

OOCISTOS DE *Cryptosporidium* SPP. ISOLADOS DE BEZERROS BOVINOS: PLEOMORFISMO EM RELAÇÃO À METODOLOGIA DE DIAGNÓSTICO*

CARINA DOS S. TEIXEIRA¹; ADRIANA J. DE ALMEIDA²; FRANCISCO CARLOS R. DE OLIVEIRA²

ABSTRACT:- TEIXEIRA, C.S.; ALMEIDA, A.J. DE; OLIVEIRA, F.C.R. DE. [Oocysts from *Cryptosporidium* spp. isolated from cattle: Pleomorfism in relationship to diagnosis methodology]. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. isolados de bezerros bovinos: Pleomorfismo em relação à metodologia de diagnóstico. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 230-233, 2008. Laboratório de Sanidade Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-600, Brazil. E-mail: jardim@uenf.br

The aim of this study was to analyze the pleomorfism of *Cryptosporidium* spp. oocysts isolated from calves' feces throughout the comparison of two diagnostic techniques. One hundred of cattle feces were collected and the samples were submitted to both flotation sucrose centrifugation and to Ziehl-Neelsen modified tests. The results obtained showed a statistically significant reduction on the size of the *Cryptosporidium* oocysts observed through Ziehl-Neelsen technique when compared to the flotation sucrose centrifugation technique, and that the difference on the diameter of the oocysts suggests the there were different species of *Cryptosporidium* circulating in the animals analyzed.

KEY WORDS: *Cryptosporidium*, bovine, pleomorfism, oocysts.

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o pleomorfismo dos oocistos do Gênero *Cryptosporidium* isolados de fezes de bezerros bovinos, através da comparação de duas técnicas de diagnóstico. Foram coletadas 100 amostras de fezes de bezerros, sendo que as mesmas foram submetidas às técnicas de Ziehl-Neelsen modificada e de centrífugo-flutuação em solução de sacarose. Os resultados revelaram que houve significativa redução no tamanho dos oocistos observados após a técnica de Ziehl-Neelsen modificada em relação aos parasitos observados após a técnica de centrífugo-flutuação em solução de sacarose, e que a extrema diferença de diâmetro entre os oocistos permite inferir a existência de diferentes espécies de *Cryptosporidium* circulantes nos animais analisados.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium*, bovino, pleomorfismo, oocisto.

INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* possuem 4 esporozoítas, diferentemente de outros coccídios que contém esporozoítas dentro de esporocistos (STERLING; ARWOOD, 1992). Esses parasitas possuem grande capacidade de reprodução e disseminação, sendo várias espécies conhecidas por infectar diferentes espécies de animais (GRAAF et al., 1999).

A criptosporidiose é capaz de causar depressão leve a moderada, febre, diarreia aquosa e desidratação (ANDERSON; BULGIN, 1981). Os sinais clínicos mais severos têm sido associados a pessoas e a animais comprometidos imunologicamente, incluindo indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida ou de outras viroses, mal nutridos, consumidores de medicamentos imunossupressores e provavelmente fêmeas prenhes (UNGAR et al. citado por FAYER et al., 1998).

Diversas espécies de *Cryptosporidium* foram citadas, e diferenças quanto ao tamanho e ao formato dos oocistos das variadas espécies foram relatadas e discutidas por diversos autores (UPTON; CURRENT, 1985; REDUKER et al., 1985; ENEMARK et al., 2002).

Diferenças na forma ou na estrutura interna dos oocistos podem ser observadas com o auxílio de um microscópio de

* Sob os auspícios da Faperj.

¹ Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

² Laboratório de Sanidade Animal, CCTA, UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-600, Brasil. E-mail: jardim@uenf.br e foliveira@uenf.br

alta resolução. Embora a análise morfométrica seja uma boa forma de diagnóstico, a dificuldade em identificar oocistos surge quando o tamanho, forma ou estruturas internas de umas espécies não podem ser distinguidas de outras, como é o caso das espécies de *Cryptosporidium* (FAYER et al., 2000).

