

Frequência de oocistos de coccídios do gênero *Cryptosporidium* em ovinos no estado do Rio de Janeiro

Frequency of oocysts of "Cryptosporidium" coccidia in sheep in the Rio de Janeiro State

COSENDEY, Rachel Ingrid Juliboni¹; FIÚZA, Vagner Ricardo da Silva¹; TEIXEIRA, Carina Santos¹; OLIVEIRA, Francisco Carlos Rodrigues de¹

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Clínica de Grandes Animais Domésticos, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

*Endereço para correspondência: rjuliboni@hotmail.com

RESUMO

A frequência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi investigada em 10 rebanhos ovinos no estado do Rio de Janeiro em 2007. Amostras fecais de 130 ovinos foram coletadas para identificar oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Verificou-se que 41% dos animais estavam infectados pelo protozoário, não sendo observadas diferenças significativas ($P=0,1728$, $P=0,7082$ e $P=0,2850$ e $P=0,4997$) com relação a sexo, idades dentro do sexo e classes zootécnicas, respectivamente. Distintos tamanhos e formas dos oocistos revelaram a existência de espécies diferentes de *Cryptosporidium* spp. parasitando estes ovinos, de modo que o adensamento dos animais observados nas criações intensivas foi determinante fator de risco na infecção.

Palavras-chave: protozoário, ovelha, Ziehl-Neelsen modificada

INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos oportunistas, de localização intracelular obrigatória, que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos respiratório e gastrointestinal em animais domésticos e silvestres e no homem. O primeiro relato de infecção por parasita do gênero *Cryptosporidium* foi feito por Ernest Edward Tyzzer, em 1907, que descreveu o parasitismo em glândulas

SUMMARY

The frequency of *Cryptosporidium* spp. oocysts was evaluated in 10 sheep herds in the Rio de Janeiro state in 2007. Faecal samples from 130 sheep were collected for the identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts by using the Ziehl-Neelsen modified technique. Statistical analysis showed that 41% of the animals were infected with this protozoa and no significant differences ($P = 0,1728$, $P = 0.7082$ and $P=0.2850$ and $P=0.4997$) were observed for sex, age between gender sex and animal class, respectively. Different sizes and shapes of *Cryptosporidium* oocysts indicated the probable existence of different species of *Cryptosporidium* in these animals, and the big number of the animals in the intensive creation is the determinant risk factor for the infection.

Keywords : ewe, protozoa, modified Ziehl-Neelsen

gástricas de camundongos, denominando-o *Cryptosporidium muris*. Em ovinos, a infecção por *Cryptosporidium* foi primeiramente descrita na Austrália em animais de uma a três semanas de idade, que apresentavam diarreia (BARKER & CARBONELL, 1974). Seu papel como um agente etiológico primário foi confirmado em experimentos realizados no início da década de 1980 (ANGUS et al., 1982; SNODGRASS et al., 1984). Desde então, o parasita tem representado importante papel na Síndrome da Diarreia Neonatal em

espécies domésticas e, atualmente, é associada a altos níveis de morbidade.

No Brasil, este parasita foi demonstrado em trabalhos realizados com bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro (EDERLI, 2002; ALMEIDA, 2006). O Norte Fluminense destaca-se como pólo de criação de ovinos no estado do Rio de Janeiro, no entanto, não existem estudos sobre coccídeo do gênero *Cryptosporidium*. Demonstrar a presença deste parasito em fezes de ovinos é importante, pois a infecção de várias espécies animais e do homem constitui um problema para a saúde pública. Neste trabalho verificou-se a ocorrência de coccídios do gênero *Cryptosporidium* em diferentes categorias zootécnicas e de ovinos criados nos municípios de Carapebus, São João da Barra e São Francisco do Itabapoana, no estado do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro a dezembro de 2007, foram realizadas coletas de fezes em 10 rebanhos ovinos, diretamente da ampola retal de 130 animais de ambos os sexos e idades variadas, em fazendas nos municípios de Carapebus, São João da Barra e São Francisco do Itabapoana.

As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos individualmente identificados e processadas no Hospital Veterinário da UENF (HV-UENF), no Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA).

