

OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SSP. EM PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES DE TRÊS ÁREAS SERRANAS DO SUDESTE BRASILEIRO

Adriano Jaskonis DALL'OLIO¹, Regina Maura Bueno FRANCO²

¹ Estudante do 4º ano da Faculdade de Medicina Veterinária "Octávio Bastos" e Bolsista de IC-FAPESP

² Prof. Assistente do Departamento de Parasitologia, IB-UNICAMP

RESUMO: *Cryptosporidium* é um protozoário que infecta a região das microvilosidades das células do epitélio intestinal e/ou árvore brônquica de mais de 150 espécies de vertebrados. Pessoas portadoras de imunodeficiência, como a infecção pelo VIH, apresentam sintomas mais severos e persistentes que indivíduos saudáveis. Este trabalho investigou se a fauna natural de pequenos mamíferos silvestres da Mata Atlântica (Complexo Serra da Mantiqueira) abriga infecção por *C. parvum* e/ou *C. muris*, detectados por meio da coloração de Ziehl-Neelsen modificada e teste de imunofluorescência direta. Do total de animais capturados, estruturas álcool-ácido resistentes foram detectados nas fezes de 39 animais; quando estas foram submetidas à reação de imunofluorescência direta foi possível confirmar a presença de oocistos de *C. muris* (5,12%) e *C. parvum* (5,12%).

PALAVRAS-CHAVES: *Cryptosporidium*; Pequenos Mamíferos Silvestres; Roedores;

ABSTRACT: *Cryptosporidium* is a parasitic protozoan, which invades the epithelial cells of the intestinal tract and/or respiratory tree of more than 150 vertebrate species. People carriers of immunodeficiency like infection for HIV, presented symptoms more hard and persistent than healthy individuals. This study investigated if the natural fauna of little wildlife mammals (Serra da Mantiqueira) harbor infection for *C. parvum* and/or *C. muris* detected by modified Ziehl-Neelsen technique and direct immunofluorescent assay. From all captured animals, acid fast structures can be detect in the feces of 39 specimens; that were submitted to the direct immunofluorescent assay to confirm presence of *C. muris* (5,12%) and *C. parvum* (5,12%).

KEYWORDS: *Cryptosporidium*; little wildlife mammals; Rodentia;

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium é um protozoário que infecta a região das microvilosidades das células do epitélio intestinal e/ou árvore brônquica de mais de 150 espécies de ver-

tebrados. Vinte e uma espécies diferentes foram originalmente descritas em mamíferos (O'DONOGHUE, 1995). Hoje, segundo TZIPORI e GRIFFITHS (1998), são aceitas como válidas apenas 9: *C.*

Artigo Científico Concluído

parvum e *C. muris* (mamíferos e roedores respectivamente), *C. meleagridis* e *C. baileyi* (aves), *C. serpentis* (répteis), *C. nasorum* (peixes), *C. felis* (felino), *C. wairi* (porquinho da índia) e *C. andersoni* (bovinos).

C. muris foi a primeira espécie descrita por Tyzzer, em 1907; o seu desenvolvimento endógeno é restrito às glândulas estomacais e afeta principalmente roedores (CHALMERS et al., 1997); estudos de transmissão cruzada mostram que ela é infectante para camundongos, cobaias, cães, gatos e coelhos; *C. parvum* foi identificada em 1912, a infecção atinge exclusivamente o intestino delgado e pode ser encontrada em várias espécies de mamíferos, inclusive o homem. Embora estudos moleculares indiquem a ocorrência de diferentes genótipos, a espécie que infecta o homem é hoje designada como *C. parvum* (TZIPORI e GRIFFITHS, 1998), mas segundo KATSUMATA et al. (2000) e PEDRAZA-DIAS et al. (2000) possíveis infecções por *C. muris* e *C. meleagridis* foram detectadas em humanos, confirmadas através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) utilizando-se "primers" específicos.

