

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Monitorização de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia duodenalis* em
explorações de Bovinos de Leite do Norte de Portugal**

Alice Fernanda Barbosa Ferreira da Silva

Orientador

Carla Maria Proença Noia de Mendonça

Co-Orientador

José Manuel Correia da Costa

Porto 2017

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Monitorização de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia duodenalis* em
explorações de Bovinos de Leite do Norte de Portugal**

Alice Fernanda Barbosa Ferreira da Silva

Orientador

Carla Maria Proença Noia de Mendonça

Co-Orientador

José Manuel Correia da Costa

Porto 2017

Resumo

Cryptosporidium spp. e *Giardia duodenalis* são parasitas unicelulares, protozoários, de distribuição mundial, com capacidade de infetarem o Homem, animais domésticos, com relevância entre os bovinos, e animais selvagens. Estes protozoários são responsáveis por infeção entérica e a transmissão entre hospedeiros ocorre habitualmente por via oral-fecal, sendo os alimentos de origem vegetal consumidos crus e a água, assumidos consensualmente como fontes de contágio. Nos bovinos, a infeção clínica afeta principalmente os animais jovens, sendo os génotipos zoonóticos, os mais prevalentes, enquanto os bovinos adultos são assumidos como reservatório biológico dos parasitas.

Neste trabalho quisemos identificar os génotipos dominantes nos bovinos, jovens e adultos, bem como conhecer o papel da água fornecida aos animais, na transmissão destes protozoários. Assim, propusemos aos produtores e veterinários da região de Entre Douro e Minho investigar a presença destes 2 parasitas em explorações de bovinos de leite dessa região, no sentido de perceber o seu impacto na saúde animal e no ambiente.

Foram selecionadas 18 explorações na região, e procedemos à recolha global de 111 amostras de fezes (63 provenientes de vitelos e 48 de bovinos adultos). Foram também realizadas colheitas de amostras de água para consumo animal em 10 destas explorações para aferir a qualidade bacteriológica e parasitológica.

As amostras de fezes foram tratadas pelo método de sedimentação com enriquecimento em acetil-etil formol. Dos sedimentos foram obtidos esfregaços corados por *Acid-Fast* e Imunofluorescência Direta. Foram identificados oocistos de *Cryptosporidium spp.* em 29 amostras (26,1%) de fezes de bovinos, cistos de *Giardia duodenalis* em 20 amostras (18,0%) e infeção mista em 8 amostras (7,2%) de fezes.

Os oocistos e cistos identificados foram isolados e posteriormente reunidos numa amostra por exploração para efeitos de extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciação.

Durante este período de estágio procedeu-se à genotipagem de 12 isolados de *Cryptosporidium*. A caracterização genética dos isolados de *Giardia* encontra-se em curso.

Os génotipos de *Cryptosporidium* identificados foram o *C. andersoni*, o *C. ryanae* e o *C. parvum*, sendo este último o dominante em bovinos jovens e adultos, o que evidencia características zoonóticas.

Artigo para publicação

Este trabalho de estágio originou o manuscrito em preparação com o título provisório **“*Cryptosporidium spp.* and *Giardia duodenalis* infection in Dairy Cattle: molecular characterization and environmental impact”**

Agradecimentos

À professora Carla Mendonça pela orientação deste trabalho de estágio, pelo apoio nos momentos de maior angústia e pela disponibilidade em me acompanhar às explorações.

Ao Dr. José Manuel Correia da Costa, meu coorientador, pelo acolhimento no Centro de Imunologia e Biologia Parasitária do Departamento das Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Delegação do Porto, pela partilha de conhecimento e pela ajuda na redação deste relatório de estágio.

Aos clínicos, Dr. Manuel Dantas, Dr. Ventura, Dr. José Carlos e Dr. Humberto que me acompanharam nas visitas às explorações e, por toda a amabilidade e tempo dispensado.

A todos os produtores, por me receberem nas suas explorações, pela simpatia e pela colaboração neste trabalho de estágio.

À Dona Lurdes Delgado por me ensinar e orientar na execução dos diferentes procedimentos de diagnóstico, pela partilha de experiências, por todo o carinho e atenção prestada.

À Dona Rosa por toda a boa disposição e colaboração no processamento das amostras.

À Bela Santos por todo o cuidado, trabalho de secretaria e gestão de correio.

Ao Dr. António Castro, pela ajuda fundamental na interpretação dos resultados de PCR e das sequências, por todas as explicações e orientação deste trabalho de estágio.

À Maria João, à Susana e aos restantes bolseiros que passaram pelo Instituto durante o tempo em que lá estive, por todo o apoio, motivação e dicas para o sucesso deste trabalho.

À Anabela e aos restantes funcionários do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Ao CECA/ICETA pelo financiamento inerente a este trabalho de estágio.

À professora Eduarda Gomes Neves e à professora Margarida Fonseca Cardoso pelo apoio e pela ajuda preciosa na análise estatística.

A todo o corpo docente do ICBAS, em especial aos professores que acompanharam mais de perto o meu percurso.

Aos meus colegas e amigos de curso, obrigada por todas as palavras de apoio e carinho que tornaram esta jornada mais agradável.

À Sara Filipa Monsanto, à Andreia Oliveira, ao Miguel e à restante família Oliveira, por terem sido grandes pilares nesta caminhada.

Aos meus pais, aos meus avós e à restante família, obrigada por todo o apoio.

À tia Bina, ao tio Manel e ao tio Mota, um obrigado especial, por nunca terem desistido de acreditar em mim e pela força nos momentos mais frágeis desta caminhada.

Muito obrigada a todos!

Lista de abreviaturas

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CECA – Centro de Estudos de Ciência Animal

C. parvum - *Cryptosporidium parvum*

CsCl - Cloreto de céσιο

DFA - Imunofluorescência direta (em inglês *direct immunofluorescence assay*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (em inglês *deoxyribonucleic acid*)

EDM - Entre Douro e Minho

EPA - *United States Environmental Protection agency*

Fig. - Figura

G.duodenalis - *Giardia duodenalis*

ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

ICETA - Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente da Universidade do Porto

min - minutos

P - valor de prova (teste estatístico)

pb - par de bases

PBS - Solução salina tamponada com fosfato (em inglês *phosphate buffered saline*)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (em inglês *Polymerase Chain Reaction*)

rRNA - RNA ribossomal (em inglês *ribosomal ribonucleic acid*)

s - segundos

SSU-rRNA - pequena subunidade de RNA ribossómico

Índice

Resumo	iii
Artigo para publicação.....	iv
Agradecimentos	v
Lista de abreviaturas	vii
Índice	viii
Introdução.....	1
Revisão bibliográfica.....	2
Biologia, ciclo de vida e transmissão	2
Sobrevivência no ambiente.....	5
Criptosporidiose e giardíase humana e animal	5
Fatores de risco associados com a criptosporidiose em explorações de bovinos	7
Trabalho laboratorial	8
Material e métodos	8
Seleção e recolha de amostras fecais	8
Amostras de água para consumo animal	8
Deteção de (oo)cistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> e de <i>G. duodenalis</i> em amostras de fezes....	9
Isolamento e extração de DNA.....	12
Caracterização molecular de <i>Cryptosporidium spp.</i> e de <i>G. duodenalis</i>	12
Deteção de (oo)cistos em amostras de água	15
Análise estatística	16
Resultados.....	16
Distribuição da amostragem	16
<i>Cryptosporidium spp.</i> e <i>G. duodenalis</i> nas fezes dos animais.....	17
Caracterização molecular dos isolados de <i>Cryptosporidium spp.</i> e <i>G. duodenalis</i>	18

Análise dos fatores de risco associados com a criptosporidiose nos bovinos	19
<i>Cryptosporidium spp.</i> e <i>Giardia duodenalis</i> nas amostras de água	21
Análise bacteriológica das amostras de água	21
Discussão	23
Conclusões.....	25
Bibliografia.....	27
Anexos	30
Caracterização da amostragem	30
Caracterização da ocorrência de oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> e de cistos de <i>G. duodenalis</i> dentro da exploração.....	31

Introdução

O principal objetivo deste trabalho de estágio incidiu em compreender a amplitude e o modo como os bovinos de leite na Região de Entre Douro e Minho são reservatórios biológicos de estirpes genóticas zoonóticas de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia duodenalis*, bem como avaliar o papel da água para consumo animal como fonte de contaminação.

O estágio foi realizado no Centro de Imunologia e Biologia Parasitária do Departamento das Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Delegação do Porto entre 2 de janeiro de 2017 e 21 de abril de 2017. Procedemos à colheita de amostras de fezes e de água para consumo animal nas explorações selecionadas, executamos os métodos convenientes para identificação dos protozoários e a sua caracterização genética.

Neste relatório serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o período de estágio e será realizada uma pequena revisão bibliográfica sobre a biologia, ciclo de vida e transmissão dos parasitas considerados para este estudo.

Acredito ter cumprido os objetivos deste estágio. Esta estadia no laboratório permitiu-me desenvolver a capacidade de autonomia, organização de dados e aprofundamento das técnicas de diagnóstico laboratorial.

Foi uma experiência bastante enriquecedora, dado que a integração num grupo multidisciplinar permitiu uma grande troca de conhecimentos que se mostrou primordial para o sucesso deste trabalho. Foi sem dúvida uma boa experiência, tanto a nível pessoal como profissional.