A técnica de Ziehl-Neelsen (RITCHIE, 2002), modificada por Allen e Ridley (1970), foi utilizada para detecção de oocistos do gênero *Cryptosporidium*. Três gramas de fezes de cada amostra coletada foram inseridos em tubos plásticos cônicos de 15 mL, ao qual se adicionou formol a 10% até completar um volume de 10 mL. Depois de fixadas, as amostras foram

filtradas em camada dupla de gaze e cerca de 7 a 8 mL de cada solução foram transferidos para novos tubos cônicos de 15 mL, aos quais foram adicionados 4 mL de éter etílico, e submetidas à homogeneização em agitador e centrifugação a 500 g, por 10 minutos. Após esta etapa, foram visualizadas quatro diferentes fases, o sobrenadante foi descartado e os esfregaços em lâminas histológicas foram feitos com os sedimentos e o auxílio da ponta romba de palitos de madeira, executando-se movimentos circulares. As lâminas foram secas em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas, fixadas com metanol absoluto por cinco minutos e secas inclinadas, por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram coradas com solução de fucsina, por cinco minutos, logo após lavadas com álcool etílico a 50%, água corrente, submersas em álcool ácido a 3% por algumas vezes e posteriormente, lavadas em água corrente. Adicionou-se às lâminas uma solução de azul de metileno por três minutos, efetuando-se nova lavagem em água, e finalmente as lâminas foram secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita aplicando-se, aproximadamente, duas gotas de bálsamo-do-Canadá e lamínula sobre os esfregaços corados.

Os oocistos presentes nos esfregaços corados foram observados, identificados e mensurados utilizando-se microscópio óptico Zeiss - Axiostar Plus, com câmera digital Canon - PowerShot A640, para captura de imagens, e Software Zeiss AxionVision Sample Images, para análise de imagens em objetiva de 100X.

As medidas foram expressas em micrometros.

As medidas médias de diâmetro maior (DM), diâmetro menor (dm) e índice morfométrico (IM) dos oocistos foram submetidas à análise descritiva e as associações entre as frequências de oocistos nas fezes e sistemas de criação, categorias zootécnicas, sexo e idade dos animais foram analisadas pelo teste de

Fisher (Fisher Exact Test) e aproximação de Katz para intervalo de confiança de 95% utilizando-se o software GraphPad InStat[®], versão 3.05 for Windows[®].

RESULTADOS

Foram observados 53 (41%) animais positivos para oocisto de *Cryptosporidium* spp. nas fezes, não se verificando relação do parasitismo com o sexo dos ovinos examinados (Tabela 1).

A faixa etária dos animais dentro do sexo também não representou risco na infecção por *Cryptosporidium* spp. nos ovinos pesquisados (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças significativas ($P=0,4997$) para a presença de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de ovinos Santa Inês, em diversas categorias zootécnicas (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A frequência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de ovinos criados no norte do Estado do Rio de Janeiro (41%) pode ser considerada alta em comparação às observadas em outros países como: Espanha, 15% (MATOS-FERNANDES et al., 1994), Canadá, 24% (OLSON, 1997); e Polônia, 10% (MAJEWSKA, 2000) – porém bem menor que os 77% verificados nos Estados Unidos por Santín et al. (2007).

Se for comparada a técnica adotada nesta pesquisa e nas demais pesquisas citadas à utilizada por Santín et al. (2007), que utilizaram a PCR no diagnóstico, técnica mais sensível que Ziehl-Neelsen modificada, a frequência para esta parasitose em ovinos do estado do Rio de Janeiro pode ser ainda maior. Deve-se, no entanto, considerar que a técnica de PCR, apesar de sua alta sensibilidade, haja vista a detecção de até um oocisto em amostras

fecais (PÉREZ-CORDOM et al., 2005), ainda é muito cara, devendo ser utilizada para identificação de espécies com intuito de se determinar a fonte de infecção (MORGAN et al., 2000), optando-se pelo Ziehl-Neelsen modificado em trabalhos epidemiológicos.

Santin et al. (2007) ressaltaram que a prevalência de *Cryptosporidium* pode ser subestimada nas técnicas de microscopia e molecular, que permitem a coleta de uma única amostra de fezes por animal. Desta forma, coletas durante períodos diferentes e com repetições podem avaliar melhor a presença de *Cryptosporidium* nas fezes de ovinos em diferentes fases de criação.

No Brasil, na microrregião de Campos dos Goytacazes, Ederli (2002) demonstrou que 96% das 27 propriedades analisadas foram positivas para o parasita em estudo, sendo que, das 211 amostras coletadas de bezerros, 43,6% foram positivas. Nesta mesma região, Almeida (2006) verificou que, de 100 amostras coletadas, 61% foram positivas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada e pela técnica de PCR, *Cryptosporidium parvum* foi diagnosticado em 84,61% das propriedades e em 45% dos bezerros examinados.