Esse trabalho de pesquisa teve como objetivo a avaliação do pleomorfismo dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. isolados a partir de amostras fecais de bezerros bovinos, através de 2 diferentes técnicas de diagnóstico (Ziehl-Neelsen modificada e Centrífugo-flutuação em sacarose), a partir de análises morfométricas realizadas em microscopia óptica e em microscopia de contraste de fase.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material

O estudo foi conduzido em propriedades de bovinos de corte e leiteiros, localizadas no Município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, selecionadas por conveniência. Amostras fecais de 100 bezerros bovinos com idade de até 12 meses (50 machos e 50 fêmeas) foram coletadas, também por conveniência, diretamente da ampola retal, utilizando-se sacos plásticos descartáveis. Essas foram identificadas individualmente e encaminhadas ao Setor de Clínica Médica dos Grandes Animais Domésticos do Laboratório de Sanidade Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Análise Laboratorial

Inicialmente foram separados 15g de cada amostra fecal, as que foram diluídas em 50mL de água deionizada. Esta solução foi homogeneizada, filtrada em camada dupla de gaze e, posteriormente, em tamis com 325 malhas de aço por polegada. O filtrado foi centrifugado em tubos cônicos de 50mL a 2500g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspenso em água deionizada até alcançar um volume de 25mL. Então, foram adicionados 25mL de solução de sacarose (1,1g/mL) e após agitação, essa solução foi centrifugada a 250g por 20 minutos. Foram aspirados 4mL do sobrenadante e pipetados em tubos cônicos para centrifuga e adicionada água deionizada para que fosse obtido o volume final de 15mL. Essa solução foi centrifugada a 2500g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi ressuspenso em 500iL de água destilada. Uma gota foi examinada entre lâmina e lamínula para as análises morfológica e morfométrica dos oocistos utilizando-se o microscópio óptico binocular com contraste de fase, marca "TIME-IN", modelo "TIM 108" e ocular micrométrica "K-15X-PZO" em objetiva de 100x.

Adicionalmente, as amostras de fezes coletadas foram submetidas a Técnica de Ritchie (1948) modificada por Allen e Ridley (1970), como a seguir. Um grama de cada amostra de fezes foi fixado em solução de formol a 10% em 10 vezes o volume, após passagem em camada dupla de gaze. Eram recuperados cerca de 7 mL de cada solução e transferidos para tubos cônicos individuais de 15 mL, onde eram adicionados

4mL de éter etílico. Cada solução foi homogeneizada em agitador de tubos, que foram centrifugados a 500g por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante, foram feitos esfregaços em lâminas de vidro a partir dos sedimentos restantes. As lâminas foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), e observadas ao microscópio óptico, em objetiva de 100X sob imersão.

Análise Estatística

As medidas médias e os índices morfométricos dos oocistos foram submetidos à análise descritiva e submetidos ao Teste *t* de Student, com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o programa SAS (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das medidas do diâmetro maior (DM) e do diâmetro menor (dm) dos oocistos, feitos diretamente em microscopia de contraste de fase e através de esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, assim como a razão do diâmetro maior sobre o diâmetro menor (Índice Morfométrico – IM), estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Medidas em micrômetros de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros bovinos observados após concentração por centrífugo flutuação em solução de sacarose e pela técnica de Ritchie (1948) modificada por Allen e Ridley (1970) corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981).

	Medidas (µm)				Valor de P ¹
	n	Centrífugo -flutuação	n	Ziehl-Neelsen	
Diâmetro maior	153	4,27±0,72 (7,90-3,00)	94	2,55±1,94 (12,00-2,00)	< 0,0001
Diâmetro menor	153	3,81±0,65 (5,90-2,30)	94	2,06±1,25 (7,50-1,00)	< 0,0001
Índice morfométrico	153	1,13±0,12 (1,81-1,00)	94	1,21±1,15 (1,79-1,00)	0,0039

¹Teste *t* de Student.

Valores entre parênteses são as medidas máximas e mínimas observadas.