Revisão bibliográfica

Biologia, ciclo de vida e transmissão

O *Cryptosporidium spp.* e a *Giardia duodenalis (G.duodenalis)* são parasitas protozoários amplamente distribuídos por todo o mundo e têm sido associados a vários surtos de doença entérica transmitida pelos alimentos e pela água.¹

São reconhecidas 32 espécies de *Cryptosporidium* que afetam vários hospedeiros: o Homem, os bovinos, as aves de capoeira e de caça, os animais de companhia e os animais selvagens.^{2,3}

O *Cryptosporidium parvum (C. parvum)* é uma das principais causas de criptosporidiose humana de origem zoonótica. O *C. hominis*, o *C. parvum* e o *C. meleagridis* são as principais espécies de *Cryptosporidium* responsáveis pela criptosporidiose humana. No entanto, o *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. felis*, *C. ubiquitum* e o *C. muris* têm sido descritos ocasionalmente em amostras humanas.^{2,3}

Nos bovinos, o *Cryptosporidium parvum*, a espécie zoonótica, é dominante em vitelos jovens (< 1 mês de idade); *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ryanae* e *Cryptosporidium andersoni* são as espécies mais prevalentes em vitelos mais velhos (> 4 meses de idade) e em bovinos adultos.⁴

Dentro do género *Giardia*, apenas a *Giardia duodenalis* tem sido associada a doença nos humanos e em geral nos mamíferos. Atualmente conhecem-se sete assemblages (assemblages = genótipos) de *G. duodenalis*, designados de A a G. Os assemblage A e B provocam doença no Homem, cães, gatos, ruminantes e animais selvagens; os assemblages C e D apenas infetam cães; o assemblage E infeta bovinos e os assemblages F e G infetam apenas gatos e roedores.^{2,5,2}

A infeção por estes parasitas ocorre pela ingestão da forma, ambientalmente resistente, o (oo)cisto.

No caso do *Cryptosporidium*, a infeção ocorre após a ingestão do oocisto, através de água contaminada (água potável ou de recreio) e/ou ocasionalmente, por alimentos contaminados por fezes de hospedeiros infetados.^{6,7}

No hospedeiro suscetível, o oocisto ingerido sofre excistamento ao nível do trato gastrointestinal e os esporozoítos libertados vão parasitar as células epiteliais do intestino delgado. Os esporozoítos invadem os enterócitos e desenvolvem-se trofozoítos. O estado trofozoíto é intracelular, mas extracitoplasmático. Nos enterócitos, os parasitas sofrem multiplicação assexuada (esquizogonia ou merogonia) e depois reprodução sexuada (gametogonia), produzindo

microgametócitos (gâmetas masculinos) e macrogametócitos (gâmetas femininos). Após a fertilização desenvolve-se o zigoto, podendo este ser de duas características: 80% dos zigotos formados originam os oocistos de paredes espessas que por esporogonia formam oocistos esporulados, contendo quatro esporozoítos, que serão libertados nas fezes. Estes oocistos são muito resistentes no ambiente e são responsáveis pela transmissão da infecção entre hospedeiros suscetíveis. Os restantes 20% dão origem a oocistos de paredes finas, que representam as formas do ciclo de vida auto-infetante capazes de manter o parasita dentro do hospedeiro (Fig.1).^{6,7}

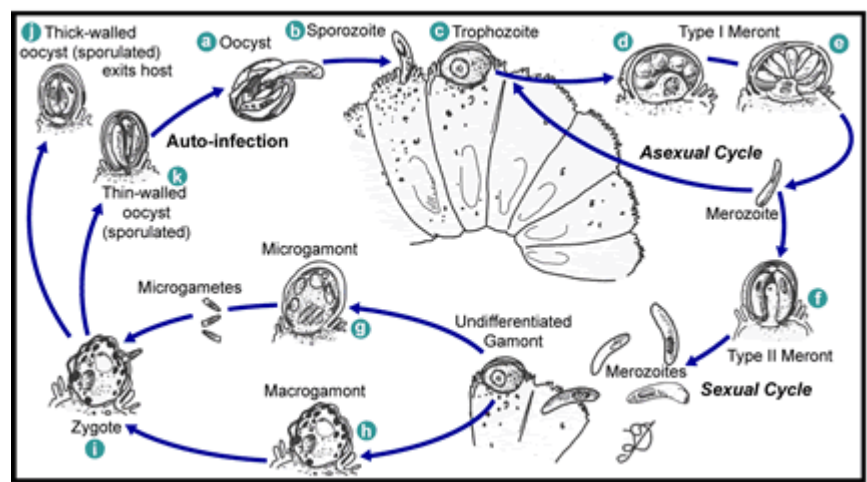


Fig.1: Ciclo de vida do parasita *Cryptosporidium* spp.⁷

Os cistos são as formas ambientalmente resistentes de *Giardia duodenalis* e são responsáveis pela transmissão da giardíase. A infecção ocorre pela ingestão de cistos presentes na água, alimentos ou fomites contaminados por fezes de hospedeiros infetados. Após a ingestão, ocorre excistamento do cisto no duodeno e os trofozoítos aderem à mucosa duodenal ou à mucosa do jejuno proximal, através do disco ventral e, replicam-se por divisão binária. A formação de cistos ocorre à medida que os trofozoítos se movem para o cólon. Os cistos são infetantes quando eliminados nas fezes ou pouco tempo depois da sua excreção (Fig.2).^{6,8}

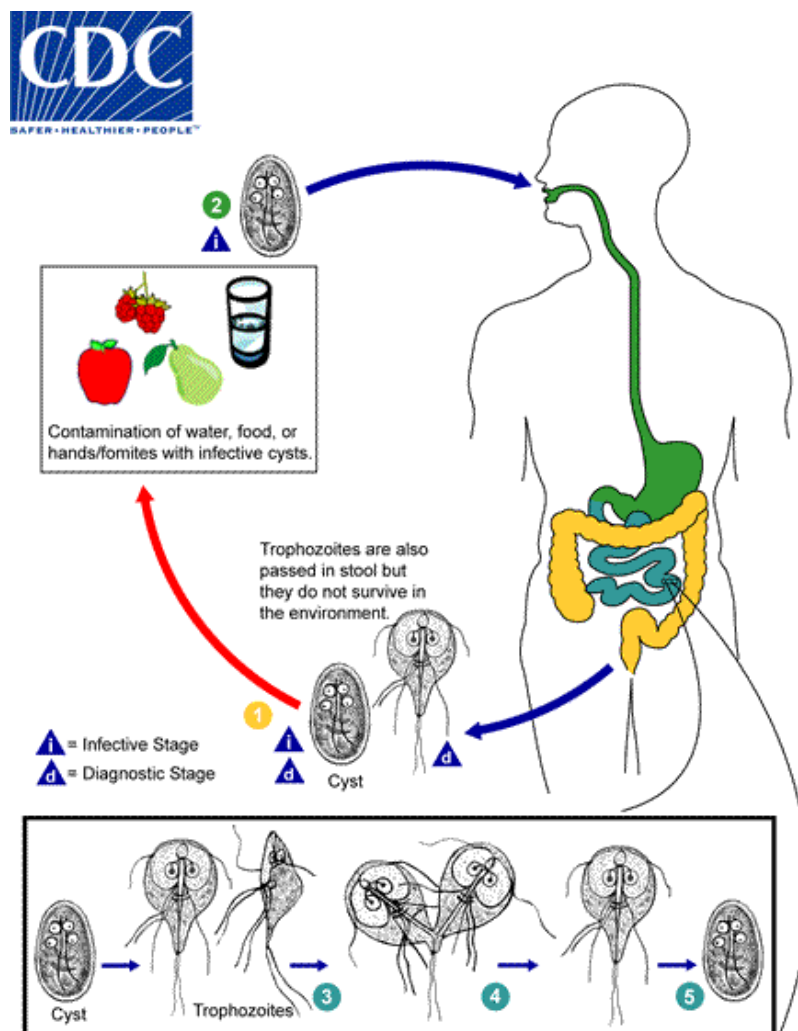


Fig.2: Ciclo de vida do parasita *Giardia duodenalis*.⁸

A excreção dos cistos tende a ser intermitente, pelo que uma única amostra negativa não é indicador de ausência de infecção ativa, sendo aconselhável realizar três colheitas em dias alternados.⁵

Como referido anteriormente a transmissão de (oo)cistos destes parasitas a hospedeiros suscetíveis ocorre sempre por via oral-fecal, por ingestão de água, alimentos contaminados ou após manipulação de animais infetados.

Assim, as explorações pecuárias podem representar um potencial risco de contaminação quer para os humanos quer para os animais. Por um lado, o escoamento de água residual pode chegar à água superficial ou contaminar a água subterrânea, por outro lado a aplicação do estrume como fertilizante agrícola, possibilita a contaminação dos solos e da água de superfície e/ou a água subterrânea por agentes patogénicos fecais, sendo estes fenómenos ampliados pela precipitação.⁹

Sobrevivência no ambiente

Os (oo)cistos de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia duodenalis* estão bem adaptados a condições ambientais extremas, sendo capazes de sobreviver a temperaturas que variam entre os 4 e os 37°C e em ambientes de composição química muito variável (em termos de composição orgânica e riqueza em sais minerais). Sendo contudo vulneráveis a temperaturas elevadas (> 71,7° C) e à dessecação.^{9, 10, 13}

As explorações de bovinos têm sido reportadas pelas elevadas concentrações destes dois parasitas, contribuindo em grande medida para a contaminação ambiental. No entanto, os animais selvagens, bem como as aves aquáticas também desempenham um papel na disseminação de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia duodenalis* no ambiente, uma vez que são encontrados (oo)cistos em regiões desertas, isto é, sem qualquer fonte de contaminação agrícola ou humana.¹⁰

A presença de oocistos e cistos de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia duodenalis* constitui um risco para o abastecimento de água potável devido à sua resistência ao cloro nos níveis rotineiramente utilizados para o tratamento de água. Apenas os processos de desinfecção alternativos, como a ozonização e a utilização da luz ultravioleta têm-se mostrado eficazes na inativação dos protozoários.^{11,12}

Os fornecedores públicos e privados de água geralmente dependem da depuração natural por processos geológicos ou da remoção física dos organismos por processos de coagulação e de filtração efetuados durante o tratamento convencional da água para consumo humano, mas se estas medidas forem insuficientes, e o número de organismos no ambiente for elevado, um número suficiente pode passar para o abastecimento de água potável e causar doença esporádica ou um surto de doença.^{11,12}

Criptosporidiose e giardíase humana e animal

O *Cryptosporidium parvum* é altamente infeccioso para os bovinos e para os seres humanos, sendo nestes os grupos de risco: crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas. Nos bovinos, os vitelos recém-nascidos são altamente suscetíveis à infeção por *C. parvum* e podem excretar tantos oocistos como 10^7 por grama de fezes. Os animais mais velhos podem permanecer infetados e excretar oocistos, perpetuando a transmissão a outros hospedeiros suscetíveis.^{3,5}

O número de (oo)cistos necessário para induzir infeção nos seres humanos e em bovinos é relativamente baixo, sendo estimada a dose infecciosa de 10 oocistos de *Cryptosporidium spp.* ou 10 cistos de *Giardia duodenalis*.¹

