

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS COLORAÇÕES DE ZIEHL-NEELENSEN MODIFICADO E SAFRANINA MODIFICADA NA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. (EUCOCCIDIORIDA, CRYPTOSPORIDIIDAE) A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS DE 0 A 3 MESES

COMPARISON OF EFFICIENCY OF STAINING WITH ZIEHL-NEELENSEN MODIFIED AND SAFRANIN MODIFIED IN DETECTION OF *Cryptosporidium* spp. (EUCOCCIDIORIDA, CRYPTOSPORIDIIDAE) FROM FECAL SAMPLES OF CALVES FROM 0 AND 3 MONTHS

Renata Dias Rodrigues^{1*}
Lara Reis Gomes¹
Rafael Rocha de Souza¹
Fernando Cristino Barbosa¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

* Autora para correspondência - renatavetufu@gmail.com

Resumo

A criptosporidiose bovina é causada principalmente por quatro espécies distintas: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ryanae* e *Cryptosporidium andersoni*. A espécie *Cryptosporidium parvum* (Ordem: Eucoccidiorida, Família: Cryptosporidiidae) é considerada de alto potencial zoonótico, podendo infectar humanos por intermédio da eliminação de oocistos tanto pelos bovinos quanto pelo próprio humano. O objetivo desta pesquisa foi verificar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros (75 machos e 77 fêmeas), tendo sido coletadas 152 amostras de fezes de animais do nascimento até os três meses de idade. O material foi submetido às técnicas de coloração de Ziehl-Neelsen modificado e Safranina modificada, as lâminas foram observadas em toda sua extensão ao microscópio óptico para a verificação da presença de oocistos desta enteroparasitose. Os resultados demonstraram 17,1% (26/152) de positividade no total das amostras examinadas e a análise estatística revelou não haver diferença entre o sexo e as técnicas de coloração utilizadas neste estudo. Conclui-se que a infecção por *Cryptosporidium* spp. esta presente nas propriedades avaliadas, porém são necessários mais estudos para que o risco de infecção seja mensurado adequadamente e medidas profiláticas implementadas.

Palavras-chave: enteroparasitose; ruminante; zoonose.

Abstract

Bovine cryptosporidiosis is caused by four different species: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni* and *Cryptosporidium ryanae*. The species *Cryptosporidium parvum* (Order: Eucoccidiorida, Family: Cryptosporidiidae) is considered of high zoonotic potential and it can infect humans through the elimination of oocysts by both cattle and by humans. The objective of this research was to detect oocysts of the genus *Cryptosporidium* spp. in fecal contents of calves (75 males and 77 females). We collected 152 stool samples from animals aged between 0 day and 3 months. The material was subjected to modified Ziehl-Neelsen and modified Safranin techniques, the slides were observed in its entire length by optical microscopy to verify the

presence of oocysts of this parasitic infections. The results showed 17.1% (26/152) positivity in the samples examined, and the statistical analysis showed no difference between sex and the staining techniques used in this study. We concluded the infection by *Cryptosporidium* spp. is present in the evaluated properties, but more studies are needed, so that the risk of infection is measured properly and prophylactic measures are implemented.

Keywords: enteroparasitosis; ruminant; zoonosis.

Enviado em: 28 julho 2014

Aceito em: 19 novembro 2015

Introdução

A Criptosporidiose é uma doença causada por coccídeos da família Cryptosporidiidae; o gênero *Cryptosporidium* compreende 25 espécies e mais de 40 genótipos, sua ocorrência geográfica é mundial e afeta, principalmente, o trato gastrointestinal de mamíferos (incluindo o ser humano), aves, répteis, anfíbios e peixes. Atualmente, já são cerca de 150 espécies de animais que podem ser infectados^(1,2). A transmissão da criptosporidiose ocorre devido à ingestão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Ordem: Eucoccidiorida, Família: Cryptosporidiidae) em água e/ou alimentos contaminados e por meio do contato direto com material fecal de indivíduos infectados que estejam eliminando a forma infectante⁽³⁻⁹⁾.

