

Criptosporidiose Neonatal em Vitelos: Estudo Epidemiológico e Molecular no distrito de Portalegre

Joana Reis¹, Mariana Louro³, Isabel Pereira da Fonseca^{3,4}, Miguel Minas^{1,2}, Jacinto Gomes^{1,2,3,4 *}

¹ Escola Superior de Biociências, Instituto Politécnico de Portalegre, Portugal.

² VALORIZA – Centro de Investigação para a Valorização de Recursos Endógenos, Portalegre, Portugal

³ CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal

⁴ AL4AnimalS - Laboratório Associado para a Ciência Animal e Veterinária, Portugal;

*Email: jacinto.gomes@ipportalegre.pt

Summary

Bovine cryptosporidiosis is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Cryptosporidium*, with *Cryptosporidium parvum* being an important agent of neonatal diarrhoea in calves. This study aimed to determine the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in calves under one month of age from cattle farms in the district of Portalegre, Portugal, and to molecularly identify the species involved. Between February and May 2024, 55 faecal samples were collected from calves originating from 14 beef and dairy farms. Samples were analysed using parasitological methods and Ziehl–Neelsen staining, direct immunofluorescence and PCR. The overall prevalence of infection was 47% (26/55). Molecular analysis confirmed the predominance of *C. parvum*, while one sample was identified as *C. bovis*. These findings demonstrate the widespread occurrence of this parasite in cattle farms from the Alto Alentejo region and reinforce the importance of prophylactic measures and good management practices to reduce transmission.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*; calves; prevalence; epidemiology; molecular diagnosis; Portugal.

Resumo

A criptosporidiose bovina é uma parasitose causada por protozoários do género *Cryptosporidium*, sendo *Cryptosporidium parvum* um importante agente de diarreia neonatal em vitelos. O presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em vitelos com menos de um mês de idade provenientes de explorações bovinas do distrito de Portalegre, bem como identificar as espécies presentes através de métodos moleculares. Entre fevereiro e maio de 2024 foram recolhidas 55 amostras fecais de vitelos de 14 explorações de carne e leite. As amostras foram analisadas por técnicas parasitológicas e coloração de Ziehl-Neelsen, imunofluorescência direta e PCR. A prevalência global de infeção foi de 47% (26/55). A análise molecular confirmou a predominância de *C. parvum*, sendo igualmente identificada uma amostra positiva para *C. bovis*. Os resultados demonstram a elevada disseminação deste parasita em explorações bovinas do Alto Alentejo e reforçam a importância de medidas profiláticas e boas práticas de manejo para reduzir a transmissão da infeção.

Palavras-chave: *Cryptosporidium parvum*; vitelos; prevalência; epidemiologia; diagnóstico molecular; Portugal.

Introdução

A criptosporidiose é uma zoonose causada por protozoários do género *Cryptosporidium* spp., capazes de infetar uma vasta gama de hospedeiros animais. Trata-se de uma doença de distribuição mundial, uma vez que os oocistos esporulados, forma infetante do parasita, apresentam elevada resistência ambiental, distribuição ubiqüitária e grande capacidade de disseminação (Louro et al., 2024). A transmissão ocorre principalmente por via fecal-oral, através do contacto direto com animais infetados ou indiretamente pela ingestão de água, alimentos ou fmites contaminados. Em bovinos, a infeção ocorre maioritariamente durante o primeiro mês de vida, período em que os vitelos apresentam maior

suscetibilidade devido à imaturidade do sistema imunitário (Chen et al., 2023; Rodrigues, 2024).