O *Cryptosporidium hominis* é encontrado quase exclusivamente nos seres humanos, enquanto o *C. parvum*, o genótipo zoonótico, também é encontrado nos animais de espécies pecuárias e nos animais selvagens. A ocorrência nos seres humanos de ambos os genótipos de *Cryptosporidium*, tem fornecido evidências de que tanto o ciclo antroponótico como zoonótico podem ocorrer nas infeções humanas.¹⁴

A criptosporidiose humana é normalmente uma doença gastrointestinal aguda, auto-limitante, caracterizada por diarreia aquosa, cólicas, vômitos, febres baixas e perda de apetite. O período de incubação é em média 7 dias (pode variar de 2 a 10 dias) e os sintomas são geralmente de curta duração (1 a 2 semanas) nos pacientes imunocompetentes.^{3,7}

Nos indivíduos imunocomprometidos, a doença assume um carácter grave e persistente, com invasão de outros órgãos, incluindo pulmões e o ducto biliar, sendo uma ameaça à vida do paciente. Um quadro semelhante com morbidade e mortalidade significativas pode ocorrer em crianças subnutridas.^{3,11}

Existem evidências de criptosporidiose humana associada a explorações pecuárias e à exposição a animais infetados, particularmente bovinos jovens. Embora os trabalhadores e os visitantes das explorações possam contrair criptosporidiose por contacto direto, a transmissão indireta de *Cryptosporidium spp.* dos bovinos através da água tem sido considerada a fonte zoonótica mais importante na infeção humana.⁹

A giardíase humana varia de assintomática a pacientes com diarreia grave e má absorção. A giardíase aguda desenvolve-se após um período de incubação de 1 a 14 dias (média de 7 dias) e dura geralmente 1 a 3 semanas. Os sintomas incluem diarreia, dor abdominal, distensão abdominal, náuseas e vômitos. Na giardíase crónica, os sintomas são recorrentes e pode ocorrer má absorção e emaciação.⁸

Os vitelos normalmente são infetados com *Cryptosporidium spp.* entre a primeira e a quarta semana de idade com um período pré-patente de 7 dias sendo a exibição clínica da doença observada entre os 7-30 dias de idade com uma duração da infeção de duas semanas. Em vitelos é possível a identificação de oocistos nas fezes a partir dos dois dias de idade (eliminação passiva), atingindo um pico de excreção por volta dos 14 dias (excreção ativa).⁹

As principais manifestações clínicas de *C. parvum* nos bovinos são diarreia amarela pálida com muco, depressão, anorexia e dor abdominal.⁹

A *Giardia duodenalis* tem sido implicada como um agente etiológico isolado e em combinação com outros agentes patogênicos entéricos na diarreia dos vitelos. Infecções simultâneas com *G.duodenalis* e *Cryptosporidium spp.* foram observadas como a causa primária de diarreia nos vitelos com menos de 30 dias de idade, e a *Giardia* sozinha foi associada com diarreia em vitelos com mais de 30 dias de idade.⁹

Fatores de risco associados com a criptosporidiose em explorações de bovinos

Várias pesquisas foram levadas a cabo com o objetivo de determinar a associação entre a idade do animal, a ocorrência de diarreia, o tipo de abastecimento de água da exploração e o tipo de estabulação dos vitelos com a excreção de oocistos de *Cryptosporidium spp.*^{15,16}

Os resultados destes estudos evidenciaram que uma diminuição na excreção de oocistos ocorre quando a fonte de água era de poço, em vez de nascentes ou riachos e uma diminuição da excreção com o aumento da idade dos animais. Não foi encontrada associação entre a eliminação de oocistos e o tipo de dieta líquida, sexo, tempo em que o vitelo ficou com a progenitora após o nascimento, uso de antibióticos, presença de sangue nas fezes e época de partos.^{15,16}

Os fatores de risco mais frequentemente associados à eliminação de oocistos pelos vitelos são a idade igual ou inferior a 20 dias e a ocorrência de diarreia.¹⁶

O conhecimento da prevalência e dos fatores de risco para a excreção de oocistos são um pré-requisito para a monitorização eficaz da infecção e para a implementação de medidas de controle, limitando, deste modo, a transmissão do parasita e a contaminação ambiental com oocistos.¹⁶

Trabalho laboratorial

Com o objetivo de determinar a existência destas infeções na população de bovinos leiteiros na região de Entre Douro e Minho (EDM) e de que forma a transmissão da infeção pode ser assegurada pela água de bebida, bem como o potencial risco zoonótico representado pelos bovinos dentro das bacias hidrográficas da região realizamos o seguinte trabalho, que passarei a descrever.

Material e métodos

Seleção e recolha de amostras fecais

Foram selecionadas 18 explorações de bovinos leiteiros, situadas na região de EDM. O critério para a seleção das explorações foi a sua proximidade com os principais rios da região: Lima, Cávado e Ave. Assim, as explorações selecionadas situam-se nos concelhos de Ponte de Lima, Viana do Castelo, Barcelos e Vila do Conde.

As explorações selecionadas tinham um efetivo médio de 140 animais, variando entre 50 a 500 animais por exploração.

Em cada exploração, procedeu-se à colheita de amostras de fezes em animais adultos e em vitelos em número representativo do efetivo total em estudo. No total, foram recolhidas 111 amostras fecais, sendo 63 de vitelos (com menos de 1 mês de idade) e 48 de bovinos adultos (mais de 24 meses).

As recolhas de amostras de fezes foram realizadas diretamente do recto, acondicionadas em frascos plásticos de análise estéreis, identificados com o número da amostra, fazendo-se corresponder na folha de registo esse número ao número do brinco de identificação animal e à faixa etária em que o bovino se encontrava. Os recipientes foram acondicionados e encaminhados para o laboratório, logo que possível.

Amostras de água para consumo animal

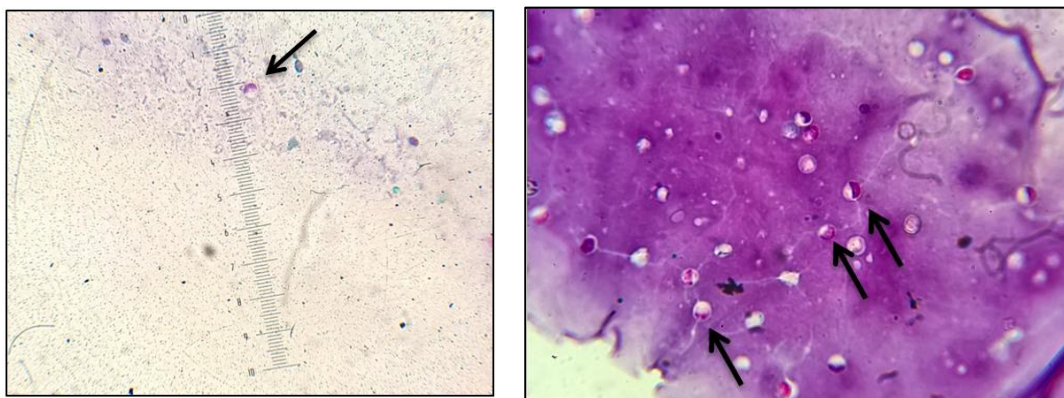
Foram recolhidas amostras de água em 10 das 18 explorações selecionadas, para análise parasitológica e bacteriológica. Para a análise parasitológica foram filtrados 200 litros de água diretamente de uma torneira de cada exploração, utilizando para o efeito filtros EnvirochekTM de acordo com as instruções do fabricante, e por imperativo da execução do Método 1623 da EPA (*United States Environmental Protection Agency*).

Para análise bacteriológica foram recolhidos 100 mL de água, de forma asséptica, para um recipiente apropriado, esterilizado, diretamente da mesma torneira. Os recipientes foram acondicionados em sacos isotérmicos e encaminhados para o laboratório, logo que possível.⁴

Deteção de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e de *G. duodenalis* em amostras de fezes

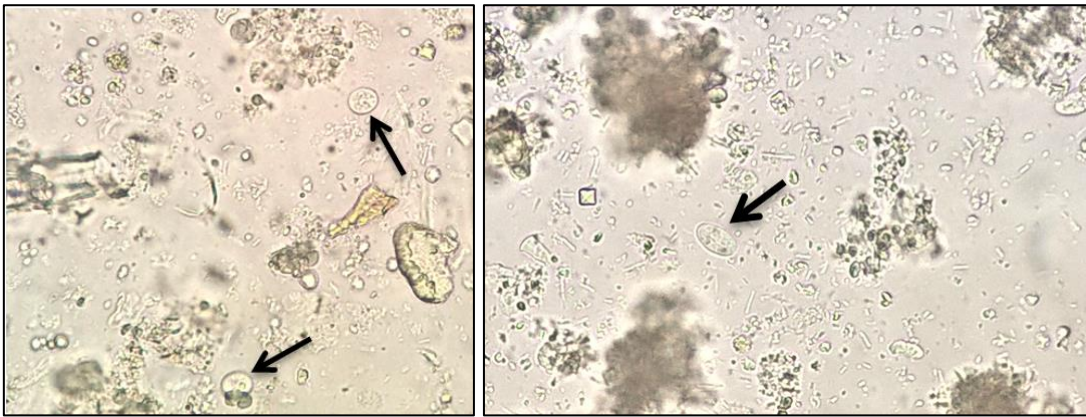
As amostras de fezes foram concentradas por sedimentação com enriquecimento em acetil-etil formol de acordo com o método do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC): suspendemos uma alíquota da amostra de fezes em formol a 10% e filtramos através de uma gaze, para um tubo de Falcon de 15 mL, para reter os grandes detritos. Seguidamente centrifugamos a $500 \times g$ durante 10 minutos e decantamos o sobrenadante. Ao sedimento adicionou-se 10 mL de formol a 10% e 4 mL de éter e, colocando uma rolha a tapar o tubo, agitou-se vigorosamente numa posição invertida durante 30 segundos, para re-suspender o sedimento. A rolha foi rejeitada e os tubos foram centrifugados, novamente, a $500 \times g$ durante 10 minutos. Libertamos o rolhão de detritos do topo do tubo, soltando os lados do rolhão com uma vareta de vidro e, decantamos as camadas superiores do sobrenadante. Por fim, adicionou-se 1-2 mL de formol a 10% para voltar a re-suspender a amostra concentrada.¹⁷

Para identificar os oocistos de *Cryptosporidium* spp., os esfregaços do sedimento foram deixados secar ao ar e fixados com metanol. Posteriormente realizou-se a coloração *Acid-Fast* de acordo com o método do CDC modificado por Kinyoun e as preparações foram analisadas com o auxílio de um microscópio óptico, utilizando óleo de imersão e a objetiva de 100x. A amostra foi considerada positiva sempre que um oocisto com a morfologia correta (isto é, propriedades ópticas, estrutura interna, tamanho e forma) foi encontrado na lâmina. Os critérios utilizados para identificar os oocistos tipo *C. parvum* foram os seguintes: medir entre 4 a 6 μm , forma esférica com esporozoítos no seu interior, uma cor rosa na coloração *Acid Fast* e ter um halo à volta (Figs. 3 e 4).^{15,17,16}



Figs. 3 e 4: Lâminas de acid-fast positivas para *Cryptosporidium* spp. Fonte: Captada pelo autor.

