

Estudo preliminar da criptosporidiose nos ruminantes silváticos do Jardim Zoológico de Lisboa

A preliminary study of criptosporidiosis in ruminants from the Lisbon Zoo

E. Delgado^{1*}, I. Pereira da Fonseca², M. I. Fazendeiro², O. Matos³, F. Antunes³ e M. Barão da Cunha⁴

¹ Universidade de Évora, Departamento de Zootecnia, Pólo da Mitra, 7000 Évora.

² CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Pólo Universitário do Alto da Ajuda, Rua Prof. Cid dos Santos, 1300-477 Lisboa.

³ Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Rua da Junqueira 96, 1300 Lisboa.

⁴ Jardim Zoológico e de Aclimação de Lisboa, Estrada de Benfica, 158-160, 1500 Lisboa.

Resumo: Devido ao potencial zoonótico da criptosporidiose e à falta de informação relativamente à presença de *Cryptosporidium* spp. na população de ruminantes silvestres mantidos em cativeiro no Zoo de Lisboa, os autores estudaram amostras fecais colhidas mensalmente, num total de 388. O estudo decorreu entre Setembro de 1998 e Agosto de 1999. O processamento laboratorial das amostras incluiu métodos coprológicos convencionais, tendo sido realizados esfregaços fecais directos e após concentração de oocistos, corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, a utilização duma técnica comercial imunoenzimática (ELISA) e duma técnica de imunofluorescência directa com anticorpos monoclonais. Obtiveram-se 2,1% (8/388) de amostras positivas com os métodos do esfregaço fecal directo e após concentração de oocistos e com o método de imunofluorescência directa. O estudo morfométrico dos oocistos permitiram concluir que se tratava de *C. parvum*. Com o método imunoenzimático foram detectadas 3,6% (14/388) de amostras positivas. A presença de infecção e de diarreia foram mais frequentes nas amostras colhidas durante os meses de Inverno. Os resultados obtidos sugerem que os animais contaminados assintomáticos podem servir de reservatórios da doença, contribuindo para a sua disseminação.

Palavras-Chave: *Cryptosporidium parvum*, ruminantes silvestres em cativeiro, epidemiologia, diagnóstico coprológico.

Summary: Due to the zoonotic potential of criptosporidiosis and the lack of information regarding *Cryptosporidium* spp. infections in wild ruminants from the Lisbon Zoo, the authors studied faecal samples collected monthly, in a total of 388. The study began in September 1998 and lasted until August 1999. The laboratory methods used were the microscopic observation of direct faecal smears and after concentration of oocysts, stained with modified Ziehl-Neelsen, an immunofluorescent assay and an immunoenzymatic assay. The protozoan *C. parvum* was diagnosed in 2,1% (8/388) of the samples with the faecal smears and the immunofluorescent assay methods and in 3,6% (14/388) of the samples with the immunoenzymatic assay. The presence of diarrhea and the occurrence of infection were more frequent during the winter season. The results suggest that subclinically infected animals could serve as potential carriers of the disease, contributing to its dissemination.

Key-words: *Cryptosporidium parvum*, captive wild ruminants, epidemiology, coprological diagnosis.

Introdução

O volume de conhecimentos sobre os protozoários do género *Cryptosporidium* aumentou muito nas últimas décadas. Considerados protozoários pouco importantes que só parasitavam os animais, são hoje reconhecidos como oportunistas zoonóticos. O seu potencial de patogenicidade em indivíduos imunodeprimidos ou muito jovens é tal que chega a provocar a morte.

As infecções por *Cryptosporidium* são muito difíceis de controlar, devido à alta resistência das suas formas infectantes. Nos países desenvolvidos, onde existem elevados padrões higio-sanitários, ainda não se consegue evitar a contaminação das águas. Nos países em vias de desenvolvimento, devido às deficientes condições de higiene e ao estreito contacto com os animais, a prevalência da doença é mais elevada. A ausência de uma vacina e a inexistência de um tratamento eficaz contra a criptosporidiose constituem dois grandes obstáculos ao controlo desta doença.

A prevalência da infecção por *Cryptosporidium* nos doentes com SIDA em Portugal foi de 8% num estudo realizado em 1998 (Matos *et al.*, 1998). Investigações recentes revelaram a heterogeneidade das espécies zoonóticas de *Cryptosporidium*, o que complica a compreensão da relação entre a criptosporidiose humana e animal (Alves *et al.*, 2001).