Os bovinos podem ser infectados com pelo menos quatro espécies de *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ryanae* (anteriormente identificado com *Cryptosporidium* genótipo deer-like) e *Cryptosporidium andersoni*⁽¹⁰⁻¹²⁾. *Cryptosporidium parvum* é considerado a maior causa de diarreia em bezerros recém-nascidos⁽¹³⁾. Este genótipo também pode infectar outros mamíferos incluindo o ser humano, adquirindo potencial zoonótico. 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, a suscetibilidade do hospedeiro e, por fim, a idade à primeira infecção⁽¹⁴⁾.

O objetivo desta pesquisa foi verificar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros (machos e fêmeas) do nascimento até 3 meses de idade, por meio das técnicas de coloração Ziehl-Neelsen modificado e Safranina modificada.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido em cinco pequenas propriedades de criação de bovinos, com aptidão leiteira, localizadas no Município de Uberlândia-Minas Gerais. A escolha foi aleatória, não importando o tamanho e padrão tecnificado. As propriedades apresentavam condições de manejo semelhante, incluindo o sistema de duas ordenhas diárias. Os bezerros eram mantidos em piquetes coletivos, ou seja, sem divisão por faixa etária e bebedouros de uso comum. O período das coletas foi do mês de abril a julho de 2013.

As amostras de fezes foram obtidas de 152 bezerros do nascimento até 3 meses de idade, a coleta foi realizada diretamente da ampola retal, utilizando-se sacos plásticos descartáveis. Estes foram identificados individualmente e transportados em caixa de isopor com gelo reciclável até a Universidade Federal de Uberlândia - Laboratório de Patologia Clínica Veterinária onde as amostras foram processadas no mesmo dia.

Foram separadas aproximadamente 3 g de cada amostra fecal, as quais foram diluídas em 10 mL de água deionizada. Esta solução foi homogeneizada com auxílio do bastão de vidro, em seguida, verteu-se em tubo Falcon com capacidade de 15 mL, o material foi centrifugado a 3600 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a partir do sedimento foram feitos dois esfregaços finos em lâminas de vidro. Uma lâmina foi corada pela técnica de Ziehl-Neelsen modificado⁽¹⁵⁾ e a outra pela técnica da Safranina modificada⁽¹⁶⁾. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico em toda sua extensão

com aumento 1000x em objetiva de imersão. Para a comparação das técnicas de coloração e o sexo, utilizou-se teste não paramétrico (binomial para duas proporções), com nível de significância de 5% (Programa Bioestat – versão 5.3).

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) – registro nº 116/12.

Resultados

Das 152 amostras fecais analisadas, 12,5% (19/152) foram positivas na técnica Ziehl-Neelsen modificado e 7,8% (12/152) na técnica da Safranina modificada, sendo que cinco amostras (3,2%) foram positivas em ambas as técnicas de coloração (Tabela 1).

A prevalência geral de *Cryptosporidium* spp. neste estudo foi de 17,1% (26/152), independente de a amostra ter sido positiva em uma ou em ambas as técnicas. Quanto ao sexo, não foi verificado diferença estatística (Tabela 2).

Tabela 1: Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros de 0 a 3 meses, analisadas pelas técnicas de Ziehl-Neelsen modificado e Safranina modificada em animais procedentes de cinco propriedades no município de Uberlândia, MG

Propriedade	Nº amostras	Percentual de positividade	
		Ziehl-Neelsen modificado	Safranina modificada
01	19	4 (21,0%)	0 (0,0%)
02	22*	6 (27,0%)	4 (18,0%)
03	52*	4 (7,6%)	2 (3,8%)
04	28	1 (3,5%)	1 (3,5%)
05	31**	11 (35,4%)	5 (16,1%)
Total	152	26 (17,1%)	12 (7,8%)

* Uma amostra positiva nas duas técnicas

** Três amostras positivas nas duas técnicas

Tabela 2: Frequência de bezerros positivos para *Cryptosporidium* spp. quanto ao sexo, oriundos de cinco propriedades no município de Uberlândia, MG

Sexo	Examinados (n)	Positivo (n)	%	Z (valor)
Macho	75	13	17,3	0,4706
Fêmea	77	13	16,8	0,4706
Total	152	26	17,1	

Estatisticamente significativo $p < 0,05$.

Na Figura 1, observam-se oocistos de *Cryptosporidium* spp. apresentando a coloração púrpura intenso e o fundo da preparação corado em azul pela técnica de Ziehl-Neelsen modificado. Na Figura 2, o oocisto de *Cryptosporidium* spp. aparece corado em vermelho-alaranjado sobre um fundo uniforme corado em verde pela técnica da Safranina modificada.