A idade, neste estudo, não interferiu na probabilidade da infecção pelo protozoário, o que reforça os achados de Alonso-Fresán et al. (2005), que não observaram correlação entre a prevalência do protozoário e a idade dos ovinos. No Chile, Valenzuela et al. (1991) e Gorman et al. (1990) detectaram prevalências de 3,5 e 7,9%, respectivamente, em ovinos, sem diferença estatística entre as categorias, resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa. Contudo, Majewska et al. (2000) verificaram, em amostras fecais utilizando a técnica de Ziehl-Neelsen modificada, que os ovinos jovens apresentavam-se mais parasitados que os adultos. Ryan et al. (2005), na Austrália, analisando 500 amostras de fezes de ovinos por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), também observaram maior prevalência (26,2%) nos jovens.

Tabela 1. Frequência de machos e fêmeas de ovinos Santa Inês parasitados com oocistos de *Cryptosporidium* spp., detectados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, procedentes dos municípios de Carapebus, São João da Barra e São Francisco do Itabapoana, no estado do Rio de Janeiro

Variáveis	Animais			χ^2	Valor de P ^a	Risco relativo (Rr)	Intervalo de confiança (95%) ^b
	Positiva	Negativa	Total				
Machos	12(31%)	27(69%)	39(30%)	-	-	-	
Fêmea	41(45%)	50(55%)	91(70%)	-	0,1728	0,6829	de 0,4049 a 1,152
Total	53(41%)	77(59%)	130(100%)				

^aPara o teste de Fisher.

^bCom aproximação de Katz.

Tabela 2. Risco relativo da presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de ovinos da raça Santa Inês parasitados com oocistos de *Cryptosporidium* spp. detectados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, procedentes dos municípios de Carapebus, São João da Barra e São Francisco do Itabapoana, no estado do Rio de Janeiro

Variáveis	Animais			Sexo	Valor de P ^a	Risco relativo (Rr)	Intervalo de confiança (95%) ^b
	Positiva	Negativa	Total				
Reprodutor	4(10%)	7(18%)	11(28%)	Machos	0,7086 ^a	1,273	de 0,4791 a 3,381
Borrego	8(21%)	20(51%)	28(72%)				
Total	12(31%)	27(69%)	39(100%)				
Periparto (gestante e amamentando)	10(11%)	17(19%)	27(30%)	Fêmeas	0,0285 ^a	0,6731	de 0,4856 a 0,933
Solteira (secas e borregas)	31(34%)	33(36%)	64(70%)				
Total	41(45%)	50(55%)	91(100%)				

^aPara o teste de Fisher

^bCom aproximação de Katz.

Tabela 3. Número de ovinos Santa Inês parasitados com oocistos de *Cryptosporidium* spp., detectados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, procedentes dos municípios de Carapebus, São João da Barra e São Francisco do Itabapoana, no estado do Rio de Janeiro

Propriedades	Machos			Fêmeas			Total (+/-)
	Reprodutor	Borrego	Gestante	Amamentando	Secas	Borregas	
	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	
A	1/0	2/1	-	-	-	4/2	7/3
B	0/1	3/0	1/0	-	2/1	1/1	7/3
C	1/0	0/3	-	-	4/1	0/1	5/5
D	0/1	0/6	-	0/1	0/7	3/2	3/17
E	1/0	0/1	1/1	-	2/4	-	4/6
F	0/1	-	-	-	7/1	1/0	8/2
G	1/0	0/2	-	1/0	0/3	0/3	2/8
H	0/1	0/3	0/1	1/6	1/6	1/0	3/17
I	0/2	3/3	2/3	-	1/0	1/0	7/8
J	0/1	0/1	-	4/5	3/1	-	7/8
Total	4/7	8/20	4/5	6/12	20/24	11/9	53/77

Teste χ^2 (P=0,4997) para avaliação nas colunas e intervalo de confiança de 95%.

Mais recentemente, Santin et al. (2007), em Maryland, obtiveram por PCR maior prevalência de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de cordeiros (77,4%) do que em ovelhas do primeiro ao terceiro dia pós-parto (25%).

Foi observada diferença extremamente significativa quanto ao sistema de criação, onde os ovinos mantidos em regime intensivo apresentaram maiores riscos de infecção por *Cryptosporidium* spp. Em razão da inadequada higiene das instalações, frequentemente, o ambiente tornava-se sujo e úmido, o que favorecia a presença do

protozoário, aumentando assim o número de animais infectados. Com relação à morfometria, a forma principal dos oocistos foi observada pela comparação do DM, dm e IM, por intermédio da técnica de Ziehl-Neelsen modificada, obtendo-se respectivas médias de $4,48 \pm 0,82$ (6,88-3,02), $3,84 \pm 0,71$ (6,41-2,80) e $1,18 \pm 0,12$ (1,60), com ($P < 0,0001$) observado por regressão linear da razão do maior diâmetro sobre o menor (Figura 1).

