

Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil

Prevalence of cryptosporidiosis in calves from Araçatuba region, São Paulo State, Brazil

Francisco Leydson Formiga Feitosa¹ Grazielle Massae Shimamura² Thaís Roberto²
Marcelo Vasconcelos Meireles¹ Caris Maroni Nunes¹ Paulo César Ciarlini¹
Alexandre Secorum Borges³

RESUMO

Avaliou-se a prevalência de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em amostras de fezes de 459 bezerros com até 30 dias de idade e em amostras de água e piso dos bezerreiros de 33 propriedades leiteiras na região de Araçatuba-Estado de São Paulo. A maior porcentagem de excreção de oocistos foi verificada em bezerros com faixa etária variando entre oito e 14 dias de idade (14,5%) sendo, a menor taxa (6,4%), detectada no grupo de animais mais velhos (22 a 30 dias de vida). Observaram-se, na amostragem total, valores positivos aproximados de 10,26% pelo ensaio de imunoadsorção enzimática e de 12,4% pelo teste de Sheather. As amostras de água foram negativas e duas de solo positivas.

Palavras-chave : criptosporidiose, *Cryptosporidium parvum*, bezerros.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the prevalence of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces samples from 459 calves up to 30 days old and from water and floor samples from 33 farmers from Araçatuba region – São Paulo. The higher percentage of oocysts excreted was observed in calves with 8 to 14 days old, and the lower was noted in the oldest animals group (22 to 30 days old). In total amostrage 10.26% were positive using enzyme-linked immunosorbent assay and 12.4% by the Sheather test. The water samples were negative and two of soil positive.

Key words : cryptosporidiosis, *Cryptosporidium parvum*, calves.

INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes (CHERMETTE & BOUFASSA-OUZROUT, 1988). Após sua primeira descrição em 1907 por TYZZER, a criptosporidiose foi considerada, até recentemente, uma enfermidade rara e oportunista, sendo poucos os relatos de casos associados à presença de sinais clínicos.

ANDERSON et al. (1982) ressaltaram a importância da criptosporidiose em termos de saúde pública descrevendo um caso em uma estudante de Medicina Veterinária que entrou em contato com bezerros portadores da criptosporidiose intestinal. Os sintomas, surgiram cinco dias após o contato inicial, consistindo de náusea, diarreia e febre, evoluindo para dor abdominal, calafrios e sudorese. Os exames de fezes realizados aos nove, dez e 11 dias foram positivos para *Cryptosporidium* sp., tornando-se negativos aos 13 dias.

Os resultados dos inquéritos epidemiológicos de criptosporidiose em bovinos são muito variáveis, no entanto é sabido que esta enfermidade determina alta morbidade. KIRPATRICK

¹Médico Veterinário, Doutor, Professor Assistente, UNESP, Campus de Araçatuba. E-mail: leydsonf@fmva.unesp.br. Endereço: Rua Clóvis Pestana, 793, 16050-680, Araçatuba, SP. Autor para correspondência.

²Acadêmico de Medicina Veterinária, Bolsista de Iniciação Científica, UNESP, Campus de Araçatuba

³Médico Veterinário, Doutor, Professor Assistente, UNESP, Campus de Botucatu.

(1985), revisando dezenas de trabalhos sobre o assunto, encontrou taxas de morbidade em bezerros variando entre 10 e 85%, com uma média de 25%. Em outro trabalho, GARBER et al. (1994), examinando amostras fecais de 7.369 bezerros provenientes de 1.103 fazendas, encontraram oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 652 (59,1%) das propriedades e em 1.642 (22,4%) dos animais estudados. Quase a metade dos bezerros com idade variando entre sete e 21 dias apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* sp. em suas fezes. A maior prevalência foi observada na época de verão. MALDONADO-CAMARGO et al. (1998), estudando 31 fazendas leiteiras em três estados do México, observaram que a idade dos bezerros foi fortemente associada ao grau de infecção por oocistos de *Cryptosporidium parvum*, já que os animais com 15 dias de idade possuíam as maiores taxas de infecção.

