

OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* sp TYZZER, 1907 DETECTADA PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE COLORAÇÃO DA AURAMINA EM BOVINOS EM PROPRIEDADES RURAIS DO MUNICÍPIO DE LAGES (SC), BRASIL.

OCCURENCE OF *Cryptosporidium* sp TYZZER, 1907 DETECTED BY THE IMUNOFLUORESCENCE METHOD WITH AURAMINE COLOURING TECHNIQUE IN BOVINE SPECIES IN RURAL PROPERTIES OF LAGES, SANTA CATARINA STATE, BRAZIL.

Rosiléia Marinho de Quadros¹, Flávio Antônio Pacheco de Araújo²

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo identificar o gênero *Cryptosporidium* sp em amostras fecais na espécie bovina através do método de imunofluorescência pela técnica de coloração da auramina em oito propriedades rurais do município de Lages-SC, no período de agosto à dezembro de 2001. A estimativa em ponto para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp em 200 amostras de fezes de bovinos foi de 17%, para o intervalo de confiança de 99%. Através da análise estatística pelo teste de Fisher, foi observado existir uma associação significativa entre os resultados dos exames e as faixas etárias, sendo o protozoário mais comum em animais jovens. A Odds Ratio calculada foi de 2,417. Conclui-se que a técnica de coloração da auramina, pode ser utilizada na rotina laboratorial para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* sp.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium*, Bovinos, IFI.

SUMMARY

The current research had as main objective to identify the genus *Cryptosporidium* sp in the fecal samples from bovine specimens

through the immunofluorescence method by auramine colouring technique in the rural properties, in Lages city, Santa Catarina state, during the period from august to december of 2001. The valuation in point for the *Cryptosporidium* sp oocysts in 200 samples of bovine fecal was 17% the variation under 99% of confidence interval. The statistical analysis, through the Fisher test, demonstrated a significant association between the results of the exam and animals age, being of *Cryptosporidium* sp more common in young animals. The Odds Ratio calculated was of 2,417. The auramine colouring technique can be a technique in the laboratorial routine for the *Cryptosporidium* sp oocysts diagnosis.

KEY WORDS: *Cryptosporidium*, bovine, IFI.

INTRODUÇÃO

Segundo Fayer et al. (2000), o *Cryptosporidium* é um parasito obrigatório, intracelular, com desenvolvimento por endodiogenia que culmina com a produção de oocistos eliminados pelas fezes dos seus hospedeiros, desenvolvendo quadros de diarreia, principalmente em indivíduos imunossuprimidos. Para Current (1989), foi Clarke em 1885, o

¹ Médico Veterinário, MSc. Prof^a de Parasitologia da UNIPLAC-SC. Av. Castelo Branco,170. CEP 88509-900 Lages, SC. E-mail: rosileia@uniplac.net

² Médico Veterinário, Dr. Prof. Setor de Protozoologia da UFRGS-RS. Av. Bento Gonçalves, 9090. CEP 91540-000 Porto Alegre,RS

primeiro a observar o gênero *Cryptosporidium*, o qual ele descreveu como um aglomerado de esporos situados dentro do epitélio gástrico de camundongos. Porém segundo Dubey et al. (1990), foi Ernest Edward Tyzzer em 1907 quem descreveu claramente um protozoário parasito freqüentemente encontrado nas glândulas gástricas de camundongos em laboratório, onde reconheceu seu modo de reprodução tanto sexuada quanto assexuada e em 1910 propôs o gênero *Cryptosporidium*.

A criptosporidiose em bovinos começou a ser associada com quadros de diarreia, onde foi descrita em 1971 por Panciera e colaboradores (TABOADA et al., 1993). Embora Levine (1985), considerou que deva existir apenas quatro espécies de *Cryptosporidium*; Dubey et al. (1990), citaram que o gênero consta de 21 espécies em diferentes hospedeiros de classes zoológicas como mamíferos domésticos e silvestres, aves, répteis (TZIPORI, 1985; TAYLOR et al., 1999) e peixes (DUBEY et al. 1990; CAMUS e LOPES, 1996). Para CHERMETTE e BOUFASSA-OUZROUT (1988), somente duas espécies de *Cryptosporidium* foram identificados em ruminantes, a espécie intestinal representada pelo *C. parvum*, mais comumente isolada e responsável por problemas diarréicos entre bovinos jovens e imunossuprimidos e a espécie abomasal pelo *C. muris*, espécie menos patogênica que ocorre tanto em animais jovens quanto em adultos. Com relação ao ciclo evolutivo, o *C. parvum*, geralmente é confinado a porção apical do enterócito e lúmen intestinal (HOWELLS, 1998). Para Taboada et al. (1993), o único representante da família Cryptosporidiidae, caracterizou-se por apresentar um ciclo monoxeno, com localização intracelular e extracitoplasmática e oocistos sem esporocistos e com quatro esporozoítos, enquanto Current e Reese (1986), indicaram a presença de dois tipos de oocistos um de parede grossa e outro de parede fina que podem romper-se dentro do enterócito do próprio hospedeiro, sendo desta forma responsáveis pela auto-infecção e permitindo a persistência da infecção em