As frequências com relação às criações intensivas e semi-intensivas foram obtidas pelo teste Fisher (Tabela 4).

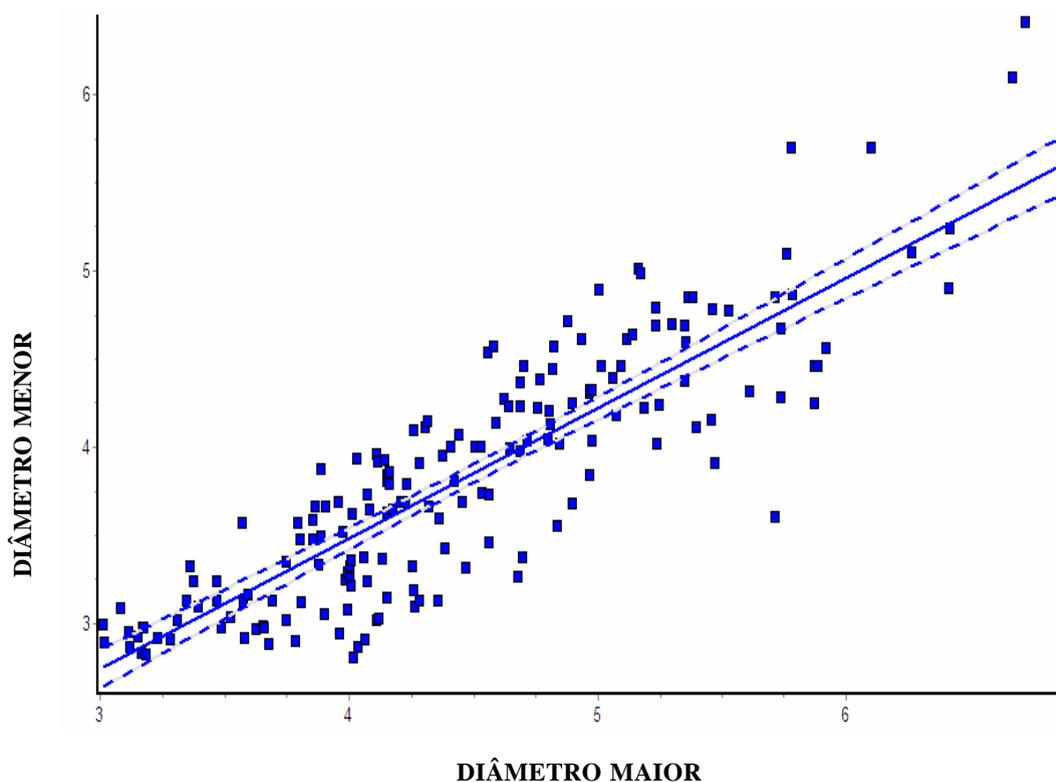


Figura 1. Regressão linear do diâmetro maior sobre o diâmetro menor para 177 oocistos de *Cryptosporidium* spp., identificados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Diferença estatística significativa ($P < 0,0001$), em que $Y = 0,5153 + 0,7406X$, $R^2 = 0,7378$ e $r = 0,8590$

Tabela 4. Frequência em relação ao tipo de criação de ovinos da raça Santa Inês parasitados com oocistos de *Cryptosporidium* spp., detectados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, procedentes dos municípios de Carapebus, São João da Barra e São Francisco do Itabapoana, no estado do Rio de Janeiro

Sistema	Animais			c ²	Valor de Risco relativo (Rr)	Intervalo de confiança (95%) ^b
	Positiva	Negativa	Total			
Intensivo	24(18%)	16(12%)	40(31%)	-		
Semi-intensivo	29(22%)	61(55%)	90(69%)	0,0038	1,862	de 1,258 a 2,757
Total	53(41%)	77(59%)	30(100%)			

^aPara o teste Fisher.

^bCom aproximação de Katz.

A forma elipsoidal dos oocistos de *Cryptosporidium* foi a mais observada nos esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, confirmada pelo IM e pelo valor de “r” obtido por regressão linear (Figura 1). A inclinação da reta de regressão é o melhor parâmetro para se avaliar a forma dos oocistos (OLIVEIRA et al., 2002). Segundo esses pesquisadores, a regressão linear serve também para identificar a projeção linear da distribuição dos oocistos e, assim, diferenciar variações de oocistos dentro de uma mesma espécie e de oocistos pertencentes a espécies diferentes em um mesmo gênero. O fato de, nesta pesquisa, terem sido observados distintos tamanhos e formas de oocistos e uma distribuição significativa dos mesmos na reta de regressão (P< 0,0001) pode ser indicativo de que os ovinos foram parasitados por distintas espécies e que dentro de uma mesma espécie os oocistos apresentaram tamanhos diferentes, mas permaneceram com o formato característico da espécie, comprovado pela inclinação da reta (Figura1).