Segundo SANFORD & JOSEPHSON (1982), quanto piores forem as condições sanitárias encontradas no ambiente, principalmente nos bezerreiros, maior será o risco de contágio e aparecimento de doenças entre os bezerros. SIMENSEN (1982) detectou uma maior mortalidade, inclusive por diarreia, em bezerros criados em pisos inteiriços do que nos mantidos acima do solo e em pisos ripados, condições estas que permitiam um escoamento adequado das fezes, diminuindo o risco de infecção. ORTOLANI (1988) constatou uma menor frequência de criptosporidiose em bezerros mantidos em baias individuais do que em baias coletivas.

A contaminação do ambiente é geralmente alta pois, segundo ANGUS (1987), um bezerro chega a eliminar até 10 milhões de oocistos por grama de fezes. Nos últimos anos, houve uma maior preocupação com relação ao risco potencial de contaminação dos reservatórios de água de consumo por *C. parvum*. Recentemente, cerca de 400.000 pessoas da cidade de Milwaukee (Wisconsin, EUA) desenvolveram criptosporidiose em virtude da contaminação da água com oocistos de *Cryptosporidium* sp., demonstrando, mais uma vez, a importância desse protozoário como agente entérico e zoonótico (HOWARD & SMITH, 1999). DIETZ et al. (2000) afirmaram que a contaminação por *C. parvum* nos EUA em seres humanos está associada à ingestão de água e de comida contaminados, contato com animais e atendimento a crianças doentes.

O presente trabalho teve como objetivos estudar os índices de contaminação com oocistos de *C. parvum* da água consumida pelos moradores e propriedades onde foram colhidas as amostras de fezes dos bezerros. Procurou-se determinar, ainda, a prevalência da criptosporidiose em bezerros leiteiros

na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, considerando-se a faixa etária dos animais acometidos e o manejo adotado nas diferentes propriedades. A sensibilidade dos testes de concentração de Sheater e do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) para o diagnóstico de criptosporidiose em bezerros recém-nascidos foi também avaliada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Foram pesquisadas 33 propriedades na região de Araçatuba – Estado de São Paulo, onde foram colhidas 459 amostras de fezes de bezerros da raça Holandês, sem distinção de sexo, desde o primeiro dia de vida até os 30 dias de idade. Realizou-se a correlação entre o grau de infecção dos animais (taxa de oocistos nas fezes) e a idade dos animais. Para tal, os bezerros foram divididos em quatro lotes de acordo com a faixa etária: lote A (0 a 7 dias), lote B (8 a 15 dias), lote C (16 a 22 dias) e lote D (23 a 30 dias).

Para avaliar a correlação entre o grau de infecção dos animais (nº de oocistos nas fezes) e o manejo leiteiro adotado, considerou-se a classificação do tipo de leite produzido nas diferentes propriedades (leites A, B e C), obedecendo-se as normas do Ministério da Agricultura (Brasil, 1980).

Coleta de fezes

Aproximadamente 30g de fezes diretamente do reto foram colhidas, acondicionadas em frascos plásticos apropriados contendo dicromato de potássio a 2,5% e mantidas em temperatura de refrigeração de 4°C até serem analisadas.

Coleta de água dos bezerreiros e de residências

A água dos bebedouros de todos os bezerreiros pesquisados era agitada antes da colheita. Para tanto, utilizou-se um coletor estéril, o qual era mergulhado fechado e, em seguida, aberto quando posicionado no fundo do bebedouro, como recomendado por ORTOLANI (1988). Colheram-se cerca de 50mL de água. Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp., a mesma quantidade de água era obtida das casas dos moradores, diretamente do local onde a mesma era consumida.

Pesquisa de oocistos

Foram utilizados o teste de Sheather e o ELISA direto nas 459 amostras de fezes colhidas. As amostras de fezes e de água dos animais e de consumo humano foram coadas em tamis e centrifugadas. O sedimento resultante foi submetido à técnica de

concentração de oocistos: primeiramente à diluição da amostra em solução de Sheather e, posteriormente, homogeneização e centrifugação durante 10 minutos a 1500g, para observação de oocistos de *C. parvum*. Após a centrifugação, procedeu-se a leitura de três gotas do sobrenadante, entre a lâmina e lamínula, sob microscopia de contraste de fase, com o auxílio de ocular micrométrica. Foi utilizado o “kit” *C. parvum Antigen ELISA* (laboratório Morwell Diagnostics), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante.