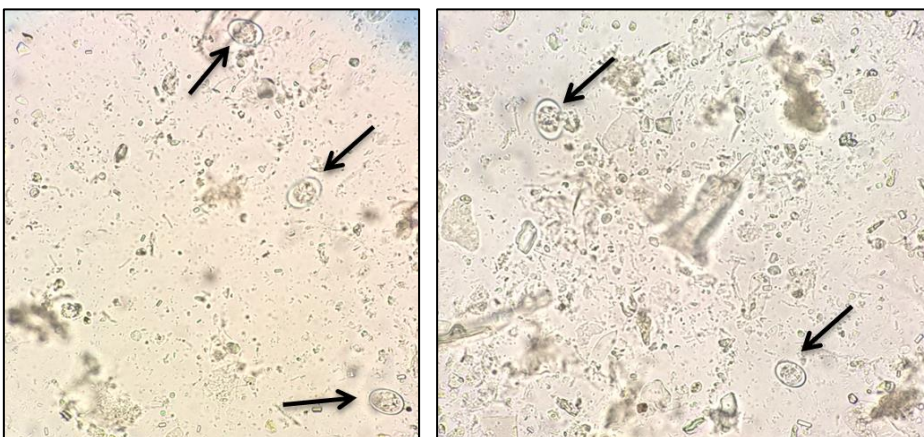
A identificação dos cistos de *Giardia duodenalis* foi realizada por exame direto. Uma alíquota da amostra concentrada foi pipetada para uma lâmina e o sedimento foi observado por microscopia óptica para identificação de cistos. A amostra foi considerada positiva quando pelo menos um cisto de *G. duodenalis* foi encontrado na lâmina. Os critérios utilizados para identificação dos cistos foram os seguintes: estrutura ovoide, 10 x15 µm, presença de 4 núcleos no interior (por vezes, não conseguimos identificar a totalidade dos núcleos), presença de corpo central e refringência de membrana (Figs. 5 e 6).^{4,18}



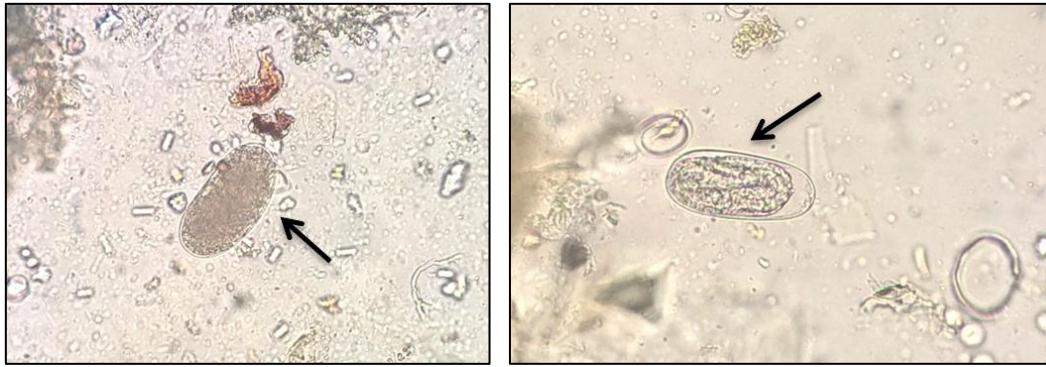
Figs. 5 e 6: Exame direto positivo para *Giardia duodenalis* (imagens da esquerda e da direita)

Fonte: Captada pelo autor

O exame direto para além da identificação dos cistos de *Giardia duodenalis* permitiu a deteção da presença de outros parasitas tais como oocistos de *Eimeria spp.* (Figs. 7 e 8) e ovos de nematodes (*Ostertagia*, *estrongiloides*, ...) (Figs. 9 e 10).

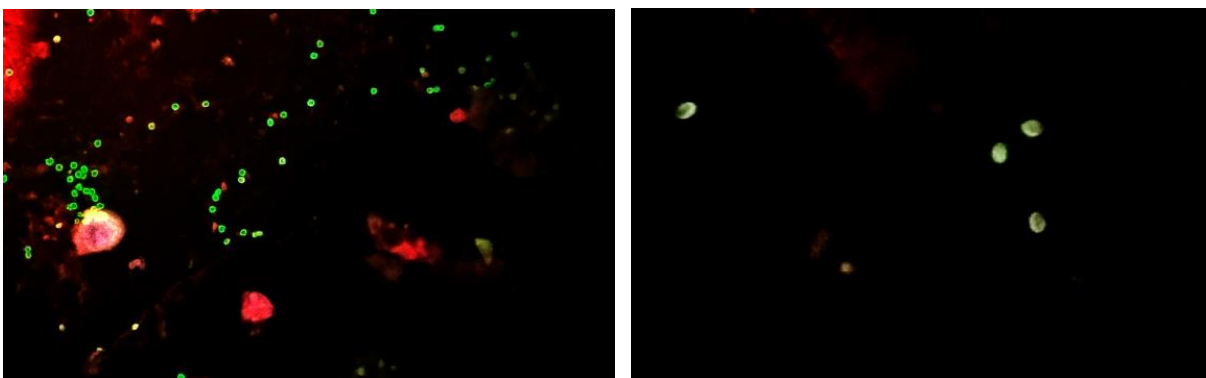


Figs. 7 e 8: Observação de oocistos de coccídeos (*Eimeria spp.*) no exame direto (imagens da esquerda e da direita). Fonte: Captada pelo autor



Figs. 9 e 10: Observação de ovos tipo *Ostertagia* (imagem da esquerda) e de ovos de estrongiloides (imagem da direita) no exame direto. Fonte: Captada pelo autor

Todas as amostras de fezes também foram analisadas pela técnica de imunofluorescência direta (DFA) com anticorpos monoclonais específicos para antígenos da parede dos (oo)cistos. Esta técnica possui uma elevada sensibilidade e especificidade e é considerada o *gold standard* por muitos laboratórios. Uma vez que tínhamos acesso ao equipamento de microscopia de epifluorescência no nosso laboratório, recorreremos a esta técnica para otimizar a identificação de amostras positivas. Uma alíquota da amostra concentrada por sedimentação foi pipetada para uma lâmina, deixada a secar ao ar e fixada com metanol. Posteriormente foi corada de acordo com as instruções do fabricante (Aqua-Glo™ G/C Direct Comprehensive Kit, Waterborne, Inc., New Orleans, LA). O esfregaço foi analisado em toda a sua extensão por microscopia de epifluorescência com a objetiva de 40x para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *G. duodenalis* (Figs. 11 e 12).^{1,18,19}



Figs. 11 e 12: Lâmina de imunofluorescência positiva para *Cryptosporidium spp.* (imagem à esquerda, 400x, oocistos fluorescentes a verde); Lâmina de imunofluorescência positiva para *Giardia duodenalis* (imagem à direita, 400x, cistos fluorescentes a verde). Fonte: Captada pelo autor

Isolamento e extração de DNA

As amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium spp.* e/ ou cistos de *Giardia duodenalis* por microscopia de imunofluorescência foram processadas para o isolamento dos parasitas.

Os oocistos de *Cryptosporidium spp.* foram isolados utilizando um método de gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) modificado desenvolvido pelo nosso laboratório, derivado do protocolo de purificação de oocistos de Arrowood, M., Donaldson, K., 1996. Resumidamente, uma alíquota da amostra de fezes foi lavada com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4) e éter. Adicionou-se 10 mL de éter-PBS (1:10) à amostra de fezes, agitou-se no vortex até homogeneização e centrifugou-se a 300 x g durante 10 min. O sobrenadante foi rejeitado e a lavagem foi repetida. O sedimento de cada tubo foi re-suspenso em PBS para atingir um volume final de 1,5 mL. Foram colocados 750 µL de cloreto de céσιο (densidade 1,15) dentro de um tubo de microcentrífuga de 2 mL e sobre a solução de CsCl, colocou-se, cuidadosamente, uma alíquota do sedimento de fezes com oocistos (500 µL) e, procedeu-se à centrifugação a 16000 x g durante 4 min. O sobrenadante foi recolhido (~ 1 mL) e transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 2 mL, diluído até à capacidade máxima do tubo com PBS e centrifugado a 16000 x g durante 4 min. O sobrenadante de todos os tubos foi rejeitado e os sedimentos foram novamente suspensos em 400 µL de PBS.^{17,20}

