

Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em bezerros leiteiros através do método de Kinyoun

NIEVERSON VICENTIN PERSIO¹; THAÍS ESTÉRCIO²; BRUNA BACCEGA²;
ANDRIOS DA SILVA MOREIRA²; ELIZA SIMONE VIÉGAS SALLIS²; DANIELA
ISABEL BRAYER PEREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – nieversonp79@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – thayseloiza@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – brubaccega@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – andriossilvamoreira@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – esvsallis@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – danielabraye@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Cryptosporidium spp. são protozoários coccídios oportunistas reconhecidos como importantes patógenos causadores de diarreia em vertebrados, como bovinos e o homem (FAYER et al., 2000). Na espécie bovina, os bezerros neonatos são mais suscetíveis à infecção clínica, entretanto animais adultos acometidos por infecções de natureza assintomática ou associados à sintomatologia de pouca gravidade (O'DONOGHUE, 1995).

Os bovinos podem atuar como reservatórios de *C. parvum*, espécie com potencial zoonótico (FAYER et al., 2000). Há uma crescente preocupação com esta enfermidade devido à facilidade de disseminação mundial, que esta doença que pode resultar em problemas de saúde em humanos e animais, com consequentes impactos sanitários, sociais e econômicos (OIE, 2015).

Os oocistos eliminados junto as fezes são a principal fonte direta de infecção, principalmente por contaminação de água potável, alimentos, água de piscina, rios e lagos (FILHA SPÓSITO et al., 2009). Uma importante forma de contaminação é por meio de sua forma infectante, o oocisto, que é resistente e permanece infectante por longos períodos no ambiente e na água (GRACZYK et al., 2008; THOMPSON et al., 2008). A doença, tem grande prevalência na medicina veterinária e potencial para causar perdas econômicas significativas em países desenvolvidos e em desenvolvimento (REBOREDO-FERNANDEZ et al., 2015).

Surtos de criptosporidiose em animais estão associados a reservatórios públicos de água (LAKE et al., 2007; MEIRELES, 2010), não há monitoramento rotineiro para estes patógenos (GRACZYK et al., 2008). Estudos sugerem que a presença de animais próximos a estes locais esteja relacionada a tais episódios (GRACZYK et al., 2008; REBOREDO-FERNANDEZ et al., 2015).

Em indivíduos imunocompetentes a diarreia é auto limitante, e pode ter duração de dias ou semanas, enquanto que em pessoas imunocomprometidas a criptosporidiose é mais grave, e pode causar a desidratação intensa e má-absorção, condição que muitas vezes é fatal (JEX et al., 2008).

A doença pode causar sérios prejuízos econômicos às criações como retardo no crescimento, mortalidade e gastos com medicamentos (RIEUX et al.,

2013; VARGAS et al., 2014). Esta enfermidade Pode afetar vários lotes de animais, na maioria das vezes o tratamento não é eficaz, e o oocisto pode persistir no solo durante vários meses (VARGAS et al., 2014). Perdas econômicas também estão associadas à espécie (RIEUX et al., 2013).

Este trabalho tem como objetivo determinar a ocorrência da infecção por protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. através do método de Kinyoun em bezerros leiteiros em da região Sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram analisadas amostras fecais de terneiros leiteiros (n=85) dos municípios de Aceguá, Candiota, Hulha Negra e São Lourenço do Sul, RS, entre os meses de abril e julho de 2016. As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal, em animais com idade de 0 a 12 meses, independente de sexo ou raça. As propriedades foram escolhidas aleatoriamente dentro do município e respeitou-se um número mínimo de duas amostras fecais/fazenda e uma amostra de fezes/animal.

Os aspectos das fezes foram classificados em consistência firmes ou pastosas (sem diarreia) e líquidas ou semi-líquidas (com diarreia) (SILVERLAS et al., 2009). Todas as amostras foram acondicionadas em frascos plásticos e conservadas em solução de MIF (Merthiolate-Iodo-Formol), em temperatura de 2 a 8 °C. Primeiramente foi realizada a técnica de Ritchie et al. (1948) modificado por Young et al. (1979) para a sedimentação dos oocistos do parasito. Para isso, dois gramas de fezes foram homogenizados e liquefeitos em água destilada estéril. A partir desta solução, foram realizados os esfregaços em lâmina e subsequentemente corados pelo método de Kinyoun (HEALY et al., 1995). Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 85 amostras de fezes coletadas, 9,4% (n=08) eram diarreicas e 90,58% (n=77) foram classificadas como fezes normais ou não diarreicas.

Os resultados da identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros leiteiros na região sul do RS, através do método de Kinyoun demonstrado, respectivamente, na Tabela 1. Dos 85 exames fecais analisados, 13 (15,28%) observou-se a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em animais sem diarreia, houve a detecção de oocistos do parasito em 14,11% (n=12) das amostras de fezes, com maior evidencia em animais jovens que podem atuar como portadores assintomáticos do parasito.