indivíduos imunossuprimidos. De acordo com Vergara-Castiblanco et al. (2000), a patogenia, antigenicidade, sensibilidade as drogas e infectividade do protozoário depende da diversidade genética mostrada entre isolados de *C. parvum* em mamíferos. Em bovinos a duração dos sintomas da criptosporidiose depende de inúmeros fatores, incluindo os níveis de contaminação ambiental, a virulência e a infectividade da amostra, suscetibilidade do hospedeiro e idade da primeira infecção (LORENZO et al., 1995). As formas de contaminação pelo parasito se faz pela ingestão de oocistos excretados pelas fezes de humanos ou animais, contudo a infecção pode ser transmitida por via direta (pessoa para pessoa ou para animais) ou indireta, através da ingestão de água e alimentos contaminados (McDONALD & AWAD-EL-KARIEM, 1995; HOWELLS, 1998). LERMAN et al. (1999); UGA et al. (2000), citaram que a presença de oocistos na água em várias partes do mundo foi descrito como causa de surtos diarréicos. O diagnóstico deste protozoário está baseado na morfologia específica dos oocistos em amostras fecais pela utilização do microscópio utilizando técnicas de coloração usualmente empregadas como o Ziehl Neelsen modificado, fenol-auramina entre outros (FARRINGTON et al., 1995; McLAUCHLIN et al., 1999). A técnica de Ziehl Neelsen utilizada de modo rotineiro nos laboratórios de microbiologia para a detecção de micobactérias, abriu caminho para outros corantes, como a auramina na detecção do *Cryptosporidium* (TABOADA et al., 1993). Em relação as técnicas para o diagnóstico, para Dubey et al. (1990), vários métodos, tanto de flutuação quanto de sedimentação são usados para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium*, para os autores a técnica de sedimentação é mais sensível. Conforme Xiao e Herd (1993), a imunofluorescência direta ou indireta tem mostrado maior sensibilidade e especificidade do que os métodos convencionais na detecção de oocistos de *Cryptosporidium*. Para STIBBS & Ongerth (1986), a imunofluorescência indireta é menos sensível que a técnica da auramina e para

Sunghwan et al. (1996), a sensibilidade dos testes de imunofluorescência tem mostrado sensibilidade acima de 96% e especificidade de 99%. Desta forma estes métodos tem despertado interesse pela segurança no diagnóstico. Para Taboada et al. (1993), a auramina apresenta uma maior afinidade pela parede dos oocistos que a fucsina do Ziehl Neelsen, pois os oocistos corados pela auramina resistem uma descoloração por 5 minutos, este tempo descora completamente com o corante do Ziehl Neelsen, além disto a coloração da auramina apresenta vantagens de ser uma técnica rápida de fazer e ler, ideal para estudos de populações e uma vez coradas estas lâminas e acondicionadas fora da claridade, resistem por meses; porém apresentam desvantagens de não se identificar a espécie do parasito e nem sempre se visualiza o oocisto esporulado. Além destas técnicas de coloração, podem ser usadas outras como a safranina tricrômica (LEÓN et al., 1999). Ainda para o diagnóstico, podem ser usadas as técnicas de Reação de Polimerase em Cadeia - PCR (WEBSTER et al., 1996) e de ELISA (ROBERT et al., 1990), apresentando elevada sensibilidade e especificidade.

