 90 dias	1	6	14,29 (1/7)			
Em torno dos 120 dias	4	0	100,00 (4/4)	0,0000	-	0,0151*
Em torno dos 90 dias	1	6	14,29 (1/7)			
Em torno dos 150 dias	2	1	66,67 (2/3)	0,0833	0,0034-2,0457	0,1833 <sup>ns</sup>
Em torno dos 120 dias	4	0	100,00 (4/4)			
Em torno dos 150 dias	2	1	66,67 (2/3)	-	-	0,4286 <sup>ns</sup>
<b>Idade de cobertura das fêmeas</b>						
Em torno dos 120 dias	6	3	66,67 (6/9)			
Em torno dos 210 dias	2	4	33,33 (2/6)	4,0000	0,4471-35,7890	0,3147 <sup>ns</sup>
Em torno dos 300 dias	3	1	75,00 (3/4)			
Em torno dos 120 dias	6	3	66,67 (6/9)	1,5000	0,1056-21,3130	1,0000 <sup>ns</sup>
Em torno dos 360 dias	4	1	80,00 (4/5)			
Em torno dos 120 dias	6	3	66,67 (6/9)	2,0000	0,1496-26,7353	1,0000 <sup>ns</sup>
Em torno dos 300 dias	3	1	75,00 (3/4)			
Em torno dos 210 dias	2	4	33,33 (2/6)	6,0000	0,3544-101,5728	0,5238 <sup>ns</sup>
Em torno dos 360 dias	4	1	80,00 (4/5)			
Em torno dos 210 dias	2	4	33,33 (2/6)	8,0000	0,5004-127,9066	0,2424 <sup>ns</sup>
Em torno dos 360 dias	4	1	80,00 (4/5)			
Em torno dos 300 dias	3	1	75,00 (3/4)	1,3333	0,0571-31,1228	1,0000 <sup>ns</sup>
<b>Outras espécies na propriedade</b>						
Com ovinos	9	4	69,23 (9/13)			
Sem ovinos	7	5	58,33 (7/12)	1,6071	0,3104-8,3224	0,6882 <sup>ns</sup>
Sem bovinos	4	2	66,67 (4/6)			
Com bovinos	12	7	63,16 (12/19)	1,1667	0,1682-8,0904	1,0000 <sup>ns</sup>
Com aves	15	9	62,50 (15/24)			
Sem aves	1	0	100,00 (1/1)	0,0000	-	1,0000 <sup>ns</sup>
Com equinos e/ou muares	13	5	72,22 (13/18)	3,4667	0,5629-21,3509	0,2049 <sup>ns</sup>

Sem equinos e/ou muires	3	4	42,86 (3/7)			
Com suínos	8	2	80,00 (8/10)	3,5000	0,5492-22,3045	0,2290 <sup>ns</sup>
Sem suínos	8	7	53,33 (8/15)			
<b>Fonte de água dos caprinos</b>						
Açude	15	8	65,22 (15/23)	1,8750	0,1030-34,1324	1,0000 <sup>ns</sup>
Rio	1	1	50,00 (1/2)			
<b>Vasilhames de água dentro das instalações</b>						
Não	7	2	77,78 (7/9)	3,0625	0,4718-19,8794	0,3891 <sup>ns</sup>
Sim	8	7	53,33 (8/15)			
<b>Cabritos mamam colostro</b>						
Sim	14	7	66,67 (14/21)	4,0000	0,3073-52,0673	0,5331 <sup>ns</sup>
Não	1	2	33,33 (1/3)			
<b>Idade de desmame dos cabritos</b>						
Em torno dos 60 dias	6	3	66,67 (6/9)	4,0000	0,2502-63,9533	0,5227 <sup>ns</sup>
Desmame natural	1	2	33,33 (1/3)			
Em torno dos 120 dias	7	3	70,00 (7/10)	4,6667	0,2968-73,3876	0,5105 <sup>ns</sup>
Desmame natural	1	2	33,33 (1/3)			
Em torno dos 150 dias	1	1	50,00 (1/2)	2,0000	0,0511-78,2549	1,0000 <sup>ns</sup>
Desmame natural	1	2	33,33 (1/3)			
Em torno dos 120 dias	7	3	70,00 (7/10)	1,1667	0,1682-8,0904	1,0000 <sup>ns</sup>
Em torno dos 60 dias	6	3	66,67 (6/9)			
Em torno dos 60 dias	6	3	66,67 (6/9)	2,0000	0,0902-44,3530	1,0000 <sup>ns</sup>
Em torno dos 150 dias	1	1	50,00 (1/2)			
Em torno dos 120 dias	7	3	70,00 (7/10)	2,3333	0,1068-50,9853	1,0000 <sup>ns</sup>
Em torno dos 150 dias	1	1	50,00 (1/2)			
<b>Limpeza das instalações</b>						
Diária/ semanal	4	1	80,00 (4/5)	4,0000	0,1168-136,9663	1,0000 <sup>ns</sup>
Não limpa	1	1	50,00 (1/2)			
Quinzenal/ mensal	7	4	63,64 (7/11)	1,7500	0,0844-36,2889	1,0000 <sup>ns</sup>
Não limpa	1	1	50,00 (1/2)			

Semestral	3	3	50,00 (3/6)	1,0000	0,0407-24,5489	1,0000 <sup>ns</sup>
Não limpa	1	1	50,00 (1/2)			
Diária/ semanal	4	1	80,00 (4/5)	2,2857	0,1853-28,1878	1,0000 <sup>ns</sup>
Quinzenal/ mensal	7	4	63,64 (7/11)			
Diária/ semanal	4	1	80,00 (4/5)	4,0000	0,2652-60,3277	0,5454 <sup>ns</sup>
Semestral	3	3	50,00 (3/6)			
Quinzenal/ mensal	7	4	63,64 (7/11)	1,7500	0,2327-13,1590	0,6437 <sup>ns</sup>
Semestral	3	3	50,00 (3/6)			
<b>Dejetos expostos</b>						
Sim	14	9	60,87 (14/23)	0,0000	-	1,0000 <sup>ns</sup>
Não	1	0	100,00 (1/1)			
<b>Problema com diarreia</b>						
Sim	13	8	61,90 (13/21)	1,6250	0,0887-29,7827	1,0000 <sup>ns</sup>
Não	1	1	50,00 (1/2)			
<b>Observaram coprofagia</b>						
Sim	0	2	0,00 (0/2)	0,0000	-	0,1304 <sup>ns</sup>
Não	15	7	68,18 (15/22)			

N (+) = número de positivos para *Cryptosporidium* spp. na "Nested"-PCR com gene 18S rRNA, N (-) = número de negativos para *Cryptosporidium* spp. na "Nested"-PCR, % (+/total) = percentual de positivos, OR = odds ratio, IC- 95% = intervalo de confiança de 95%, valor de P obtido no teste exato de Fisher.\*com significância estatística de 5% e <sup>ns</sup>não significativo estatisticamente a 5%.