São observadas diferenças extremamente significativas quando se comparam as medidas de DM, dm e IM em exame direto em microscópio de contraste de fase e esfregaço de fezes coradas (Tabela 1). Estas diferenças caracterizam a redução do oocisto quando se utiliza a técnica de coloração (Figura 1 A), provavelmente pela fixação dos oocistos em formol a 10%. Cardozo et al. (2005), também observaram alterações na morfometria dos oocistos quando foram utilizadas técnicas de coloração, no entanto, a morfologia dos oocistos não se alterou já que não foi observada diferença estatística no IM por aqueles autores. Na presente pesquisa ocorreram alterações tanto no tamanho como na morfologia dos oocistos, visto que foram encontradas diferenças estatísticas também no IM (Tabela 1). Quanto à possibilidade das alterações morfo-

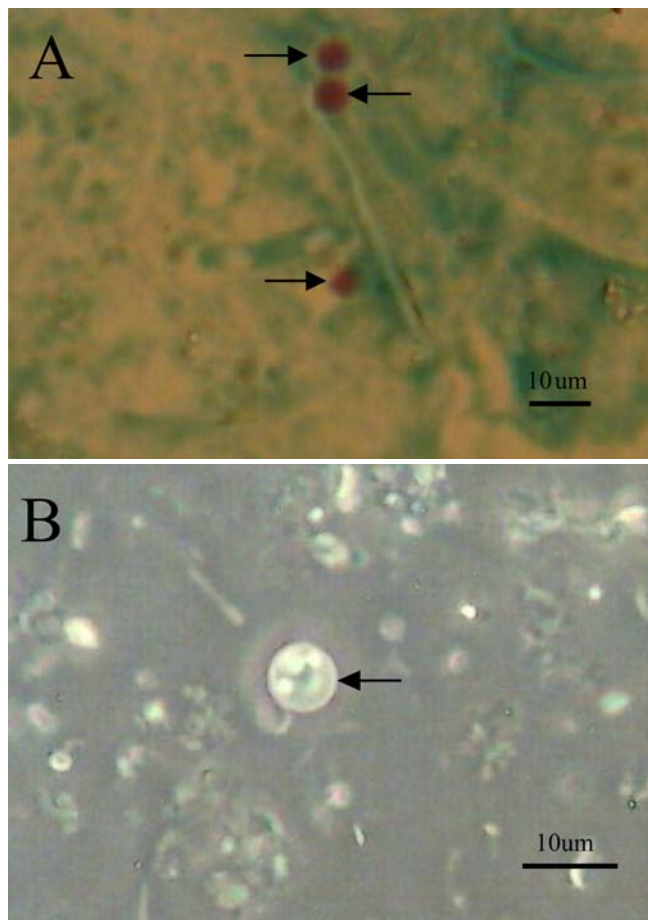


Figura 1. Oocistos do gênero *Cryptosporidium* observados em fezes de bezerros bovinos (→). (A) Técnica de Ziehl-Neelsen modificada e observação em microscopia óptica comum, (B) Isolamento por centrifugo-flutuação em solução de sacarose e observação em microscopia de contraste de fase destacando os núcleos dos esporozoítas dentro do oocisto.

lógicas e morfométricas observadas nessa pesquisa serem devido à fixação dos oocistos, não foram encontrados trabalhos referentes a essa hipótese. A comparação morfológica e morfométrica discutida por Cardozo et al. (2005) não levou em consideração a fixação do material, já que em todas as três técnicas utilizadas por esses autores as amostras foram previamente fixadas, inclusive a de centrifugo-flutuação e observação em campo brilhante, não podendo esta técnica ser comparada com a centrifugo flutuação e observação em contraste de fase da presente pesquisa onde os oocistos foram observados *in natura* (Figura 1 B), ou seja, sem fixação em solução de formol. A solução saturada utilizada nos oocistos fixados, provavelmente acarretou maior perda de líquido intracelular e conseqüentemente a redução de tamanho dos oocistos na pesquisa de Cardozo et al. (2005), ao contrário da preparação *in natura* que pode ter mantido o tamanho dos oocistos observados na presente pesquisa.

Com relação ao gênero *Cryptosporidium*, Ramirez et al. (2004), citam que os oocistos apresentam medidas entre 3 e 6 µm de diâmetro. Enemark et al. (2002), utilizando a técnica

de Ziehl-Neelsen modificada, relataram que as medidas dos oocistos de *C. andersoni* possuem medidas que variam de 7,3 (6,5-8,0) a 5,7 (5,0-7,0) µm. Park et al. (2006), ao estudar a morfometria de *C. parvum* e *C. hominis* em amostras provenientes de humanos através de centrifugo-flutuação em solução de sacarose, citam que as espécies *C. parvum* e *C. hominis* possuíam formato esférico e medidas que variam entre 4 e 6 µm. Reduker et al. (1985), utilizando microscopia eletrônica, citam que oocistos de *C. parvum* isolados de bezerros bovinos naturalmente infectados, apresentaram forma esférica e cerca de 3,5 x 4,0 µm de diâmetro, ao contrário de Upton e Current (1985), que relatam que os oocistos dessa espécie possuem 5,0 x 5,6 µm de diâmetro, e que a espécie *C. muris* apresenta em média 7,4 x 5,6 µm.