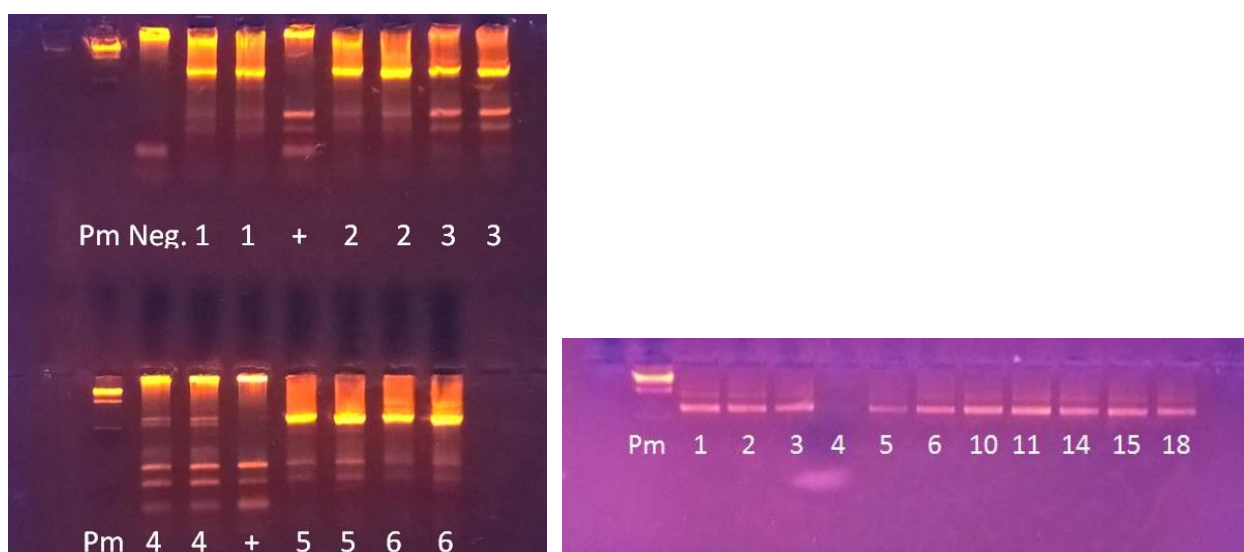
Os cistos de *Giardia duodenalis* foram isolados das fezes utilizando o método de gradiente de cloreto de céσιο acima descrito duplicando a concentração de cloreto de céσιο, uma vez que, inicialmente recorreu-se à centrifugação com gradiente de densidade de sacarose, mas não resultou na densidade específica dos nossos cistos de *G. duodenalis* (*comunicação do laboratório*).^{17,20}

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído dos oocistos isolados de *Cryptosporidium spp.* e dos cistos de *G. duodenalis* utilizando um Kit comercial, o QIAamp® DNA Mini Kit de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN GmbH, Berlim, Alemanha).¹⁸

Caracterização molecular de *Cryptosporidium spp.* e de *G. duodenalis*

Foi utilizado um nested PCR dirigido ao gene rRNA da pequena subunidade (SSU) para permitir a diferenciação entre *C. parvum* e outros genótipos e espécies de *Cryptosporidium* e elucidar o potencial risco zoonótico representado pelos bovinos dentro das bacias hidrográficas. Todas as amostras positivas por DFA foram submetidas ao protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR).¹⁵

Foram também utilizados dois pares de *primers* que amplificam um fragmento final de aproximadamente 826 a 864 pares de base (pb) (Figs. 13 e 14). A primeira reação consistiu em 10,5 µL de solução de DNA obtida a partir do processo de extração, adicionada a uma mistura constituída por 12,5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red, 1 µL do *primer* externo direto 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' e 1 µL do *primer* externo reverso 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'. A segunda reação consistiu em 2,0 µL do produto de PCR da primeira reação adicionado a uma mistura constituída por 8,5 µL de água destilada, 12,5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red, 1 µL do *primer* interno direto 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' e 1 µL do *primer* interno reservo 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'. As reações foram realizadas nas mesmas condições: 35 ciclos de 94 ° C durante 45 segundos (s), 55 ° C durante 45 s, e 72 ° C durante 1 minuto.^{15, 21}

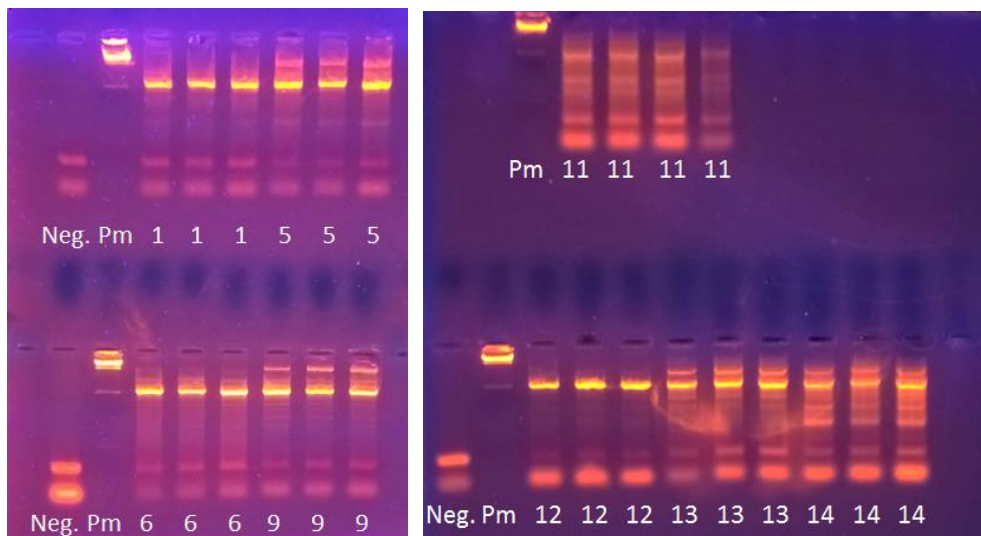


Figs. 13 e 14: Gel de electroforese a 1,4% com os produtos de PCR da 2ª reação de *Cryptosporidium spp.* (imagem à esquerda); Gel de electroforese a 1,4% com o fragmento de interesse de *Cryptosporidium spp.* isolado do 1º gel (imagem à direita). Fonte: Captada pelo autor

Para a análise da sequência do gene da β-giardina dos cistos de *Giardia duodenalis* realizou-se um semi-nested PCR. Na primeira reação, amplificou-se um fragmento de 753 pb (Figs. 15 -17), utilizando o *primer* direto G7 (5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3') e o *primer* reverso G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'). A mistura de PCR consistiu em 10,5 µL de solução de DNA obtida a partir do processo de extração, adicionada a 12,5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red e 1 µL de cada *primer*.

Na segunda reação do semi-nested PCR, um fragmento de 384 pb foi amplificado utilizando o *primer* direto G376 (5'- CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3') e o *primer* reverso G759. Para esta reação utilizou-se 2,5 µL do produto de PCR da primeira reação.

O PCR foi realizado da seguinte forma: após um passo de desnaturação inicial de 2 minutos (min) a 95°C, realizou-se um conjunto de 30 ciclos, cada ciclo era composto por 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 60 s a 72 °C, seguidos de uma extensão final de 5 min a 72 °C. ^{1,22}



Figs. 15 e 16: Gel de electroforese a 1,5% com os produtos de PCR da 1ª reação de *Giardia duodenalis* das amostras 1, 5, 6 e 9 (imagem à esquerda); Gel de electroforese a 1,5% com os produtos de PCR da 1ª reação de *Giardia duodenalis* das amostras 11, 12, 13 e 14 (imagem à direita). Fonte: Captada pelo autor



Fig. 17: Gel de electroforese a 1,5 % com o fragmento de interesse de *Giardia duodenalis* isolado do gel anterior. Fonte: Captada pelo autor

Para todas as reações de PCR, o controlo negativo foi preparado com água destilada. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio sob luz UV. Após a reação de PCR bem-sucedida, os produtos de PCR foram purificados do gel de agarose utilizando o kit NZYGelpure (NZYTech, Portugal). ^{1,15,18}

Os fragmentos de DNA foram sequenciados em ambas as direções num laboratório comercial (GATC Biotech AG, Colónia, Alemanha), utilizando os *primers* diretos. As sequências de DNA obtidas foram comparadas com um banco de dados (GenBank em www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), usando o software BLAST e corrigidas usando o software ChromasPro1. ¹⁷

Deteção de (oo)cistos em amostras de água

Para identificação dos protozoários foi executado o Método 1623 da EPA também designado por teste de imuno-separação magnética e imunofluorescência. Os filtros Envirochek foram tratados para efeitos de eluição dos parasitas aprisionados numa solução constituída por Laureth, Tris-EDTA e antifoam A. Foi adicionado a cada filtro 130 mL desta solução. Posteriormente foram colocados num agitador tridimensional durante 25 minutos.²³

A solução de eluição foi vertida para um tubo de Falcon de 150 mL e centrifugada a 1800 rpm durante 30 min. O sobrenadante foi decantado, deixando-se o mínimo necessário para re-suspender o sedimento. Este foi transferido para um tubo Leighton para imuno-separação.²³

Resumidamente, a cada tubo Leighton foi adicionado 1 mL de tampão A 10x, 1 mL de tampão B 10x, 100 µL de Dynabeads *Cryptosporidium* e 100 µL de Dynabeads *Giardia* (Dynabeads® GCCombo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Noruega). Os tubos Leighton foram posteriormente colocados em rotação no *Sample Mixer*, durante 1 hora à temperatura do laboratório.⁴

Finalmente, os tubos Leighton foram colocados, um a um, num concentrador de partículas magnéticas e movidos suavemente durante 2 minutos através de um ângulo de 90° (DynaL MPC-1 - *Magnetic Particle Concentrator*). O sobrenadante foi rejeitado, os tubos foram removidos do concentrador de partículas magnéticas e adicionou-se 1 mL de tampão A 1x a cada tubo. Os tubos foram suavemente agitados para re-suspender o complexo beads - (oo)cistos e a suspensão final foi transferida para Eppendorfs de 1,5 mL. Os Eppendorfs foram colocados num segundo concentrador de partículas magnéticas e foram agitados durante 1 minuto (DynaL MPC-S - *Magnetic Particle Concentrator*). De seguida, aspiramos todo o sobrenadante. O íman do concentrador de partículas permitiu que o complexo beads - (oo)cistos aderisse à parte posterior dos Eppendorfs e se pudesse aspirar o sobrenadante sem interferir com o complexo beads - (oo)cistos.⁴

Após aspirarmos o sobrenadante, removemos o íman do concentrador de partículas e adicionamos 50 µL de HCl (0,1 mol) a cada tubo e vortexamos durante 15 segundos, deixamos repousar 5 minutos, vortexamos 15 segundos e deixamos repousar novamente durante 5 minutos. O HCl permitiu desfazer a ligação dos (oo)cistos às beads.⁴

Posteriormente, foi colocado novamente o íman no concentrador de partículas. As beads aderiram à parte de trás dos Eppendorfs devido à força do íman e os (oo)cistos ficaram em solução. Transferimos toda a solução, sem as beads, para uma lâmina com 5 µL de NaOH 1,0 N para microscopia por imunofluorescência.⁴

As lâminas foram deixadas a secar à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte foram preparadas para observação por imunofluorescência de acordo com as instruções do fabricante do kit (Aqua-Glo™ G/C Direct Comprehensive Kit, Waterborne, Inc., New Orleans, LA).⁴

Análise estatística

Com o objetivo de investigar se a presença de oocistos de *Cryptosporidium spp.* estava associada com diferentes fatores, como a idade do animal, a presença de diarreia e a fonte de água foi utilizado o teste de qui-quadrado com correção para a continuidade, sempre que os pressupostos se verificaram ou através do teste Exato de Fisher. O nível de significância (α) usado foi de 0,05. A análise estatística foi realizada com o SPSS.¹⁶

Resultados

Distribuição da amostragem

Foram realizadas colheitas de amostras de fezes de 111 animais em 18 explorações (Gráfico 1 e tabela 6 em anexo). Dos animais amostrados, 63 (56,8%) são vitelos e 48 (43,2%) são adultos (Gráfico 2 e tabela 5 em anexo).