Segundo FAYER et al., 2000 a ingestão de um pequeno número de oocistos (ao redor de 9 a 1042 oocistos em indivíduos imunocompetentes) pode causar uma severa diarreia pela invasão do trato gastro-intestinal. *Cryptosporidium sp.* pode ser transmitido diretamente entre diferentes espécies por via fecal-oral através dos oocistos que são eliminados nas fezes do hospedeiro ou indiretamente pela ingestão de água contaminada com oocistos que são resistentes à cloração (TZIPORI e GRIFFITHS, 1998).

Em relação à Medicina Veterinária, a

criptosporidiose é bastante importante, pois atinge animais jovens e neonatos; embora a mortalidade nestes casos ocorra em baixa escala, a infecção por *Cryptosporidium* provoca severa enterite infecciosa (O'DONOGHUE, 1995).

A protozoose foi relatada em roedores silvestres e a ausência de especificidade de hospedeiro, característica do protozoário sugere que esses pequenos mamíferos silvestres possam ser considerados como reservatórios da parasitose (SINSKI et al., 1998). Tal fato acarreta sérias implicações ecológicas e epidemiológicas devido à direta contaminação da água e solo pois a água drenada de locais onde estão presentes fezes provenientes dos animais domésticos ou mesmo silvestres, pode contaminar os mananciais destinados ao abastecimento e levar ao desenvolvimento de surtos epidêmicos pelo consumo de água pelo homem. (O'DONOGHUE, 1995)

Este trabalho investigou se a fauna natural de pequenos mamíferos silvestres da Mata Atlântica (Complexo Serra da Mantiqueira) abriga infecção por *C. parvum* e/ou *C. muris*, detectados por meio da coloração de Ziehl-Neelsen modificada e teste de imunofluorescência direta.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em três Seras do sudeste brasileiro: Parque Nacional da Serra da Bocaina; Parque Nacional do Itatiaia e Serra da Fartura. A Serra da Bocaina pertence ao complexo da Serra do Mar e está separada da Serra do Parque Nacional do Itatiaia pelo Vale do Paraíba. A Serra do Itatiaia e a da Fartura fazem parte do complexo Serra da Mantiqueira. Essas áreas são pequenas

reservas de Mata Atlântica ainda existentes no Sudeste Brasileiro. Na Serra da Fartura e no Parque Nacional Serra da Bocaina, devido à grande proximidade com propriedades vizinhas, acontecem invasões ocasionais de animais domésticos nas matas.

Para cada área, as coletas foram trimestrais com duração de 4 noites consecutivas. No primeiro dia, as armadilhas foram montadas entre 16:00 e 18:00 horas, sempre no solo da mata, com intercalamento entre o tamanho das armadilhas e o tipo de isca (banana e mandioca com creme de amendoim). As mesmas eram vistoriadas no dia seguinte, no período da manhã. Em caso de captura, foi anotado o ponto em que o animal foi se encontrava e este foi transportado para uma área apropriada de manuseio.

Após a retirada dos animais das armadilhas, eram imediatamente recolhidas as fezes e colocadas em frascos com dicromato de potássio a 2,5% na proporção de 3:1. Em seguida, os mesmos eram pesados, medidos, feita a sexagem e marcados com brincos de identificação.

Foi demarcada uma grade de 20.000 m² em cada área de estudo, composta por 10 trilhas de 200 metros de extensão, paralelas e distantes 20 metros entre si, contendo 100 locais de armadilhamento, ou seja, cada trilha continha 10 pontos de armadilhamento. Foram utilizadas 100 armadilhas "live-trap" do tipo Sherman.

No laboratório, as fezes foram homogeneizadas e, em seguida, submetidas à centrifugação com água destilada para retirada da solução de dicromato de potássio 2,5% (500xg; 10 minutos). Com os sedimentos obtidos, confeccionaram-se esfregaços (5 ml) que foram submetidos à coloração de Ziehl-Neelsen modifi-

cado (HENRIKSEN e POHLENZ, 1981) observados ao microscópio com aumento de 1000x.