Análises estatísticas

Para verificar as possíveis associações entre as diferentes variáveis estudadas e as proporções comparativas das diferentes categorias, foi realizado o teste Qui-Quadrado ou o teste de Fisher.

Os testes estatísticos foram considerados significativos quando $p < 0,05$, caso em que foram efetuados contrastes entre pares de médias pelo método de Tukey (ZAR, 1984).

Os dados obtidos foram analisados mediante o uso do programa SAS (Statistical Analysis System).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, todas as amostras de água de consumo dos trabalhadores e dos bezerros das diferentes propriedades leiteiras, colhidas e avaliadas, mostraram-se negativas para *C. parvum* tanto ao teste ELISA como ao teste de concentração pelo método de Sheather, o que demonstrou a inexistência de contaminação dos reservatórios por esse protozoário. A água consumida provém, exclusivamente, de poços, e 51,5% dos entrevistados asseguraram não dar nenhum tratamento à água consumida, enquanto 48,5% tomavam água filtrada ou clorada.

Nas propriedades leiteiras estudadas, os animais, em sua maioria, são criados em chão de terra batido (61,3%), o que facilita a contaminação do ambiente por patógenos específicos, eliminados, principalmente, pelas fezes e secreções nasais. Os resultados do presente estudo sugerem que a agregação e a superpopulação dos bezerreiros tornam-se, também, um aliado ou um agente facilitador para que tal contaminação e proliferação de microrganismos ocorram, já que a maior parte dos animais (66,04%) é criada em bezerreiros coletivos durante as fases iniciais de suas vidas, enquanto apenas 33,96% dos bezerros são separados ao nascimento.

Constatou-se, quando da interpretação dos dados epidemiológicos, que o maior número de

amostras de fezes positivas era proveniente das propriedades de leite tipos A e B, o que causou surpresa e muitas indagações, já que se esperava um menor índice de contaminação nas mesmas, por terem um melhor manejo sanitário do que as granjas de leite tipo C, como foi observado por ORTOLANI (1988). Uma hipótese para que um menor índice de positividade nos animais provenientes das propriedades de leite tipo C tenha ocorrido, pode residir no fato de que os mesmos são mantidos livres em piquetes amplos desde o nascimento, o que, presumivelmente, diminuiria a possibilidade de ingestão de oocistos presentes no ambiente, diferente dos animais machos das granjas leiteiras dos tipos A e B, que permanecem juntos em um espaço restrito e por um longo período de tempo. XIAO et al. (1993) observaram uma alta transmissão de *Giardia sp.* e *Cryptosporidium sp.* pelo contato boca a boca entre os bezerros, mesmo quando mantidos em gaiolas individuais. A contaminação dos pisos por oocistos de *C. parvum*, dos diferentes bezerreiros, foi verificada apenas em uma única propriedade de leite tipo B e em apenas uma das 31 granjas leiteiras de leite tipo C.

Bezerros mantidos em bezerreiros coletivos tiveram uma maior frequência de criptosporidiose do que animais mantidos separados (Tabela 1). Segundo BOUFASSA-OUZROUT et al. (1986), a transmissão dessa doença é aumentada quando há contato direto de animais susceptíveis com infectados ou quando este contato ocorre indiretamente pela exposição desses indivíduos susceptíveis a ambientes contaminados por *Cryptosporidium sp.*

Avaliando-se a importância da faixa etária na eliminação de oocistos (Tabela 2), comprovou-se que a maior taxa de excreção (14,5%) foi observada nos animais com até 14 dias de idade e a menor nos animais mais velhos (22 a 30 dias), estando parcialmente de acordo com os resultados publicados por HENRIKSEN & KROGH (1985), que encontraram, também, uma maior frequência em animais de 8 a 14 dias (24,8%) com baixa ocorrência durante a primeira

Tabela 1 – Frequência de animais positivos para *Cryptosporidium parvum* segundo o tipo de bezerreiro na região de Araçatuba, Estado de São Paulo.