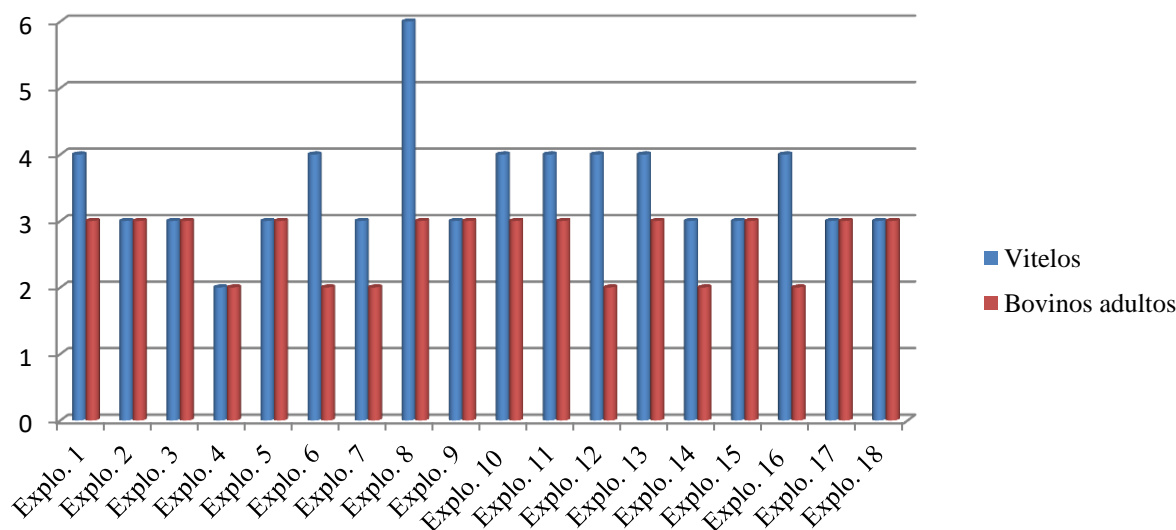


Gráfico 1: Número de animais amostrados por grupo etário por exploração

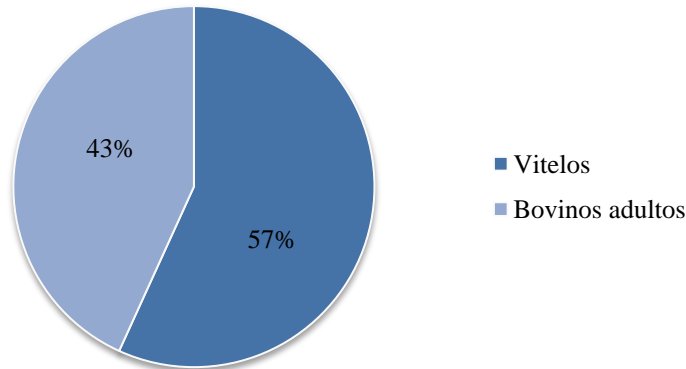


Gráfico 2: Distribuição da amostragem por grupo etário

Cryptosporidium spp. e G. duodenalis nas fezes dos animais

Quatro das 18 explorações (22,2%) foram positivas respectivamente para *Cryptosporidium spp.* e *Giardia duodenalis* e 9 das 18 explorações (50,0%) apresentaram coinfeção por estes 2 parasitas (Gráfico 3). Dentro de cada exploração, a presença de oocistos de *Cryptosporidium spp.* variou entre os 0,0 % e os 100,0% e a ocorrência de cistos de *G. duodenalis* variou entre os 0,0 % e os 80,0% (tabela 6, em anexo). Uma exploração foi considerada positiva quando pelo menos um animal proveniente dessa exploração apresentava (oo)cistos nas fezes analisadas.

Observámos (oo)cistos por imunofluorescência (DFA) em pelo menos uma amostra de fezes de 94,4% das explorações incluídas neste estudo. Apenas uma de 18 explorações foi negativa (exploração 7) tanto para *Cryptosporidium spp.* como para *Giardia duodenalis* em todas as amostras de fezes recolhidas (Gráfico 3 e tabela 2).

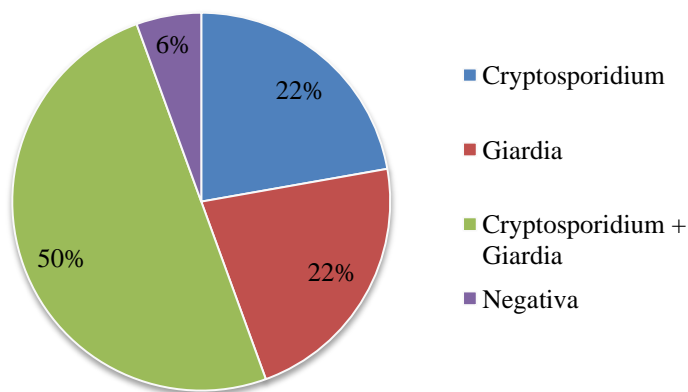


Gráfico 3: Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *G. duodenalis* por exploração

A nível individual, foram detetados oocistos de *Cryptosporidium spp.* em 29 amostras das 111 amostras (26,1%) de fezes de bovinos, cistos de *Giardia duodenalis* em 20 amostras (18,0%) de fezes e coinfeção em 8 amostras (7,2%) de fezes. Das 111 amostras de fezes de bovinos, 54 amostras (48,7%) foram negativas para ambos os parasitas (Gráfico 4).

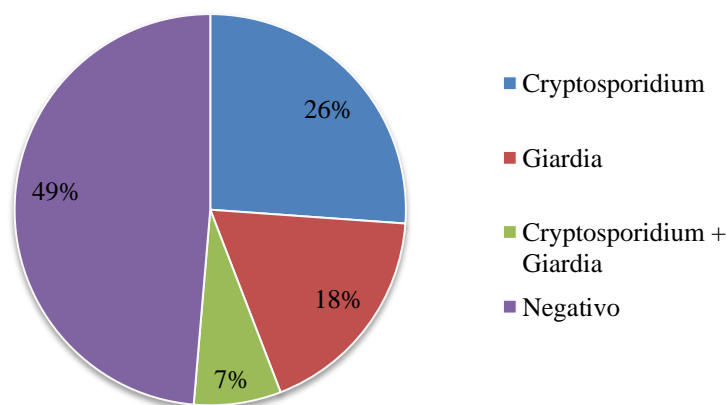


Gráfico 4: Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *G.duodenalis* por indivíduo

Das amostras analisadas provenientes de vitelos, 27 amostras (42,9%) foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium spp.* e 19 (30,2%) foram positivas para cistos de *Giardia duodenalis*. Das amostras analisadas de bovinos adultos, 10 (20,8%) e 9 (18,8%) amostras foram positivas para oocistos e cistos, respetivamente (tabela 1).

Idade	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i>	Total	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	Total
	negativo	positivo		negativo	positivo	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Vitelos	36 (57,1)	27 (42,9)	63 (100,0)	44 (69,8)	19 (30,2)	63 (100,0)
Vacas	38 (79,2)	10 (20,8)	48 (100,0)	39 (81,3)	9 (18,8)	48 (100,0)

Tabela 1: Ocorrência de infeções por *Cryptosporidium spp.* e *G. duodenalis* por grupo etário

Caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium spp.* e *G.duodenalis*

A amplificação por PCR foi realizada em 17 amostras de DNA (total de explorações positivas para oocistos de *Cryptosporidium spp.* e/ou cistos de *Giardia duodenalis*). A amostra de DNA foi constituída por um conjunto de sedimentos, por exploração, com oocistos e cistos, onde a extração de DNA foi realizada simultaneamente.

A genotipagem foi realizada em 12 isolados de *Cryptosporidium*. A sequenciação dos isolados de *Giardia* está ainda em curso.

A caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium* mostrou que o *C. parvum* foi a espécie predominante. O *Cryptosporidium andersoni* e o *Cryptosporidium ryanae* foram identificados, cada um, em apenas uma amostra e o *Cryptosporidium parvum* foi encontrado em 10 amostras (tabela 2).

Exploração	Imunofluorescência		Sequenciação	
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
1	positiva	positiva	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
2	positiva	negativa	<i>Cryptosporidium parvum</i>	---
3	positiva	negativa	<i>Cryptosporidium parvum</i>	---
4	positiva	negativa	<i>Cryptosporidium parvum</i>	---
5	positiva	positiva	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
6	positiva	positiva	<i>Cryptosporidium andersoni</i>	
7	negativa	negativa	---	---
8	positiva	positiva	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
9	negativa	positiva	---	
10	positiva	negativa	<i>Cryptosporidium parvum</i>	---
11	positiva	positiva	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
12	positiva	positiva	não amplificou	
13	negativa	positiva	---	
14	positiva	positiva	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
15	positiva	positiva	<i>Cryptosporidium ryanae</i>	
16	negativa	positiva	---	
17	negativa	positiva	---	
18	positiva	positiva	<i>Cryptosporidium parvum</i>	

Tabela 2: Resultados de microscopia por imunofluorescência e da caracterização genética por exploração

Análise dos fatores de risco associados com a criptosporidiose nos bovinos

A análise do qui-quadrado permitiu-nos observar a presença ou ausência de uma associação significativa entre a idade dos animais, a ocorrência de diarreia, fonte de água de consumo animal, tipo de estabulação, presença de outros parasitas e a detecção de oocistos de *Cryptosporidium spp.* nas fezes (tabela 3).