Os vitelos neonatos constituem importantes reservatórios do parasita, estando frequentemente associados a quadros de diarreia neonatal e perdas produtivas significativas. Estudos realizados entre 2016 e 2018 em 32 explorações do distrito de Évora demonstraram que 55,7% dos vitelos com menos de um mês de idade eram positivos para *Cryptosporidium* spp., sendo 62,5% das explorações positivas para *C. parvum* (Martins, 2018). Em Espanha, foram reportadas prevalências de *C. parvum* em vitelos na ordem dos 17%, bem como a presença de *C. andersoni* em novilhos, embora com menor frequência (Diaz et al., 2021). Por sua vez, entre 2014 e 2017, um estudo realizado em vitelos de carne sintomáticos de

diferentes regiões do Norte Alentejano (Elvas, Terrugem, Monforte, Campo Maior e Arronches) revelou uma prevalência de 39% para *C. parvum* em 75 animais analisados (Santos & Minas, 2018).

O distrito de Portalegre apresenta uma importante atividade pecuária bovina, com explorações de carne e leite de elevada importância económica. Apesar da reconhecida relevância da criptosporidiose bovina nas explorações alentejanas, continuam a existir poucos estudos epidemiológicos focados em vitelos neonatos nesta região, bem como reduzida sensibilização dos produtores relativamente ao impacto da doença. O conhecimento atualizado da epidemiologia do parasita e a implementação de práticas adequadas de manejo são fundamentais para o estabelecimento de medidas preventivas eficazes e para a redução da disseminação da infeção, minimizando os impactos na saúde e bem-estar animal assim como na saúde pública.

O presente estudo teve como objetivos avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em vitelos com menos de um mês de idade, com ou sem sinais clínicos, provenientes de explorações bovinas do distrito de Portalegre, bem como identificar molecularmente as espécies presentes nas amostras positivas com maior carga parasitária.

Materiais e Métodos

Área de estudo e recolha de amostras

Entre fevereiro e maio de 2024, foram recolhidas 55 amostras fecais de vitelos com menos de um mês de idade, provenientes de 14 explorações bovinas localizadas em diferentes concelhos do distrito de Portalegre. As explorações incluídas no estudo foram selecionadas de forma oportunística, procurando assegurar uma distribuição geográfica representativa do distrito, no âmbito de intervenções sanitárias acompanhadas pelo médico veterinário assistente dessas explorações. A maioria das amostras foi obtida em onze explorações de bovinos de carne em regime extensivo, tendo sido igualmente incluídas três explorações leiteiras em regime intensivo.

As amostras fecais foram recolhidas por estimulação retal, de modo a minimizar contaminações ambientais, em vitelos com ou sem sinais clínicos de diarreia, recolhendo-se entre uma a sete amostras por exploração. Todas as amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas sob refrigeração e transportadas para laboratório para posterior processamento. As colheitas foram realizadas com consentimento informado dos produtores e no âmbito de exames físicos e procedimentos clínicos de rotina, não tendo sido efetuados procedimentos invasivos adicionais aos animais.

Técnicas laboratoriais para deteção de oocistos

Para a deteção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., as amostras fecais foram processadas e filtradas de acordo com o descrito em Louro et al. (2025), de forma a obter preparações destinadas à coloração por Ziehl-Neelsen modificada e à imunofluorescência direta. Posteriormente, procedeu-se à observação microscópica através da técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) e da técnica de Imunofluorescência Direta (IFD), de acordo com metodologias previamente descritas na literatura (Louro et al., 2025).

Extração de DNA e PCR

Das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., foram selecionadas aquelas com maior carga parasitária para caracterização molecular. O DNA genómico foi extraído a partir das amostras fecais utilizando o kit NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NZYTech, Portugal), seguindo as instruções do fabricante para amostras fecais. As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20 °C até posterior análise molecular. A identificação das espécies foi realizada através de PCR seguida de análise de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando as enzimas de restrição *MbolI* e *SspI*, de acordo com a metodologia descrita por Louro et al. (2024). Em todas as reações de PCR foi incluída uma amostra positiva de *C. parvum* como controlo positivo e água ultrapura como controlo negativo.

Análise estatística

A prevalência de infeção por *Cryptosporidium* spp. foi calculada com os respetivos intervalos de confiança a 95% (IC95%). A associação entre a presença de diarreia e a positividade das amostras foi avaliada através do teste exato de Fisher, considerando-se estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$.