O conhecimento da epidemiologia da criptosporidiose permite avaliar a extensão da infecção nos diferentes hospedeiros, calcular o risco de transmissão zoonótica e identificar as medidas de controlo mais adequadas. Interessa estudar as populações silvestres

* Correspondência: E. Delgado, Faculdade de Medicina Veterinária, Secção de Cirurgia, Pólo Universitário Alto da Ajuda, Rua Prof. Cid dos Santos, 1300-477 Lisboa. E-mail: esmeralda@fmv.utl.pt

em cativeiro não só como potenciais reservatórios do agente, mas também como hospedeiros onde a doença se manifesta com maior ou menor expressão clínica. O presente trabalho teve por objectivo contribuir para o conhecimento da criptosporidiose na população dos ruminantes silvestres do Jardim Zoológico de Lisboa.

Material e métodos

Estudaram-se 388 amostras fecais, colhidas mensalmente entre Setembro de 1998 e Agosto de 1999, de trinta e dois parques de animais.

As amostras provinham de 239 animais pertencentes a três famílias da Ordem *Artiodactyla*: *Cervidae*, *Giraffidae* e *Bovidae*. As espécies estudadas pertencentes à família *Cervidae* foram as seguintes: áxis (*Cervus axis axis*), veado do Canadá (*Cervus elaphus canadensis*), veado ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) e veado da Birmânia (*Cervus eldi thamin*). A espécie estudada pertencente à família *Giraffidae* foi a girafa de Angola (*Giraffa camelopardalis angolensis*). As espécies estudadas pertencentes à família *Bovidae* foram as seguintes: bisonte americano (*Bison bison bison*), gauro (*Bos gaurus gaurus*), iaque (*Bos mutus grunniens*), búfalo africano (*Syncerus caffer caffer*), pacaça (*Syncerus caffer nanus*), elande (*Taurotragus oryx oryx*), niala (*Tragelaphus angasi*), bongo (*Tragelaphus eurycerus isaaci*), sitatunga (*Tragelaphus spekei gratus*), kudo (*Tragelaphus strepsiceros strepsiceros*), addax (*Addax nasomaculatus*), vaca do mato (*Alcelaphus buselaphus caama*), gnu de cauda branca (*Connochaetes gnou*), boi-cavalo ou gnu azul (*Connochaetes taurinus taurinus*), damalisco dorcas (*Damaliscus dorcas dorcas*), palanca ruana (*Hippotragus equinus*), palanca negra (*Hippotragus niger niger*), cobo de crescente (*Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus*), redunca (*Redunca fulvorufula*), impala de face negra (*Aepyceros melampus petersi*), cabra de leque (*Antidorcas marsupialis marsupialis*), cercicapra (*Antilope cervicapra*), gazela dorcas (*Gazella dorcas*), muflão africano (*Ammotragus lervia*), muflão da Córsega (*Ovis musimon musimon*), cobo de leite (*Kobus leche leche*), órix de Cimitarra (*Oryx dammah*), órix austral (*Oryx gazella gazella*), e órix da Arábia (*Oryx leucorix*).

As amostras foram colhidas ao acaso do solo pelos tratadores, pois não é permitida a entrada de estranhos nos parques por razões de segurança e para minimizar o “stress” nos animais. Para fazer os estudos conduzentes a este trabalho as fezes foram conservadas em frascos com dicromato de potássio a 5% e posteriormente refrigeradas a 4 °C, até ao seu processamento.

Foram utilizados quatro métodos de diagnóstico coprológico. Em primeiro lugar realizaram-se esfregaços fecais directos e após concentração, corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Casemore, 1991), após o que se procedeu à observação microscópica dos esfregaços. O estudo morfométrico dos oocistos de *Cryptosporidium* encontrados foi feito

realizando a sua medição numa ampliação de 400× (objectiva 40× e ocular 10×) para identificar as espécies. O número de oocistos presentes nas fezes foi estimado mediante uma valorização semiquantitativa dos esfregaços positivos realizados com o sedimento obtido na técnica de concentração. Assim, calculou-se a média do número de oocistos presentes em vinte campos microscópicos seleccionados ao acaso e as amostras foram classificadas quanto ao seu nível de infecção do seguinte modo: I - com 1 a 2 oocistos por campo, II - com 3 a 10 oocistos por campo e III - com mais de 10 oocistos por campo.

Além disso, para cada amostra também foi realizado um teste de imunofluorescência directa com anticorpos monoclonais (Monofluo Kit *Cryptosporidium* – Sanofi Pasteur) e um teste imunoenzimático, ELISA (Kit Melotest *Cryptosporidium* – Redifarma), de acordo com as instruções dos fabricantes.