Fator	<i>Cryptosporidium</i> negativo n (%)	<i>Cryptosporidium</i> positivo n (%)	Total n (%)	Valor de prova
Idade				
Vitelos	36 (57,1)	27 (42,9)	63 (100,0)	0,025
Vacas	38 (79,2)	10 (20,8)	48 (100,0)	
Diarreia*				
Presente	11 (55,0)	9 (45,0)	20 (100,0)	0,001 ^(F)
Ausente	57 (90,5)	6 (9,5)	63 (100,0)	
Fonte de água dos animais*				
Poço	51 (68,0)	24 (32,0)	75 (100,0)	1,000
Furo	20 (66,7)	10 (33,3)	30 (100,0)	
Estabulação				
Viteiros individuais	28 (54,9)	23 (45,1)	51 (100,0)	0,677
Lotes de vitelos	8 (66,7)	4 (33,3)	12 (100,0)	
Giardia				
<i>Giardia</i> (+)	20 (71,4)	8 (28,6)	28 (100,0)	0,699
<i>Giardia</i> (-)	54 (65,1)	29 (34,9)	83 (100,0)	
Coccídeos				
<i>Coccídeos</i> (+)	12 (60,0)	8 (40,0)	20 (100,0)	0,662
<i>Coccídeos</i> (-)	62 (68,1)	29 (31,9)	91 (100,0)	

Tabela 3: Análise descritiva de fatores de risco associados com a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium spp.*

^(F) = Teste de Fisher

* **valores desconhecidos:** não obtivemos a informação da ocorrência de diarreia nem do tipo de fonte de água para todos os indivíduos estudados, daí a diferença entre os n totais analisados.

A excreção de oocistos apresentou uma associação significativa com a idade dos animais (valor de prova, $P = 0,025$) e com a ocorrência de diarreia ($P = 0,001$). No entanto, não houve associação com a fonte de água de consumo animal, o tipo de estabulação dos vitelos e com a existência de outros parasitas ($P \geq 0,662$).

A presença de *Cryptosporidium spp.* foi semelhante entre os animais com *Giardia* e os animais sem *Giardia* (28,6% versus 34,9%, animais *Cryptosporidium* positivos com e sem *Giardia* respectivamente).

Foram detetados substancialmente mais casos de *Cryptosporidium* positivos nos animais com diarreia do que nos animais sem diarreia (45,0% versus 9,5%).

A ocorrência de casos de criptosporidiose nas explorações parece ser independente da fonte de água que é fornecida aos animais ($P = 1,000$).

Cryptosporidium spp. e Giardia duodenalis nas amostras de água

A grande maioria das explorações (8/10) não apresentou contaminação da água por estes parasitas. Apenas 2 explorações apresentaram oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia duodenalis* na sua água. Na amostra da exploração 2 detetaram-se 0,05 oocistos de *Cryptosporidium spp.*/10L de água e 0,1 cistos de *Giardia duodenalis*/10L. A exploração 8 apresentou 2,8 oocistos de *Cryptosporidium spp.*/10L de água e 0,05 cistos de *Giardia duodenalis*/10L (tabela 4).

Devido ao reduzido número de oocistos e de cistos na exploração 2 não se amplificou a amostra, porque a baixa quantidade de (oo)cistos não permite uma extração eficiente de DNA para se realizar PCR.⁴

Os oocistos e cistos da exploração 8 foram isolados da lâmina e, após extração total de DNA, procedeu-se à amplificação por PCR. No entanto, não conseguimos amplificar (Fig. 18, não temos nenhum fragmento nos 826 a 864 pb na amostra A8).

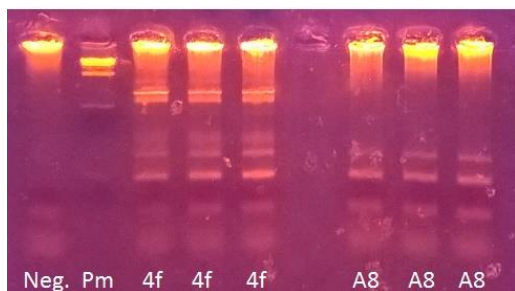


Fig. 18: Gel de electroforese a 1,4% com os produtos de PCR da 2ª reação de *Cryptosporidium spp.* (4f: amostra de DNA de oocistos de fezes da exploração 4; A8: amostra de DNA de oocistos da água da exploração 8). Fonte: Captada pelo autor

Análise bacteriológica das amostras de água

A presença de bactérias fecais foi encontrada em 7 de 10 amostras de água analisadas, sendo a sua maioria coliformes fecais. No entanto, também se encontrou *E.coli* na amostra 5, enterococos na amostra 9 e *Clostridium perfringens* na amostra de água 10 (tabela 4).

Nas 4 explorações em que a água também é consumida pelos produtores esta não está apta para consumo, dado que não se encontra conforme, segundo os requisitos de qualidade da água para consumo humano definidos no Decreto-Lei 306 - 2007 (tabela 4).

Amostras de água	Exploração	Contagem de <i>Cryptosporidium</i> na água (oocistos/10L)	Contagem de <i>Giardia</i> na água (cistos/10L)	Contagem de coliformes na água (MPN/100 mL)	Contagem de <i>E.coli</i> na água (MPN/100 mL)	Contagem de enterococos na água (MPN/100 mL)	Contagem de <i>Clostridium perfringens</i> na água (MPN/100 mL)
1	1*	0	0	101	0	0	0
2	2	0,05	0,1	165	0	0	0
3	3	0	0	0	0	0	0
4	4	0	0	0	0	0	0
5	5*	0	0	101	6	0	0
6	6	0	0	1	0	0	0
7	8	2,8	0,05	0	0	0	0
8	10	0	0	3	0	0	0
9	14*	0	0	> 201	0	5	0
10	17 *	0	0	0	0	0	3

Tabela 4: Resultados da análise de água das explorações (* = explorações onde a água é consumida pelos animais e pelos produtores)

Discussão

O principal objetivo deste trabalho de estágio incidiu em compreender se os bovinos são reservatórios biológicos de genótipos zoonóticos de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia duodenalis* e se a água fornecida aos animais é uma fonte de contaminação para os mesmos por estes parasitas.

Alguns estudos sobre reservatórios biológicos humanos e animais na região norte de Portugal indicaram uma importante presença de espécies zoonóticas de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia duodenalis* tanto nos seres humanos como nos bovinos.^{24,25,17}

Mendonça et al. (2007) no seu trabalho detetou uma prevalência de 25,4% de vitelos positivos e de 4,5% bovinos adultos positivos para *Cryptosporidium spp.* e uma prevalência de 14,1% vitelos positivos e de 0,57% bovinos adultos positivos para *Giardia duodenalis*.¹⁷

Neste trabalho, verificámos uma ocorrência relativamente elevada destes dois parasitas; apenas uma de 18 explorações foi negativa (5,6%) tanto para *Cryptosporidium spp.* como para *Giardia duodenalis* nas amostras de fezes recolhidas. Quatro explorações (22,2%) foram positivas respetivamente para *Cryptosporidium spp.* e *Giardia duodenalis* e 9 explorações (50,0%) apresentaram coinfeção por estes dois parasitas.

Esta elevada ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia duodenalis* ao nível das explorações vai de encontro ao observado em Espanha, em que ao longo do ano, foram detetados oocistos e cistos destes dois parasitas em todas as explorações leiteiras (100,0%) estudadas na bacia do rio Tambre, Galiza.¹

Ao nível do indivíduo, nós encontramos oocistos de *Cryptosporidium spp.* em 20,8% das amostras de bovinos adultos analisadas e 42,9% nas amostras de vitelos e a presença de cistos de *G. duodenalis* em 18,8% e 30,2% das amostras de bovinos adultos e de vitelos, respetivamente. Estes resultados vão de encontro aos valores encontrados por Castro-Hermida et al. (2009) e por Mendonça et al. (2007), no entanto não conseguimos fazer um estudo comparativo devido ao reduzido número de amostras, por exploração, do nosso estudo em relação a estes trabalhos.^{1,17}

Os resultados do presente estudo indicam que a infeção por *Cryptosporidium spp.* e por *G. duodenalis* é mais prevalente em vitelos do que nos bovinos adultos, o que está de acordo com as publicações anteriores.^{1,17}

Os níveis elevados de infeção por *Cryptosporidium spp.* e por *Giardia duodenalis* ao nível da exploração podem ser explicados pela exposição precoce dos vitelos recém-nascidos aos oocistos de *Cryptosporidium spp.* nos parques de maternidade e/ou a uma suscetibilidade relacionada com

a idade, falta de higiene ao nível dos viteleiros e a entrada de novos animais infetados para o efetivo.^{16,26}

A análise de alguns fatores de risco associados com a excreção de oocistos de *Cryptosporidium spp.* permitiu detetar uma associação com a idade dos animais ($P = 0,025$) e com a ocorrência de diarreia ($P = 0,001$). Estudos anteriores já tinham determinado uma correlação entre a presença de diarreia e a infeção por *Cryptosporidium spp.* nos vitelos.^{13,16}

Curiosamente, a fonte de água dos nossos animais não foi associada à presença de *Cryptosporidium spp.* nas fezes. No entanto, não podemos descartar a água como potencial fonte de contaminação com os parasitas *Cryptosporidium spp.* e *Giardia duodenalis*, dado que 2 de 10 explorações (20,0%) apresentavam oocistos e cistos destes parasitas na água fornecida aos animais.

O norte de Portugal, à semelhança da vizinha Galiza, tem uma alta densidade de espécies pecuárias, especialmente de bovinos de leite. O elevado número de explorações, a elevada proporção de animais e o grande volume de fezes que os animais produzem, demonstram a importância dos bovinos como potencial fonte de contaminação ambiental e como um possível reservatório de parasitas infecciosos. Um bovino adulto pode excretar até 40 kg de fezes por dia, pelo que um elevado grau de contaminação pode ocorrer no ambiente à volta das explorações.