Posteriormente, todos os espécimens nos quais foram identificadas estruturas álcool-ácido-resistentes com tamanho e formato compatíveis com oocistos de *Cryptosporidium* (n=39) foram submetidos à reação de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (*kit* Merifluor, Meridian Diagnostics, Cincinnati, Ohio), realizada de acordo com as instruções do fabricante, para a confirmação específica (*C. parvum*; *C. muris*). Previamente à reação de imunofluorescência, estas amostras fecais foram concentradas de acordo com o procedimento desenvolvido por Deng e Cliver (1999), com modificações descritas a seguir: após centrifugação a 500 x g (10 min.), para retirada da solução de dicromato de potássio 2,5%, os sedimentos resultantes foram homogeneizados com água destilada, contendo Tween 80 (1%) e novamente procedeu-se à centrifugação (500 x g; 10 min.). Decantados os sobrenadantes, os materiais sedimentados foram transferidos para tubos cônicos limpos (15 mL) onde foi adicionada solução saturada de açúcar (gravidade específica de 1,20 g/mL). Após centrifugação (500 x g; 8 min.), apenas a camada superior (2 mL) era cuidadosamente coletada e lavada em água destilada contendo Tween 80 (1%), a 650 xg, durante 10 minutos. Os pellets resultantes foram ressuspensos em 1 ml de água destilada. Alíquotas de 5 ml foram semeadas nos poços das lâminas para a reação de imunofluorescência direta. Para a leitura, utilizou-se microscópio de epifluorescência com filtros de excitação (450-490 nm) e de barreira de 520 nm. Foram con-

siderados como critérios de positividade: o grau de fluorescência verde-maçã brilhante predominante na parede dos oocistos, a presença de sutura, o tamanho e formato similares aos oocistos (*C. parvum*: 5,0 x 4,5 mm; *C. muris*: 8,4 x 6,3 mm).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram capturados, 240 animais nas três áreas de estudo, sendo que deste total, 153 (63,8%) dos animais eram machos e 87 (36,2%) fêmeas. O número de espécimes recapturados em diferentes períodos foi 5. Do total de animais capturados, estruturas álcool-ácido resistentes foram detectados nas fezes de 39 espécimens (16,25%), sendo que tais formas ocorreram em pequeno número nas preparações examinadas (2 a 5 organismos/100 campos microscópicos). As medidas micrométricas destes organismos detectados situaram-se ao redor de 5,0 x 4,1 mm e de 7.9 x 6,3 mm.

Quando consideradas apenas as amostras nas quais estruturas álcool-ácido-resistentes foram detectadas (n=39), com a utilização da reação de imunofluorescência direta foi possível confirmar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp nas fezes de 4 animais (10,25%), sendo que a frequência de *C. parvum* foi de 5,12% (2 animais) e a presença de *C. muris* foi detectada em 2 espécimens, concomitantemente à ocorrência de *C. parvum* (5,12%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHALMERS, R. M. *et al.* The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasit. Res.* v. 83, p.:478-482. 1997.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* v.30, p. 12-13, 2000.
- HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta vet. Scand.* V.22, p.594-596. 1981.
- KATSUMATA, T.; HOSEA, D.; RNUH, I. G.; UGA, S.; YANAGI, T.; CONO, S. Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Amer. J. Trop. Med. Hyg* v. 62. P. 70-72, 2000
- O'DONOGHUE, P. J. : *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis* in Man and Animals. *Int. J. Parasitol.* V.25 . 2:139-195. 1995.
- PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR, C.; McLAUHLIN, J. The identification and characterization of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *Fems. Microbiol. Lett.* V. 189, p.189-194, 2000.
- SINSKI, E.; BEDNARSSKA, M.; BAJER, A. The role of wild rodents in ecology of *Cryptosporidiosis* in Poland. *Folia Parasitol.* V.45, p.173-174. 1998.
- TZIPORI, S ; GRIFFITHS , J. K. Natural history and Biology of *Cryptosporidium parvum* . *Advanc. Parasit.*, v. 40, p. 6-29 .1998.

TABELA 1. Número de pequenos mamíferos silvestres capturados e recapturados em três áreas serranas do Sudeste Brasileiro (2000-2001)

Área capturados	Nº de animais recapturados	Nº de animais
Serra da Fartura	62	2
Parna do Itatiaia	47	1
Serra da Bocaina	126	2
TOTAL		5