Ovinos criados sob sistemas intensivo e semi-intensivo na região Norte Fluminense foram parasitados por espécies distintas *Cryptosporidium* spp, mas não houve predisposição para o parasitismo com relação a sexo, idades

dentro do sexo e classes zootécnicas. Porém, os animais mantidos em regime intensivo apresentaram maior risco de infecção.

REFERÊNCIAS

ALLEN, A.V.H.; RIDLEY, D.S. Further observations on the formol etherconcentration technique parasites. **Journal of clinical pathology**, v.23, p.545-546, 1970.

ALMEIDA, A.J. **Diagnóstico e fatores de risco da Criptosporidiose bovina na microrregião de Campos dos Goytacazes – RJ, e identificação de *Cryptosporidium parvum* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. 2006. 80f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

ALONSO-FRESAN, M.U.; GARCIA-ALVES, A.; SALAZAR-GARCIA, F.; VAZQUEZ-CHAGOYA, J.C.; PESACADOR-SALAS, N.; SALTJERAL-OAXACA, J. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in a asymptomatic sheep in family flocks from Mexico State. **Journal of Veterinary Medicine**, v.52, p.482-483, 2005.

ANGUS, K.W.; TZIPORI, S.; GRAY, E.W. Intestinal lesions in SPF lambs associated with *Cryptosporidium* from calves with diarrhoea. **Veterinary pathology**, v.19, p.67-68, 1982.

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. **Parasitology Research**, v.44, p.289-298, 1974.

EDERLI, B.B. **Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* sp. em bezerros da microrregião de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro**. 2002. Dissertação (Mestrado em Produção Animal)– Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

GORMAN, T.; ALCAÍNO, H.; MANDRY, P. Criptosporidiosis em ovinos y caprinos de la zona central de Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.22, p.155-158, 1990.

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 pathology**, v.89 p.269-275, 2000.

MATOS-FERNANDEZ, M.J.; ORTEGA-MORA, L.M.; PEREIRA-BUENO, J. Epidemiologia de la criptosporidiosis en el ganado ovino y caprino de la montana de León. **Veterinary medicine**, v.11, p.147-52, 1994.

MORGAN, U.N.; XIAO, L.; MONIS, P.; FALL, A.; IRWIN, P.J.; FAYER, R.; DENHOLM, K.M.; LIMOR, J.; LAL, A.; THOMPSON, R.C.A. *Cryptosporidium* spp. in domestic dog: the “dog” genotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2220-2223, 2000.

OLIVEIRA, F.C.R.; LOPES, C.W.G.; MASSAD, F.V.; MELO, P.S. Influência da infecção por *Cystoisospora ohioensis* (DUBEY, 1975) no ganho de peso de camundongos albinos. **Revista da Universidade Rural**, v.11 p.103-107, 2002.

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

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. **Bulletin United States Army Medical Department**, v.8, p.187-197, 2002.

PÉREZ-CORDÓN G.; ROSALES MJ, SÁNCHEZ-MORENO M. Processing of fecal samples for study of *Cryptosporidium* sp. by PCR. **Revista peruana de biología**, v.12, p.158-160, 2005.

RYAN, U.M.; BATH, C.; ROBERTSON, I.; READ, C.; ELLIOT, A.; MCINNES, L.; TRAUB, R.; BESIER, B. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. **Applied and environmental microbiology**, v.71, p.4992-4997, 2005.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R.
Prevalence and molecular characterization
of *Cryptosporidium* and *Giardia* species
and genotypes in sheep in Maryland.
Veterinary pathology, v.146, p.17-24,
2007.

SNODGRASS, D.R.; ANGUS, K.W.;
GRAY, E.W. Experimental
cryptosporidiosis in germ-free lambs.
Journal of comparative pathology, v.94,
p.141-152, 1984.

VALENZUELA, G.; SCI, M.V.;
GRANDÓN, W.; QUINTANA, I.;
TADICG, T.M. Prevalencia de
Cryptosporidium spp. em corderos
muertos em La província de Valdivia,
Chile. **Archivos de Medicina
Veterinaria**, v.23, p.81-83, 1991.

Data de recebimento: 25/01/2008

Data de aprovação: 20/10/2008