Resultados

Os resultados da observação dos esfregaços fecais directos foram coincidentes com os obtidos na observação dos esfregaços fecais após concentração dos oocistos registando-se 2,1% (8/388) de amostras positivas (Figura 1). Após a realização do estudo morfométrico dos oocistos concluímos que correspondiam a *C. parvum*, por possuírem dimensões compreendidas entre 4,4 e 5,2 µm. Em relação ao nível de infecção das amostras positivas, 62,5% (5/8) apresentaram nível de infecção II e 37,5% (3/8) apresentaram nível de infecção III. Com a técnica de imunofluorescência obtivemos 2,1% (8/388) de amostras positivas, precisamente as mesmas que tinham sido detectadas com as técnicas dos esfregaços fecais. Com a técnica imunoenzimática obtivemos 3,6% (14/388) de amostras positivas, 8 das quais já detectadas com as técnicas anteriores, o que se traduziu num aumento de 1,5% (6/388) nos resultados positivos.

No que diz respeito às espécies animais infectadas, detectámos uma amostra positiva em cada uma das seguintes espécies: veado da Birmânia, bisonte ameri-

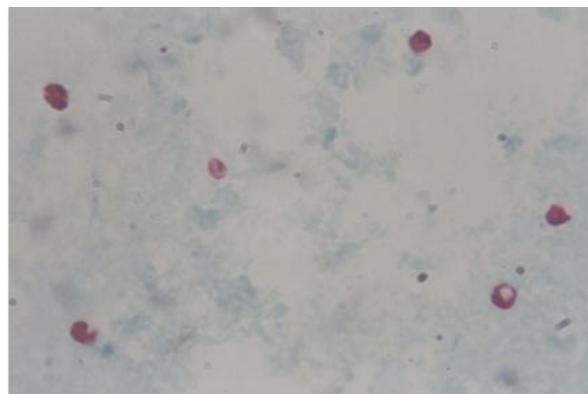


Figura 1 - Oocistos de *C. parvum* corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (400 x, original).

cano, bongo, kudo, addax, damalisco dorcas e muflão africano; três em órix austral e quatro em órix da Arábia. A presença de *Cryptosporidium* foi mais frequente nas amostras colhidas durante o Inverno.

Durante o estudo foram detectados oito animais jovens que apresentavam diarreia. Quatro deles acabaram por morrer, tendo-se observado lesões de enterite no exame anatomopatológico. No diagnóstico bacteriológico isolou-se *E. Coli* da hemocultura em todos os cadáveres e, nalguns casos, outras bactérias, tais como: *Fusobacterium nucleatum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium fallax*, *Clostridium sp.*, *Bacterioides stercoris* e *Staphylococcus xylosum*. No estudo virulógico a pesquisa de *Rotavirus* e de *Coronavirus* foi negativa.

Discussão

A população estudada é uma população silvestre, mas mantida em cativeiro, pelo que é extremamente sensível a agentes microbianos, uma vez que está afastada do ambiente natural para o qual desenvolveu adaptações. Ela tem de lidar com diferenças climáticas, de acomodação, de comportamento alimentar, alterações na dieta e problemas de sobrepovoamento, o que acentua o “stress” de cativeiro (Estes *et al.*, 1992). Além disso, a proximidade do Homem, quer sejam os tratadores quer sejam os visitantes, pode provocar ansiedade nestes animais (Fowler, 1995), aumentando a sua susceptibilidade a infecções.

Para o diagnóstico da criptosporidiose nos animais mantidos em cativeiro o exame coprológico é especialmente vantajoso, devido ao facto de ser não invasivo e relativamente fácil de realizar. No entanto, apresenta o inconveniente da excreção de oocistos ser intermitente, podendo ser muito baixa nas infecções subclínicas. Além disso, as características particulares da coloração, as pequenas dimensões dos oocistos e a sua semelhança morfológica com algumas leveduras tornam difícil a sua identificação nos esfregaços fecais. Por estas razões, vários autores sugerem ser necessário a observação de várias amostras fecais para reduzir os resultados falsos negativos (Weber *et al.*, 1991). Este procedimento é fundamental no caso de amostras de fezes moldadas que, em regra, contêm menos oocistos do que amostras diarreicas (Casemore, 1991).

Com o método imunoenzimático obtivemos um aumento de 1,5% nos resultados positivos, tendo-se revelado a técnica mais sensível deste estudo. Os outros três métodos utilizados baseavam-se na identificação microscópica de oocistos após o uso de corantes ou de anticorpos marcados com substâncias fluorescentes, sendo por isso necessário um observador experiente e que existissem oocistos intactos nas amostras. A técnica imunoenzimática para detecção de antígenos de *Cryptosporidium* não exige oocistos intactos na amostra, sendo, por isso, mais sensível do que as anteriores (Ungar, 1990; Dagan *et al.*, 1995; Martins, 1997). De acordo com Casemore (1987),

os testes imunoenzimáticos são fáceis e rápidos de realizar, especialmente quando se trata de um grande número de amostras, não necessitando um observador experiente, sendo o método de eleição para estudos epidemiológicos.