Nesse trabalho de pesquisa, o diâmetro maior encontrado teve como valor máximo 12,0µm e como valor mínimo, 2,00µm, ambos através da técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Os valores próximos a 3,00 µm, aliados ao índice morfométrico próximo de 1,00 são compatíveis a espécies de menor tamanho, como por exemplo, *C. parvum*, capaz de infectar bovinos, devido não somente ao tamanho, mas também ao formato esférico dos oocistos dessa espécie. Por outro lado, os valores médios próximos a 7,00 µm com índices morfométricos distantes de 1,00 indicam a presença de outra espécie, já que essas medidas aliadas ao formato oval do oocisto são incompatíveis às espécies *C. hominis* e *C. parvum*, ambas capazes de infectarem bovinos.

Portanto, pode-se inferir que as medidas dos oocistos encontrados apresentam tamanhos e formatos variados, sugerindo a existência de mais de uma espécie de *Cryptosporidium* circulante nos bezerros bovinos utilizados nessa pesquisa e que a variação de medidas para uma mesma espécie pode ocorrer devido a metodologia de diagnóstico, visto que, como observado nesta pesquisa há uma redução do tamanho do oocisto quando esses foram submetidos a técnica de coloração (Tabela 1 e Figura 1 A e B).

CONCLUSÕES

O pleomorfismo encontrado através da morfometria dos oocistos indica a possível existência de mais de uma espécie *Cryptosporidium* circulando entre os bezerros bovinos examinados. Adicionalmente, conclui-se que houve significativa redução no tamanho dos oocistos fixados em formol 10% e observados após a técnica de Ziehl-Neelsen modificada em relação aos parasitos obtidos após a técnica de centrifugo-flutuação em solução de sacarose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, A.V.H.; RIDLEY, D.S. Further observations on the formol ether concentration technique parasites. *Journal of Clinical. Pathology*, v. 23, n. 6, p. 545-546, 1970.
- ANDERSON, B.C., BULGIN, M.S. Enteritis caused by *Cryptosporidium* in calves. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician*, v. 76, n. 6 p. 865-868, 1981.

- CARDOZO, S. V.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. Transmissão experimental de *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) isolado de frango de corte à codorna japonesa (*Coturnix japonica*). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 14, n. 3, p. 119-124, 2005.
- ENEMARK, H.L.; AHRENS, P.; LOWERY, C.J.; THAMSBORG, S.M.; ENEMARK, J.M.D.; BILLE-HANSEN, V.; LIND, P. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterization. *Veterinary Parasitology*, v. 107, n. 1-2, p. 37-49, 2002.
- FAYER, R.; GASBARRE, L.; PASQUALI, P.; CANALS, A.; ALMERIA, S.; ZARLENGA, D. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 1, p. 49-56, 1998.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 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. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 8, p. 1269-1287, 1999.
- HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.L. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 22, n.3-4, p.594-596, 1981.
- PARK, J.; GUK, S.; HAN, E.; SHIN, E.; KIM, J.; CHAI, J. Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. Prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology*, v. 44, n. 1, p. 23-33, 2006.
- RAMIREZ, N.E.; WARD, L.A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and infection*, v. 6, n. 8, p. 773-785, 2004.
- REDUKER, D.W.; SPEER, C.A.; BLIXT, J.A. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high revolution scanning electron microscopy. *Journal of Protozoology*, v. 32, n. 4, p. 708-711, 1985.
- RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bulletin of the United State Army, Medicine Department*, v. 8, n. 1, p. 3-6, 1948.
- S.A.S User's Guide Statistics, inst., inc., Cary: SAS, 1998.
- STERLING, C.R.; ARROWOOD, M.J. Cryptosporidia. In: REIER, J.P. *Parasitic Protozoa*. New York: Academic Press, 1992 p. 159-225.
- UPTON, S.J., CURRENT, W.L. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *Journal of Parasitology*, v. 71, n. 5, p. 625-629, 1985.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.