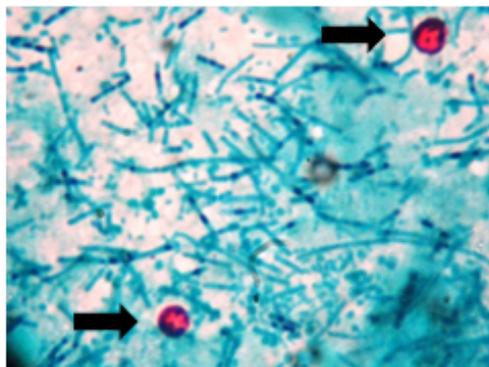


Figura 1: Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (seta) corado pela técnica de Zhiehl-Neelsen modificado. Aumento 1000x em objetiva de imersão. Uberlândia, 2013.

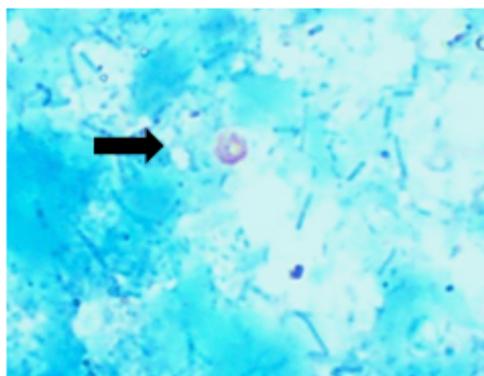


Figura 2: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. (seta) corado pela técnica da Safranina modificada. Aumento 1000x em objetiva de imersão. Uberlândia, 2013.

Discussão

No primeiro trabalho sobre a infecção de *Cryptosporidium* spp. em bovinos, no Brasil, Modolo et al. ⁽¹⁷⁾, na região de Botucatu (SP), encontraram 26% de bezerros menores que 30 dias positivos para esta coccidiose; já nos animais com mais de 30 dias o índice de positividade foi de 23%. A prevalência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos é bastante variada, os índices de positividade encontrados na literatura variam de 0,6 a 82,54%, existindo relato de até 100,0% de acometimento dos animais ⁽¹⁸⁻²⁰⁾. No presente estudo, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros encontra-se entre os valores observados em estudos conduzidos no Brasil, EUA, Hungria, Alemanha, Irlanda, Irã e Espanha, com a prevalência de 14,0% a 57,8% ^(11,21-25).

Essa variação na prevalência deve-se a inúmeros fatores, dentre eles: delineamento do estudo, idade dos animais, número de amostras por propriedade e metodologia de diagnóstico empregada. Outro fator a ser considerado também é a dificuldade em se identificarem animais assintomáticos ou em período subclínico da infecção, por não eliminarem quantidade detectáveis de oocistos nas fezes ^(26,27). Quanto às técnicas de coloração utilizadas neste estudo, estas apresentam vantagens e desvantagens e não há um consenso entre os autores. Segundo Rigo et al. ⁽²⁸⁾, a técnica de Ziehl-Neelsen modificado é uma preparação que proporciona uma melhor visualização dos oocistos, sendo também indicada para o diagnóstico das infecções leves, quando o número de oocistos presentes nas fezes é baixo. Segundo Baxby et al. ⁽¹⁶⁾, a técnica da Safranina modificada é mais simples e mais rápida que a de Ziehl-Neelsen modificado e apresenta um bom contraste.

Quanto à faixa etária mais acometida, segundo Pohjola et al. ⁽²⁹⁾, ela se situa dentro da primeira semana de vida. Henriksen e Krough ⁽³⁰⁾ e Bhat et al. ⁽³¹⁾ afirmaram que a criptosporidiose é mais prevalente em bezerros de 4 a 30 dias. Entretanto, em estudo conduzido por Mtambo et al. ⁽³²⁾, a prevalência maior situou-se em bezerros com até três meses. Neste estudo, os animais estão compreendidos nesta faixa etária.

De acordo com Silva Júnior et al. ⁽³³⁾, o fornecimento de colostro após as seis primeiras horas de nascimento do bezerro aumenta por volta de quatro vezes o risco de infecção por *Cryptosporidium* spp., em relação aos animais que receberam o colostro nas primeiras seis horas de vida. Climeni et al. ⁽³⁴⁾ ressaltaram em seu estudo que a qualidade do colostro declina rapidamente após o nascimento do bezerro, bem como a própria capacidade deste animal de absorver as imunoglobulinas que irão conferir imunidade.