A existência de reacções positivas na técnica imunoenzimática, em amostras negativas para os outros métodos de diagnóstico, levou-nos a supor que as amostras em questão teriam um baixo teor de oocistos ou talvez nem possuíssem oocistos intactos, mas apenas porções da parede ou de constituintes internos que se comportavam como antígenos. Estas amostras eram de fezes moldadas, não diarreicas, pelo que estes animais não exibiam sintomatologia, sendo provavelmente portadores assintomáticos e contribuindo para a disseminação da doença, tal como foi adiantado por outros autores (Martins, 1997; Deng e Cliver, 1999). Estes resultados também poderiam ser falsos positivos devido à elevada sensibilidade da técnica.

As infecções secundárias detectadas nos exames necrópsicos estão documentadas na literatura como sendo as principais responsáveis pela morte dos animais (Hill, 1990).

A prevalência da criptosporidiose foi mais elevada na época das chuvas. Em vários estudos epidemiológicos realizados em explorações intensivas de ruminantes concluiu-se que a prevalência da criptosporidiose era mais elevada na época das chuvas porque é nessa altura que ocorre o maior número de nascimentos, há maior probabilidade de contaminação do úbere, existem águas de escorrência que podem estar contaminadas (Figura 2), podem existir poças de água espalhadas onde o oocisto resiste melhor à dessecação, e, além disso, há maior incidência de diarreia (Martins, 1997; Atwill *et al.*, 1999; Bendali *et al.*, 1999).

As oito amostras positivas por todos os métodos de diagnóstico pertenciam a animais de três espécies: órix da Arábia, órix austral e addax, cujos parques são contíguos, o que sugere a hipótese de contaminação ambiental, através das águas de escorrência que se deslocam de parques mais elevados para outros numa situação topográfica mais baixa ou pela hipotética existência de fomites (botas dos tratadores, manguei-



Figura 2 - Órixes da Arábia: notar os regos escavados pela água das chuvas no chão (Janeiro de 1999, original).

ras, utensílios de limpeza ou rodas do tractor que transportava o estrume ou a ração).

Dado o potencial zoonótico da criptosporidiose e o facto de o Jardim Zoológico de Lisboa ser um local público, visitado anualmente por milhares de pessoas, especialmente crianças, é do maior interesse para a Saúde Pública avaliar o grau de extensão desta parasitose na população residente, visto que a existência de animais infectados pode contribuir para a contaminação do meio ambiente e do Homem.

Agradecimentos

Ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical e ao Jardim Zoológico de Lisboa.

Bibliografia

- Alves, M., Matos, O., Fonseca, I., Delgado, E., Lourenço, A. e Antunes, F. (2001). Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human HIV-infected and animal hosts. *J. Euk. Microbiol.* 17S-18S.
- Atwill, E., Johnson, E., Klinborg, D., Vesperat, G., Markegard, G., Jensen, W., Pratt, D., Delmas, R., George, H., Forero, L., Philips, R., Barry, S., McDougald, N., Gildersleeve, R. e Frost, W. (1999). Age, geographic, and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds. *Am. J. Vet. Res.* 60 (4): 420-425.
- Bendali, F., Bichet, H., Schelder, F. e Sanaa, M. (1999). Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Vet. Res.*, 3 (1): 61-74.
- Casemore, D.P. (1987). The antibody response to *Cryptosporidium*: Development of a serological test and its use in a study of immunological normal persons. *J. Infect.*, 14: 125-134.
- Casemore, D.P. (1991). Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.*, 44: 445-451.
- Dagan, R., Fraser, D., El-on, J., Kassis, I., Deckelbaum, R. e Turner, S. (1995). Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens from infants and young children in field studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52 (2): 134-138.
- Deng, M. e Cliver, D. (1999). Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. *Parasitol. Res.* 85 (8-9): 733-736.
- Estes, R.D., Otte, D. e Wilson, E.A. (1992). *The behaviour guide to african mammals, including hoofed mammals, carnivores and primates*. 1st Ed. The University of California Press, California, U.S.A., pp. 4-89.
- Fowler, M.E. (1995). *Handling of domestic animals and restraint of wild*. 2nd Ed. Iowa State University Press/AMES, Iowa, U.S.A., pp. 3-65.
- Hill, B.D. (1990). Enteric protozoa in ruminants: diagnosis and control of *Cryptosporidium*, the role of the immune response. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 9: 423-440.
- Martins, S.C. (1997). Contribuição para o conhecimento da criptosporidiose bovina no concelho de Barcelos. Comparação de técnicas de diagnóstico. – Tese de mestrado em Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, Portugal, pp. 121.
- Matos, O., Tomás, A., Aguiar, P., Casemore, D. e Antunes, F. (1998). *Folia Parasitologica*, 45: 67-85.
- Ungar, B.L.P. (1990). Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28 (11): 2491-2495.
- Weber, R., Bryan, R. e Juranek, D. (1991). Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 30 (11): 2869-2873.