Tipo de bezerreiro	Animais Positivos	
	n	%
Coletivo	35	66,04
Individual	18	33,96
Total	53	100

Tabela 2 – Teste de diferença entre duas proporções, com aproximação normal, para estudo da influência da faixa etária em relação a porcentagem de amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium parvum* pelo teste de Sheather.

Teste de Sheather	Faixa etária								Total	
	0 – 7 dias		8 – 14 dias		15 – 21 dias		22 – 30 dias			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Positivo	16	12,4a	19	14,5a	4	9,1a	5	6,4a	44	11,5a
Negativo	113	87,6a	112	85,5a	40	90,9a	73	93,6a	338	88,5a
Total	129	100	131	100	44	100	78	100	382	100

Letras iguais na mesma linha indicam a não existência de associação significativa ($p < 0,05$) entre os resultados

semana de vida e de UGA et al. (2000) que obtiveram uma maior quantidade de oocistos eliminada em animais com 15 dias de vida. Cerca de 30% dos animais positivos para *Cryptosporidium* apresentaram episódios diarreicos, enquanto a grande maioria (70%) era de portadores assintomáticos, taxa bem inferior à observada por ORLOLANI (1988). Da mesma forma que o observado por POHJOLA et al. (1986), a maioria dos animais portadores assintomáticos encontrava-se na faixa etária compreendida entre a primeira e segunda semanas de vida, demonstrando, com isso, a grande importância que têm os animais com até 15 dias de idade como fonte primária de contaminação ambiental e de infecção criptosporídica.

Analisando-se os resultados obtidos em 419 amostras de fezes pelo teste ELISA e em 459 amostras de fezes pela prova de concentração pelo método de Sheather, observaram-se valores positivos aproximados de 10,26% (69,8% em fezes normais e 39,2% em fezes diarreicas) e de 12,4% (73,7% em fezes normais e 26,3% em fezes diarreicas), respectivamente, porcentagens essas superiores às descritas por MTAMBO et al. (1997), que encontraram uma prevalência de 5,3% de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes de 486 bovinos da Tanzânia. Estes dados, no entanto, são semelhantes aos valores descritos por REYNOLDS et al. (1986), mas muito inferiores aos divulgados no trabalho de ORLOLANI (1988) que encontrou uma taxa de positividade de 38% em animais com até 60 dias de vida criados na região da grande São Paulo. A utilização de métodos laboratoriais que possuem elevada sensibilidade e especificidade, facilidade de execução e interpretação, bem como baixo custo, é de fundamental importância para a realização de um inquérito epidemiológico. A realização da prova de concentração de oocistos em solução de Sheather para observação dos oocistos de *C. parvum* e, com menor ênfase, o teste ELISA direto, apresentaram uma boa parte dessas características.

Uma das maiores desvantagens do método ELISA direto é o seu grande custo, já que o processamento das amostras de água e de fezes pelo mesmo só foi possível com a importação de um “kit” específico, tornando o seu uso, na rotina prática, economicamente inviável. Contudo, a sua utilização é justificável em um trabalho de pesquisa. Ambas as técnicas apresentaram uma excelente correlação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes de bezerros (Tabela 3), fato esse, também verificado por LINDERGARD et al. (2001), que obtiveram resultados satisfatórios quando da comparação dos dois testes.

CONCLUSÕES

Os animais com até 14 dias de idade apresentaram as maiores taxas de excreção e, conseqüentemente, de contaminação e infecção por *C. parvum*;

Todas as amostras de água consumida pelos trabalhadores e pelos animais mostraram-se negativas para *C. parvum*, não contribuindo, portanto, como fator predisponente ou determinante no aparecimento e manutenção da doença no plantel.

A grande maioria dos animais jovens é mantida em bezerreiros coletivos sendo, provavelmente, um dos fatores predisponentes

Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos por análise das amostras de fezes por meio do ELISA e de Sheather.