O trabalho teve por objetivos, identificar o gênero *Cryptosporidium* sp em amostras fecais na espécie bovina através do método de imunofluorescência pela técnica de coloração da auramina; verificar a frequência de *Cryptosporidium* sp no município de Lages-SC e comparar estatisticamente a prevalência de *Cryptosporidium* sp entre animais com idades abaixo e acima de doze meses.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de fezes utilizadas foram provenientes de bovinos de oito propriedades rurais do município de Lages-SC. O experimento foi realizado no período de agosto à dezembro de 2001. Foram utilizados 200 bovinos de diferentes raças, sexos idades e aptidões. Os animais foram distribuídos em dois grupos, um grupo com 100 bovinos com idade inferior a 12 meses e outro com 100 bovinos com idade superior a 12 meses.

As fezes foram coletadas diretamente do reto do animal. As amostras após coletadas foram transportadas ao Laboratório de Parasitologia da Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC), conservadas em geladeira a uma temperatura de aproximadamente 8°C para posterior processamento, sendo submetidas a uma concentração, utilizando-se o método de éter-formol (LEÓN et al., 1999). As lâminas foram coradas através da técnica da auramina conforme Nichols e Thom (1984).

O diagnóstico foi baseado na presença de oocistos de coloração verde amarelado fluorescente de *Cryptosporidium* nas fezes, visualizadas em microscópio de fluorescência. Os dados estatísticos foram analisados estatisticamente através do teste exato de Fisher para análises comparativas e Odds Ratio para medir a intensidade de associação entre as idades dos animais e a positividade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das oito propriedades envolvidas no experimento, sete delas apresentaram bovinos contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Os resultados encontrados através do método de imunofluorescência detectados pela técnica da auramina estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência do *Cryptosporidium* sp em bovinos com idades inferior e superior a 12 meses nas propriedades rurais de Lages- SC, Brasil.

Animais	Idade até 12 meses	Idade acima de 12 meses	Total
Examinados	100	100	200
Positivos	23 ^a	11 ^b	34

O teste exato de Fisher demonstrou haver diferença significativa entre os resultados obtidos pela técnica de coloração da auramina, entre as faixas etárias. A Odds Ratio calculada através dos dados encontrados foi igual a 2,417.

De acordo com os resultados encontrados, 34 (17%) das amostras foram positivas para

Cryptosporidium sp, que difere dos 36,8% encontrados por Caldasso (1996), 31,34% por Moraes et al. (1994) e dos 27,87% segundo Garcia e Lima (1993).

Para animais com idades até 12 meses, a taxa de positivos para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp foi de 23%, resultados semelhantes aos encontrados por Mundim et al. (1995) de 25%, porém diferentes dos encontrados por Garcia e Lima (1994), que obtiveram um percentual de 11,32% e de Carneiro et al. (1995) de 12,02%.

Os animais jovens apresentaram mais do dobro de chances de contaminação pelo parasito que os animais mais velhos usados no experimento, embora os animais adultos tenham apresentado menor percentual que os animais jovens, porém é importante citar a importância destes animais como excretadores assintomáticos de oocistos de *Cryptosporidium* sp, pois segundo Scott et al. (1994), estes são importantes como fonte de contaminação para terneiros.

Cabe ressaltar que no Brasil, a maioria dos trabalhos realizados para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* sp nas espécies domésticas são realizadas pela técnica de Ziehl Neelsen, este é o primeiro trabalho utilizando-se a técnica da auramina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALDASSO, C. C. *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer, 1907) em bovinos: estudo de ocorrência em uma propriedade rural no município de Cristal-RS. Porto Alegre: UFRGS, 1996. 81p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CAMUS, A. C.; LOPES, M. K. Gastric cryptosporidiosis in juvenile red drum. **Journal Aquatic Animal Health**, v. 8, n.2, p.167-172, 1996.

CARNEIRO, J. R. ; RODRIGUES, N.; LIMA, J. D. et al. Prevalência de *Cryptosporidium parvum* em bezerros procedentes da microrregião de

Goiânia-GO. **Revista de Patologia Tropical**, v. 24, n. 2, Jul/Dez., p. 255-267, 1995.

CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. **Criptosporidiose: una maladie animale et humaine cosmopolite**. 2 ed. Paris: Office International des Epizooties, 1988. 127 p.

CURRENT, W. L. Cryptosporidiosis. In: MCADAM, K. P. **New Strategies in Parasitology: frontiers of infectious diseases**, 1989.

CURRENT, W. L.; REESE, N. C. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. **Journal Protozoology**, v.33, n. 1, p.98-108, 1986.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of Man and Animals**. Flórida: CRC Press, 1990, 199p.