Resultados

Foram analisadas 55 amostras fecais de vitelos com menos de um mês de idade, provenientes de 14 explorações do distrito de Portalegre. A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi inicialmente avaliada através da técnica de ZN, tendo sido identificadas 20 amostras positivas (20/55). Posteriormente, todas as amostras foram analisadas por IFD, técnica que permitiu identificar 26 amostras positivas (26/55), incluindo as 20 amostras identificadas por ZN. A prevalência global de infeção por *Cryptosporidium* spp. foi de 47,3% (26/55; IC95%: 34,7–60,2%). Nos vitelos sem diarreia, a prevalência observada foi de 43,6% (17/39; IC95%: 29,3–59,0%), enquanto nos animais com diarreia foi de 56,3% (9/16; IC95%: 33,2–76,9%). A análise estatística não demonstrou associação significativa entre a presença de diarreia e a positividade para *Cryptosporidium* spp. (teste exato de Fisher; $p = 0,553$).

Das 14 explorações incluídas no estudo, 12 apresentaram pelo menos um animal positivo para *Cryptosporidium* spp., correspondendo a uma prevalência ao nível das explorações de 85,7%. A prevalência dentro das explorações variou entre 0% e 100%, observando-se diferenças entre explorações e concelhos do distrito de Portalegre. A distribuição dos resultados por exploração encontra-se apresentada na Tabela 1. A comparação entre os métodos laboratoriais utilizados demonstrou um maior número de deteções positivas pela técnica de IFD relativamente à coloração ZN. As amostras positivas por IFD foram classificadas de acordo com a carga parasitária observada por microscopia, considerando-se três níveis distintos em ampliação de 400x: N1 (1–5 oocistos por campo observado), N2 (<20 oocistos por campo) e N3 (>20 oocistos por campo). As amostras com maior carga parasitária foram selecionadas para posterior caracterização molecular. Para análise molecular, foram selecionadas nove amostras com elevada carga parasitária observada por IFD. A identificação molecular por PCR-RFLP confirmou a presença de *Cryptosporidium parvum* em oito amostras, enquanto uma amostra foi identificada como *C. bovis*. Relativamente à consistência fecal, observaram-se amostras positivas tanto em vitelos com diarreia como em animais sem sinais clínicos evidentes.

Tabela 1. Localização das explorações de bovinos de leite (L1 a L3) e de bovinos de carne (C4 a C14), total de amostras por exploração e resultados (positivos/negativos na cominação de ZN + IFD).

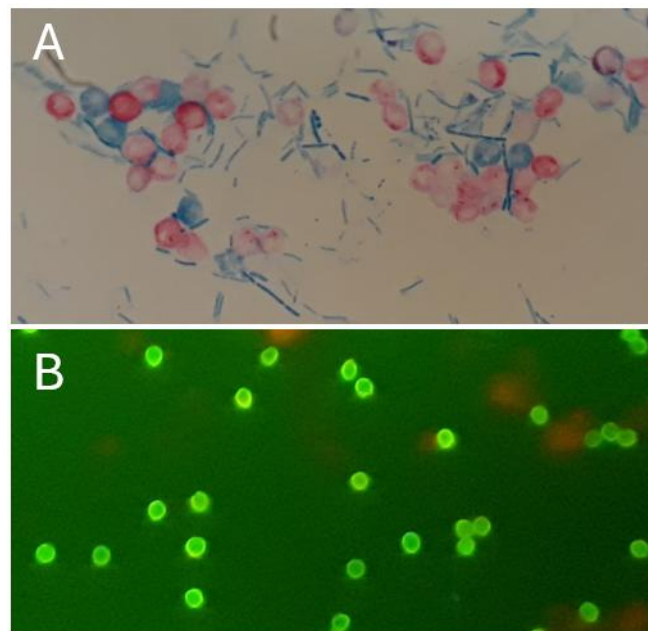
Exploração	Concelho	n	Resultado ZN/IFD	
			Negativo	Positivo
L1	Campo Maior	5	3	2
L2	Avis	2	0	2
L3	Nisa	2	0	2
C4	Avis	3	1	2
C5	Elvas	7	4	3
C6	Nisa	3	3	0
C7	Ponte de Sôr	1	0	1
C8	Sousel	1	0	1
C9	Monforte	5	3	2
C10	Sousel	7	5	2
C11	Arronches	5	5	0
C12	Alter Real	4	2	2
C13	Elvas	4	1	3
C14	Campo Maior	6	2	4
		55	29	26