Segundo Almeida et al. ⁽³⁵⁾, a presença de reservatório artificial de água disponível para os animais (bebedouro) também é um fator de risco significativo para a presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bezerros, pois este pode ser um reservatório de oocistos, que permanecem, por sua vez, viáveis por longos períodos, além de resistirem a processos de filtração e cloração da água. Nas cinco propriedades estudadas, os bebedouros eram de uso comum de animais jovens e adultos, sendo um fator importante na contaminação e disseminação da doença entre os animais.

Nas propriedades deste estudo, foi observado que os animais eram mantidos em instalações coletivas e próximos aos currais, o que foi indicado por Silva Júnior et al. ⁽³³⁾ como um fator de maior risco para os bezerros, podendo estar expostos a uma maior carga de parasitos no ambiente. Sendo assim, pode-se inferir que o local onde os animais estão alocados são uma importante fonte de disseminação; portanto, a adoção de boas práticas de higiene na criação de bezerros pode reduzir o risco de infecção por *Cryptosporidium* spp. ^(36, 37).

Quanto ao sexo, este não exerceu influência sobre o índice de infecção por protozoários deste gênero, estando de acordo com Tarazona et al. ⁽³⁸⁾ que afirmaram que a infecção por *Cryptosporidium* spp. ocorre em indivíduos independentemente do sexo.

Conclusão

Conclui-se que a infecção por *Cryptosporidium* spp. está presente nas propriedades avaliadas, porém são necessários mais estudos, para que o risco de infecção seja mensurado adequadamente e medidas profiláticas sejam implementadas.

Referências

1. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*.2004,17(1):72-97.
2. Smith HV, Nichols RABC. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Experimental Parasitology*.2010,124(1):61-79.
3. Feng Y, Ortega Y, Ele G, Das P, MXu, Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V, Xiao L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*.2007,144(1-2):1-9.
4. Langkjaer, RB, Vigre, H, Enemark, HL, Maddox-Hyttel, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in denmark. *Parasitology*.2007,137(3):339-350.
5. Coklin T, Uehlinger FD, Farber JM, Barkema HW, O'handley M, Dixon BR. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. indairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*.2009,160(3-4):323-326.
6. Boyer DG, Kuczynska E. Prevalence and concentration of *Cryptosporidium* oocysts in beef cattle paddock soils and forage. *Food born Pathogens and Disease*.2010,7(8):893-900.
7. Chako CZ, Tyler JW, Schultz LG, Chiguma L, Beerntsen BT. Cryptosporidiosis in people: It's not just about the cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.2010,24(1):37-43.