FARRINGTON, M.; LLOYD, S.; WINTERS, S. et al. Patterns of *Cryptosporidium* antigen and oocyst excretion in calves studied by reverse passive haemagglutination and light microscopy. **Veterinary Parasitology**, v. 60, p. 7-16, 1995.

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

GARCIA, A. M; LIMA, J. D. Prevalência de *Cryptosporidium* spp em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com a prática de manejo. **Arq. Bras. Par. Vet.** v.3, n.1, p.23-28, 1994.

GARCIA, A. M; LIMA, J. D. Frequência de *Cryptosporidium* em bezerros lactentes de rebanhos leiteiros de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** v.45,n.2, p.193-198,1993.

HOWELLS, H. **A critical evaluation of techniques used for the detection of**

Cryptosporidium parvum and *Giardia lamblia* in faecal samples. University of Portsmouth: School of Pharmacy and Biomedical Sciences, 1998.

LEÓN, P. P.; FLAHERTY, P.; ZDERO, M. Una nueva coloración safranina tricrómica para la detección de *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, especies de Microsporidia e *Isoospora belli* em materia fecal. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, n. 41, p.211-214, 1999.

LERMAN, A. B. et al. *Cryptosporidium* and water. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 31. n. 2, Apr./Jun., p. 97-105, 1999.

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**, Ames: Iowa State University Press, 1985, p.3-19.

LORENZO, M. J. et al. *Cryptosporidium parvum* oocyst antigens recognized by sera from infected asymptomatic adult cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 60, p.17-25, 1995.

MCDONALD, V.; AWALD-EL-KARIEM, F. M. Strain variation in *Cryptosporidium parvum* and evidence for distinctive human and animal strains. IN: BETTS; CASEMORE, D. P.; FRICKER, C. R.; SMITH, H. V. **Protozoan Parasites and Water**. Londres: The Royal Society of Chemistry. 1995, p. 104-107.

MCLAUCHLIN, J. et al. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, Oct., p.3153-3158, 1999.

MORAES, R. Q. et al. Presença de *Cryptosporidium* sp em fezes de bovinos da raça jersey em uma granja de Santa Maria-RS. In: CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, 1., CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 12., 1994, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de

veterinária do Rio Grande do Sul, 1994. p.79.

MUNDIM, M. J. S.; SOUZA, L. M.; MUNDIM, A. V. et al. Freqüência de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes de bezerros criados sob condições naturais no município de Uberlândia, analisados por quatro métodos laboratoriais. **Vet. Not.**, v.1, n.1, 1995.

NICHOLS, G.; THOM, B. T. **Screening for *Cryptosporidium* in stalls**. *Lancet* i. 1984.735p.

ROBERT, B. et al. Diagnosis of bovine cryptosporidiosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v. 37, p. 1-8, 1990.

SCOTT, C. A.; SMITH, H. V.; GIBBS, H. A. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suture cows. **Veterinary Record**. v. 134, n. 7, p. 172, Feb. 1994.

STIBBS, H. H.; ONGERTH, J. E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. **Journal of Clinical Microbiology**, v.24, n.4, p.517-521, 1986.

SUNGHWAN, W.; HOODON, J.; YUNGBAI, K. Evaluation for detection of *Cryptosporidium* oocysts in diarrheal feces of calves. **Korean Journal of Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 121-126, 1996.

TABOADA, J. L.; CREGO, A. M.; CASAL, J. F. et al. ***Cryptosporidium*, Un Protozoo Asociado Al Sida**. Santiago de Compostela, 1993, 126p.

TAYLOR, M. A.; GEACH, M. R.; COOLEY, W. A. Clinical and pathological observations on natural infections of cryptosporidiosis and flagellate in leopard geckos (*Eublepharis macularius*). **Veterinary Record**, v. 145, p. 695-699, 1999.

TZIPORI, S. *Cryptosporidium*: notes on epidemiology and pathogenesis. **Parasitology**

Today, v.1, n.6, p.159-165, 1985.

UGA, S.; MATSUO, J.; KONO, E. et al. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocysts shedding in calves in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.27-32, 2000.

VERGARA-CASTIBLANCO, C. A. et al. Viability and infectivity of two *Cryptosporidium parvum* bovine isolates from different geographical location. **Veterinary Parasitology**, n.89, p.261-267, 2000.

WEBSTER, K. A.; SMITH, H.; GILES, M. et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, n.61, p.5-13, 1996.

XIAO, L.; HERD, R. P. Quantitation of *Giardia* cysts of and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n.11, Nov., p.2944-2946, 1993.