A distribuição geográfica das explorações amostradas encontra-se representada na Figura 1, sendo igualmente apresentadas imagens representativas das observações microscópicas obtidas pelas técnicas de ZN e IFD (Figuras 2).

Figura 1. Distribuição geográfica das explorações e número de amostras recolhidos nos concelhos do distrito de Portalegre.



Figura 2. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. em esfregaço fecal corado com Ziehl-Neelsen (A), ampliação 1000x e por Imunofluorescência Direta (B), ampliação 400x.



Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram uma elevada ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em vitelos com menos de

um mês de idade no distrito de Portalegre, tendo sido observada uma prevalência global de 47% e positividade em 12 das 14 explorações estudadas. Estes dados reforçam a importância da criptosporidiose como uma das principais parasitoses associadas à diarreia neonatal bovina e estão de acordo com estudos prévios realizados noutras regiões do Alentejo e de Portugal. Apesar de a prevalência de *Cryptosporidium* spp. ter sido superior nos vitelos com diarreia, observaram-se igualmente elevadas taxas de positividade em animais sem sinais clínicos evidentes. Estes resultados reforçam a importância epidemiológica dos portadores subclínicos na disseminação ambiental do parasita nas explorações de bovinos.

A prevalência observada foi inferior à descrita por Martins (2018), que reportou 55,7% de vitelos positivos em 62,5% de explorações positivas no distrito de Évora, mas superior aos valores obtidos por Saramago (2019), que identificou uma prevalência global de 25,7% em explorações do Alentejo Central e Litoral. Por outro lado, Santos & Minas (2018) reportaram uma prevalência de 39% em vitelos sintomáticos do Norte Alentejano. Estas diferenças podem estar relacionadas com fatores como a dimensão da amostra, critérios de seleção dos animais, métodos de diagnóstico utilizados, idade dos vitelos e condições de manejo das explorações.

A elevada frequência de explorações positivas sugere uma ampla distribuição de *Cryptosporidium* spp. na região estudada, embora se tenha observado variabilidade na prevalência entre explorações, possivelmente relacionada com diferenças de manejo, higiene e pressão de infeção ambiental.

A técnica de Imunofluorescência Direta revelou maior sensibilidade diagnóstica relativamente à coloração de Ziehl-Neelsen, permitindo identificar um maior número de amostras positivas. Este resultado está de acordo com a literatura, que descreve a IFD como uma técnica mais sensível para deteção de oocistos, especialmente em infeções de baixa carga parasitária.

A caracterização molecular confirmou a predominância de *Cryptosporidium parvum*, principal espécie associada a diarreia neonatal em vitelos e reconhecida pelo seu potencial zoonótico. A identificação de *C. bovis* numa das amostras analisadas demonstra igualmente a circulação de outras espécies de *Cryptosporidium* em bovinos da região, embora aparentemente com menor prevalência. A presença de animais positivos sem sinais clínicos evidentes sugere ainda a possível importância epidemiológica de portadores subclínicos na manutenção e disseminação ambiental do parasita.

Entre as principais limitações deste estudo destacam-se o reduzido número de amostras analisadas por exploração, a ausência de avaliação de fatores de risco associados ao

manejo e a subamostragem realizada para análise molecular, limitada às amostras com maior carga parasitária. Adicionalmente, o número reduzido de explorações leiteiras incluídas impossibilitou comparações robustas entre sistemas de produção intensivos e extensivos. Apesar destas limitações, o estudo fornece dados epidemiológicos relevantes sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em vitelos do Alto Alentejo, contribuindo para o conhecimento da distribuição regional deste parasita em bovinos jovens.