Resultado	ELISA		Teste de Sheather	
	n	%	n	%
Positivo	43	10,26	57	12,4
Negativo	376	89,74	402	87,6
Total	419	100,0	459	100,0

importantes para a instalação e ocorrência de criptosporidiose no rebanho;

Os testes ELISA e Sheather apresentaram excelente sensibilidade na detecção de oocistos de *C. parvum* em amostras de fezes de bezerros. O teste de Sheather, por sua precisão e baixíssimo custo, pode ser o método de escolha na rotina clínica para o diagnóstico da enfermidade em questão.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao aporte financeiro da FAPESP para a realização deste trabalho (Processo 99/03626-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B.C. et al. Cryptosporidiosis in a veterinary student. **J Am Vet Med Assoc**, Chicago, v.180, p.408-409, 1982.
- ANGUS, K.W. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. **In Practice**, London, v.9, p.47-49, 1987.
- BOLFASSA-OUZROUT, S.; CHERNETTE, R.; MEISSONIER, E. La Cryptosporidiose - une maladie animale et humaine cosmopolita. **Ser Tech off Int Epizooties**, Paris, v.5, p.1-97, 1986.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Departamento Nacional de inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, DF, 1980. 166p.
- CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. **Criptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man**. 2.ed. Paris : OIE, 1988. 122p.
- DIETZ, V. et al. Active, multisite, laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium parvum*. **Am J Trop Med Hyg**, v.62, n.3, p.368-372, 2000.
- GARBER, L.P. et al. Potential risk factor for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. **J Am Vet Med Assoc**, Chicago, v.205, n.1, p.86-91, 1994.
- HELMAN, R.G. Diagnosis of diseases of the digestive tract. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, Philadelphia, v.16, n.1, p.50-54, 2000.
- HENRIKSEN, S.A.; KROGH, H.V. Bovine cryptosporidiosis in Denmark. I. Prevalence, age distribution and seasonal variation. **Nord Vet Med**, Kopenhain, v.37, n.1, p.34-41, 1985.
- HOWARD, J.L.; SMITH, R.A. **Food animal practice**. Current Veterinary Therapy - 4. Saunders : Philadelphia, 1999. 766p.
- KIRKPATRICK, C.E. *Cryptosporidium* infection as cause of calf diarrhea. **Vet Clin North Am: Food Anim Pract**, Philadelphia, v.1, n.3, p.515-528, 1985.
- LINDERGARD, G. et al. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in soil samples by enzyme-linked immunoassay. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v.94, n.3, p.163-173, 2001.
- MALDONADO-CAMARGO, S. et al. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. **Prev Vet Med**, Amsterdam, v.36, n.2, p.95-107, 1998.
- MTAMBO, M.M.A. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp oocysts in cattle and wildlife in morozoro region, Tanzania. **Prev Vet Med**, Amsterdam, v.31, n.3-4, p.185-190, 1997.
- 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) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- POHJOLA, S.S. et al. Certain enteropathogens in calves of Finnish dairy herds with recurrent outbreaks of diarrhea. **Prev Vet Med**, Amsterdam, v.3, n.6, p.547-558, 1986.
- REYNOLDS, D.J. et al. Microbiologyn of calf diarrhoea in southern Britain. **Vet Rec**, v.119, n.1, p.34-39, 1986.
- SANFORD, S.A.; JOSEPHSON, G.K.A. Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves protozoal disease. **Can Vet J**, Ottawa, v.23, n.12, p.243-347, 1982.
- SIMENSEN, E. An epidemiological study of calf health and performance in Norwegian dairy herds. II Factor affecting mortality. **Acta Agri Scan**. Kopenhain, v.32, n.4, p.441-427, 1982.
- TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proc Soc Exp Biol Med**, Cambridge, v.5, p.12-13, 1907.
- UGA, S. et al. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyste shedding in calves in Japan. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 94, n.1-2, p.27-32, 2000.
- XIAO, L.; HERD, R.P.; RINGS, D.M. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v.51, p.41-48, 1993.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. Englewood : Cliffs: Prentice-Hall; 1984.