8. Chalmers RM, Giles M. Zoonotic Cryptosporidiosis in the UK – Challenges for Control. *Journal of Applied Microbiology*.2010,109(5):1487-1497.
9. Dixon B, Parrington L, Cook A, Pintar k, Pollari F, Farber J. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. From beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*.2011,175(1-2):20-26.
10. Santín M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. Prevalence and age-related variation of cryptosporidium species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*.2004,122(2):103-117.
11. Fayer R, Santín M, Xiao L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology*.2005,91(3):624-629.
12. Fayer R, Santín M, Trout JM, Greiner E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1- to 2-year-old dairy cattle in eastern United States. *Veterinary Parasitology*.2006,135:105-112.
13. Wyatt CR, Riggs MW, Fayer R. Cryptosporidiosis in Neonatal Calves. *Clínicas Veterinárias da América do Norte: Animal Practice Food*.2010,26(1):89-103.
14. Lorenzo MJ, Bem B, Mendez F, Villacorta I, Ares-Mazar ME. *Cryptosporidium* spp. oocyst antigens recognized by sera from infected asymptomatic adult cattle. *Veterinary Parasitology*.1995,60(1-2):17-25.
15. Henriksen SA, Pohlenz JFL. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl- Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*.1981,22(3-4):594-596.
16. Baxby D, Blundell N, Hart CA. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of cryptosporidium oocysts in faeces. *Journal of Hygiene*.1984;93(2):317-323.
17. Modolo JR, Gonçalves RC, Kuchembuck MRG. Ocorrência de Criptosporidiose em Bezerros na Região de Botucatu-SP. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*.1988,10(1):9-10.
18. Souza JCP, LOPES CWG. Criptosporidiose em bezerros de rebanhos da bacia leiteira Sul-Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*.1995,4(1):33-36.
19. Cardoso JM, Silveira FL, Araújo AJUS, Carvalho JCC, Kanamura HY. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*.2008;17(supl.1):239-242.
20. Lima RCA, Aquino MCC, Inácio SV, Viol MA, Zucatto AS, Silveira Neto L, Oliveira BCM, Vasconcelos EM, Bresciani KD, Oliveira GP, Costa AJ. Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em bezerros (*Bos taurus* e *Bos indicus*) no município de Formiga, Minas Gerais – Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*.2013,34(6) supl.2:3747-3754.
21. Thompson HP, Dooley JSG, Kenny J, McCooy M, Lowery CJ, Moore JE, Xiao L. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in northern Ireland. *Parasitology Research*. 2007,100(3):619-624.
22. Broglia A, Reckinger S, Cacció SM, Nöckler k. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Veterinary Parasitology*.2008;154(1-2):8-13.
23. Quílez J, Torres E, Chalmers RM, Hadfield SJ, Del Cacho E, Sánchez-Acedo C. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008,74(19):6026-603.
24. Keshavarz A, Haghghi A, Athari A, Kazemi B, Abadi A, Mojarad N. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. *Veterinary Parasitology*. 2009,160(3-4):316-318.
25. Paz e Silva FM, Lopes RS, Araújo-Júnior JP. Identification of *Cryptosporidium* species. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*.2013,22(1):22-28.
26. Ramírez AD, Ramírez-Iglesias LN, Plaza RMG, Román R. Excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. durante el parto, em vacas mestizas de doble propósito. *Revista Científica*. 2002,12(Supl. 2):614-616.
27. Maddox-Hyttel C, Langkjaer RB, Enemark HL, Vigre H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-Occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*.2006,141(1-2):48-59.
28. Rigo CR, Franco RM. Comparação entre os Ziehl-Neelsen e Acid-Fast-Trichrome métodos modificados para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina*

Tropical.2002,35(3).209-214.

29.Pohjola S, Jokipii AMM, Jokipii L. Sporadic Cryptosporidiosis in a rural populations is asymptomatic and associated with contact to cattle. Acta VeterinariaScandinavica.1986,27(1):91-102.

30.Henriksen SA, Krough HV. Bovine Cryptosporidiosis in Denmark 1 - Prevalence, age distribution and seasonal variation. NordiskVeterinaer Medicin.1985,37(1):34-41.

31.Bhat AS, Juyal PD, Singh NK. Coprological investigation on neonatal bovine cryptosporidiosis in Ludhiana, Punjab. Journal of Parasitic Diseases.2013;37(1):114-117.

32.Mtambo MMA, Sebatwale JB, Kambarage DM, Muhairwa AP, Maeda GE, Kusiluka LJM, Kazwala RR. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in cattle and wildlife in Morogoro region, Tanzania. Preventive Veterinary Medicine.1997,31(3-4):185-190.

33.Silva Júnior FA, Carvalho AHO, Rocha CMBM, Guimarães AN. Fatores de risco associados   infec o por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. Pesquisa Veterinaria Brasileira.2011, 31(8):690-696.

34.Climeni BSO, Zanatta J, Samaroni M, Monteiro MV. Qualidade do Colostro Bovino. Revista Cientifica Eletr nica de Medicina Veterinária.2008(10):1-5.

35.Almeida AJ, Oliveira FCR, Teixeira C. Risco relativo da infec o por parasitos do g nero *Cryptosporidium* em bezerros bovinos no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.2008;17(supl.1):243-248.

36.Waele V, Speybroeck N, Berkvens D, Mulcahy G, Murphy TM. Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: Use of halofuginone lactate in two differential frearing systems. Preventive Veterinary Medicine.2010, 96(3-4):143-151.

37.Muhid A, Robertson I, Ng J, Ryan U. Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia. Experimental Parasitology.2011,127(2):534-538.

38.Tarazona R, Blewett DA, Carmona MD. *Cryptosporidium parvum* in infection in experimentally infected mice: infection dynamics and effect of immunosuppression. Folia Parasitologica. 1998,45(2):101-107.