Conclusão

O presente estudo demonstrou uma elevada ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em vitelos com menos de um mês de idade no distrito de Portalegre. A análise molecular confirmou a predominância de *Cryptosporidium parvum*, principal espécie associada à criptosporidiose neonatal bovina, tendo sido igualmente identificada a presença de *C. bovis*. Os resultados obtidos reforçam a importância epidemiológica deste parasita em explorações de bovinos do Alto Alentejo, incluindo em animais sem sinais clínicos evidentes, que poderão desempenhar um papel relevante na disseminação ambiental da infeção, constituindo um risco elevado para os trabalhadores agrícolas em contacto com os animais infetados. A utilização combinada de técnicas microscópicas, imunológicas e moleculares revelou-se útil para a deteção e caracterização do agente. Entre as principais limitações do estudo destacam-se a reduzida dimensão amostral e a limitada subamostragem para análise molecular. Assim, serão necessários estudos futuros com maior número de explorações e animais, bem como avaliação de fatores de risco associados ao manejo e à transmissão da infeção, de forma a aprofundar o conhecimento epidemiológico da criptosporidiose bovina em Portugal.

Agradecimentos: Este estudo foi desenvolvido no âmbito do Trabalho Final de Licenciatura em Enfermagem Veterinária da Escola Superior de Biociências de Elvas, Instituto Politécnico de Portalegre. Os autores agradecem a todos os proprietários que permitiram a colheita de amostras para o estudo.

Conflitos de interesses: os autores declaram não ter quaisquer conflitos de interesses relativamente ao estudo ou aos seus resultados. Este trabalho foi parcialmente financiado por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito dos projetos CIISA - UIDB/00276/2020 e AI4AnimalS - LA/P/0059/2020. Além disso, Mariana Louro beneficiou da Bolsa UI/BD/152818/2022 (financiada pela FCT).

Bibliografia

- Chen, Y., Huang, J., Qin, H., Wang, L., Li, J., & Zhang, L. (2023). *Cryptosporidium parvum* and gp60 genotype prevalence in dairy calves worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica*, 240, 106843. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106843>
- Díaz, E., Navarro, E., Remesar, S., Dios, D., López, C., Lorenzo, G., & Prieto, A. (2021). The age-related *Cryptosporidium* species distribution in asymptomatic cattle from north-western Spain. *Animals*, 11(2), 256. <https://doi.org/10.3390/ani11020256>
- Louro, M., Bexiga, R., Fonseca, I., & Gomes, J. (2024). Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Lisbon and Tagus Valley, Portugal. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 47, 100964. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100964>
- Louro, M., Hernandez, L., Antunes, J., Madeira de Carvalho, L., Pereira da Fonseca, I., & Gomes, J. (2025). *Cryptosporidium* spp. in reptiles: Detection challenges, molecular characterization and zoonotic risk. *Food and waterborne parasitology*, 40, e00272. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2025.e00272>
- Martins, R. (2018). *Cryptosporidium*: Um desafio constante. *Revista Limousine*, 86–88.
- Rodrigues, M.L., Louro, M., Gomes, J., Pereira da Fonseca, I., Bexiga, R. (2024). Fuentes ambientales de la infección por *Cryptosporidium parvum* en terneros lecheros neonatales. *Boletín ANEMBE*, 145.
- Santos, R., & Minas, M. (2018). Causas comuns de diarreias neonatais em vitelos de carne do Norte Alentejano. Comunicação apresentada nas X Jornadas do Hospital Veterinário Muralha de Évora.
- Saramago, J. (2019). Contribuição para a determinação de infeção por *Cryptosporidium* spp. em vitelos de explorações de carne das sub-regiões do Alentejo Central e Litoral (Dissertação de mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.