Tabela 1. Ocorrência de oocistos do gênero *Cryptosporidium* spp. nas fezes de bezerros pelo método de coloração de Kinyoun

Animais	Com Diarreia	Sem Diarreia	Total
Positivos*	01 (1,17%)	12 (14,11%)	13 (15,28%)
Negativos**	07 (8,23%)	65 (76,47%)	72 (84,7%)
Total	08 (9,4%)	77 (90,58%)	85 (99,98%)

O diagnóstico para detecção de oocistos pelo método de coloração de Kinyoun identifica os oocistos de *Cryptosporidium* spp. com 4-6 µm com parede evidente e são corados por rosa claro a vermelho brilhante. Entretanto, a coloração pode ser variável: infecções em fase de recuperação, em particular, podem ter oocistos “fantasmas” não corados. Oocistos maduros podem ter esporozoítas visíveis (até 4). Este método é o mais fácil e prático e proporciona obtenção de registro permanente. Erros de diagnóstico podem acontecer, todavia, em decorrência da variabilidade nas colorações e confusão com artefatos (SILVA, 2006).

Analisando-se os resultados obtidos em 85 amostras de fezes pelo método de Kinyoun, observaram-se valores positivos compatíveis com os apresentados por Sumaray e Sandoval (2000) onde 22,1% bezerros leiteiros (n=58) das amostras foram positivas para *Cryptosporidium* spp. Outros resultados também foram compatíveis como a prevalência observados nos USA em animais jovens no Estado de Washington por Ongerth et al. (1989), 56% e em Idaho por Anderson et al. (1981), 75% em Maryland por Leek et al. (1984).

Os resultados encontrados nesse estudo, diferenciam dos analisados em 253 amostras fecais de bezerros bubalinos analisadas por Destro et al. (2014), 2,37% eram positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp., por Wade et al. (2000), que examinaram amostras de fezes de bovinos leiteiros jovens e adultos e registraram uma prevalência de 2,4% , através do método de Kinyoun.

4. CONCLUSÕES

Ressalta-se a importância epidemiológica da presença *Cryptosporidium* spp. nas fezes de bezerros clinicamente saudáveis, que disseminam os oocistos para outros animais e o homem.

5. 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).

DESTRO, K.C.; VIANA, R.B.; BENIGNO, R.N.M.; CHAVES, L. C. S.; PEREIRA; W. L. A. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros bubalinos no estado do Pará. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.81, n.4, p. 368-371, 2014

FAYER R., TROUT J.M., GRACZYK T.K.; LEWIS E.J. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post weaned and adult cattle on three Maryland farms. **Vet. Parasitol.**, 93:103-112, 2000.

GRAAF D.C., VANOPDENBOSCH E., ORTEGA-MORA L.M., ABBASSI H. & PEETERS J.E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **Int. J. Parasitol.**, 29:1269-1287, 1999.

HEALY, G. R.; GARCIA, L. S. Intestinal and Urogenital Protozoa. In: Murray, P. R.; Baron. et al. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington (D.C) ASM Press. 106: 1204-28, 1995.

JEX, A. R.; PANGASA, A.; CAMPBELL, B.E.; WHIPP, M.; HOGG, G.; SINCLAIR, M.I.; STEVENS, M.; GASSER, R.B. Classification of *Cryptosporidium* Species from Patients with Sporadic Cryptosporidiosis by Use of Sequence-Based Multilocus Analysis following Mutation Scanning. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2252-2262, 2008.

MORAES, R.Q. et al. Presença de *Cryptosporidium* sp e 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, A2.1994. Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1994. P 79.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis* in Man and Animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

ORTOLANI, E.L. Padronização da técnica de Ziehl-Neelsen para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*: estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em bezerros de rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. 1988. 85f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

PÉREZ-CORDÓN, G., ROSALES-LOMBARDO, M.J., SÁNCHEZ-MORENO, M. Procesamiento de muestras fecales en el estudio de *Cryptosporidium* sp. Mediante PCR. **Revista Peruana de Biología**, 12: 158-160, 2005.

PETERSEN C. Cellular biology of *Cryptosporidium parvum* . **Parasitology Today** 9:87-91,1993.

RITCHIE LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bulletin of the United States Army Medical Department. 1948;(8):326.

SILVERLAS C., EMANUELSON U., VERDIER K. & BJORKMAN C. Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. **Prev. Vet. Med.** 90:242-253,2009.

SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA, S.M. **Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal**, São Paulo, v.71, n.1, p.17-19, jan./jun., 2009

VERGARA C. & QUÍLEZ J. Criptosporidiosis: una zoonosis parasitaria. **MVZ-Córdoba**, 9(1):363-372, 2004.

WADE, S.E.; MOHAMMED, H.O.; SCHAAF, S.L. Prevalence of *Giardia* sp. *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* (syn. *C. muris*) [correction of *cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris*-*C. andersoni*] in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. **Veterinary Parasitology**, v.93, n.1, p.1-11, 2000.