Os bovinos podem eliminar cerca de $2,1 \times 10^{10}$ oocistos de *Cryptosporidium spp.* por dia e $6,2 \times 10^{10}$ cistos de *Giardia duodenalis* por dia. Isto pode representar um perigo para a saúde humana quando a contaminação ocorre com espécies zoonóticas.^{1,27}

Num trabalho anterior, Mendonça et al. (2007), mostrou que o *C. parvum* era a espécie predominante nos bovinos de Portugal, tendo também sido encontradas as espécies *C. meleagridis* e *C. andersoni* nas fezes dos animais estudados.¹⁷

No nosso estudo, das 12 sequências de *Cryptosporidium*, 10 sequências são *C. parvum*, um isolado considerado zoonótico, 1 sequência é *Cryptosporidium andersoni*, um isolado capaz de infetar os seres humanos e 1 sequência é de *Cryptosporidium ryanae*, um isolado considerado não-zoonótico. Estes resultados revelam que os bovinos podem ser um reservatório importante de *C. parvum* nesta zona do país.

Alguns estudos demonstram uma forte evidência epidemiológica para a transmissão zoonótica de criptosporidiose associada ao contato com os bovinos. Em estudos de caso-controlo em países industrializados, o contato com os bovinos estava implicado como um fator de risco para a criptosporidiose humana. No Reino Unido, o número de casos de criptosporidiose é maior em áreas com uma elevada estimativa de oocistos de *Cryptosporidium spp.* disseminados nos

terrenos a partir do estrume. Assim, os bovinos, especialmente os vitelos de leite, são provavelmente o principal reservatório de *C. parvum* em algumas áreas.²

Existem poucas evidências epidemiológicas que suportem a importância da transmissão zoonótica da giardíase nos seres humanos. Contudo, o contato com os animais das explorações pecuárias foi associado a um risco aumentado de infecção nos humanos adultos.²

As fezes dos animais, sob a forma de estrume e chorume, são utilizadas para fertilização dos terrenos agrícolas, muitas vezes próximos de cursos de água, sendo fundamental que os proprietários das explorações respeitem as boas-práticas de aplicação dos estrumes, de modo a reduzir a probabilidade de contaminação dos rios e das fontes de captação de água para consumo com parasitas das explorações de bovinos.¹

Conclusões

O presente estudo demonstrou que os bovinos das explorações de leite do Norte de Portugal são portadores da espécie zoonótica de *Cryptosporidium* mais frequente na criptosporidiose humana, o *C. parvum*. Considerando, que os bovinos podem excretar cerca de $2,1 \times 10^{10}$ oocistos por dia e, multiplicando pelo número de animais positivos (37) no nosso estudo, podemos antecipar uma contaminação ambiental na ordem dos 10^{12} oocistos por dia.

A proximidade das explorações dos cursos de água permite admitir a possibilidade de contaminação ambiental e da água dos rios por transferência de (oo)cistos.

Os resultados obtidos neste estudo permitem-nos tirar algumas conclusões sobre o risco de infecção animal e contaminação das fontes de água, contudo trabalhos futuros serão necessários para definir a prevalência de *Cryptosporidium spp.* e de *G. duodenalis* nesta região do país, uma vez que o limitado número de amostras do nosso estudo não permitiu fazer extrapolações para a população em geral. Assim, seria interessante alargar o número de explorações visitadas, bem como o número de animais analisados, por exploração e repetir as colheitas passados 7 dias de modo a aumentar a probabilidade de deteção de (oo)cistos, caso exista infecção e realizar mais colheitas, a cada exploração, ao longo do ano.

Seria, igualmente pertinente analisar as fezes dos funcionários das explorações e proceder à sua caracterização genética, de forma a perceber a dinâmica de transmissão de *Cryptosporidium spp.* e de *G. duodenalis* entre bovinos e humanos.

Para caracterizar a dispersão dos (oo)cistos no ambiente, poderíamos fazer análises de solo das explorações pecuárias, da água dos rios a jusante dessas explorações e nas zonas de captação das estações de tratamento de água potável.

Afigura-se pois, como fundamental, a monitorização regular da presença de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia duodenalis* na população humana, animal e no ambiente para avaliar o risco de infeção associado a estes dois parasitas.

Os cuidados preventivos aqui são plenamente justificados pela inexistência de fármacos de tratamento eficazes para a criptosporidiose humana e animal, e pela enorme resistência dos oocistos aos desinfetantes.

Bibliografia

1. Castro-Hermida JA, García-Preledo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia da Costa JM, Mezo M. (2009) "Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals" **Water Research** 43, 4133-4142
2. Xiao L, Fayer R. (2008) "Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission" **International Journal for Parasitology** 38, 1239-1255
3. OIE (2016) "Terrestrial Manual 2016" **OIE - World Organisation for Animal Health**, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.04_CRYPTO.pdf
4. Mendonça C. (2012) "*Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* infections in Bovine"
5. Cotruvo JA, Dufour A, Rees G, Bartram J, Carr R, Cliver DO, Craun GF, Fayer R, Gannon VPJ. (2004) "Waterborne Zoonoses: Identification, Causes, and Control" **World Health Organization**, IWA Publishing
6. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. (1997) "Waterborne Protozoan Pathogens" **Clinical Microbiology Reviews** 10, 67-85
7. CDC. "Cryptosporidiosis" **Centers for Disease Control and Prevention** <http://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>
8. CDC. "Giardiasis" **Centers for Disease Control and Prevention** <http://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>
9. Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RCA. (2004) "Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle" **Trends in Parasitology** 20, 185-191
10. Colford JM, Crockett CS, Mariella RP, Marsden P, Ramsey JM, Scott GI, Sobsey MD, Wade TJ. (2002) "Indicators for Waterborne Pathogens" **National Research Council**
11. Dawson D. (2004) "Foodborne protozoan parasites" **International Journal of Food Microbiology** 103, 207-227
12. Betancourt WQ, Rose JB. (2004) "Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*" **Veterinary Parasitology** 126, 219-234
13. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. (2000) "Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification" **International Journal for Parasitology** 30, 1305-1322
14. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. (2003) "Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal" **Journal of Clinical Microbiology** 41, 2744-2747

15. Starkey SR, Kimber KR, Wade SE, Schaaf SL, White ME, Mohammed HO. (2006) "Risk Factors Associated with Cryptosporidium Infection on Dairy Farms in a New York State Watershed" **Journal of Dairy Science** 89, 4229-4236
16. Garro CJ, Morici GE, Utgés ME, Tomazic ML, Schnittger L. (2016) "Prevalence and risk factors for shedding of Cryptosporidium spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina" **Parasite Epidemiology and Control** 1, 36-41
17. Mendonça C, Almeida A, Castro A, Delgado ML, Soares S, Correia da Costa JM. (2007) "Molecular characterization of Cryptosporidium and Giardia isolates from cattle from Portugal" **Veterinary Parasitology** 147, 47-50
18. Ehsan AM, Geurden T, Casaert S, Parvin SM, Islam TM, Ahmed UM, Levecke B, Vercruyse J, Claerebout E. (2015) "Assessment of zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium between cattle and humans in rural villages in Bangladesh" **PLoS One** 10, 1-11
19. Hoar BR, Atwill ER, Elmi C, Farver TB. (2001) "An examination of risk factors associated with beef cattle shedding pathogens of potential zoonotic concern" **Epidemiology and Infection** 127, 147-155
20. Silva Figueiredo JA. (2006) "Processos de Genotipagem de Cryptosporidium parvum & Giardia lamblia"
21. Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RCA, Fayer R, Lal AA. (1999) "Genetic diversity within Cryptosporidium parvum and related Cryptosporidium species" **Applied and Environmental Microbiology** 65, 3386-3391
22. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. (2002) "Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype Giardia duodenalis cysts from human faecal samples" **International Journal for Parasitology** 32, 1023-1030
23. **EPA United States Environmental Protection agency.** "Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA" (2005)
24. Almeida AA, Delgado ML, Soares SC, Castro A, Moreira MJ, Mendonça C, Canada NB, Correia da Costa JM. (2006) "Genotype analysis of Giardia isolated from asymptomatic children in northern Portugal" **Journal of Eukaryotic Microbiology** 53, 177-178

25. Almeida AA, Delgado ML, Soares SC, Castro A, Moreira MJ, Mendonça C, Canada NB, Correia da Costa JM, Coelho H. (2006) "Genetic Characterization of Cryptosporidium Isolates from Humans in Northern Portugal" **Journal of Eukaryotic Microbiology** 53, 26-27
26. Nydam D V, Mohammed HO. (2005) "Quantitative Risk Assessment of Cryptosporidium Species Infection in Dairy Calves" **Journal of Dairy Science** 88, 3932-3943
27. Daniels ME, Shrivastava A, Smith WA, Sahu P, Odagiri M, Misra PR, Panigrahi P, Suar M, Clasen T, Jenkins MW (2015) "Cryptosporidium and giardia in humans, domestic animals, and village water sources in rural India" **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 93, 596-600

Anexos

Caracterização da amostragem

Exploração	Tipo	Fonte de água amostrada	Profundidade da água (metros)	Volume de água amostrado (Litros)	Uso da água	Número de vitelos amostrado	Número de bovinos adultos amostrado
1	Leiteira	Poço	10	200	Animais e produtores	4	3
2	Leiteira	Poço	7	200	Animais	3	3
3	Leiteira	Furo	150	200	Animais	3	3
4	Leiteira	Poço	8	200	Animais	2	2
5	Leiteira	Poço	9	200	Animais e produtores	3	3
6	Leiteira	Furo	34	200	Animais	4	2
7	Leiteira	Furo	200	---	Animais e produtores	3	2
8	Leiteira	Poço	6	200	Animais	6	3
9	Leiteira	Poço	6	---	---	3	3
10	Leiteira	Poço	12	200	Animais	4	3
11	Leiteira	Furo	170	---	Animais e produtores	4	3
12	Leiteira e de Carne	Poço	10	---	Animais	4	2
13	Leiteira	Poço	7	---	Animais	4	3
14	Leiteira	Poço	4	200	Animais e produtores	3	2
15	Leiteira e de Carne	Poço	10	---	Animais	3	3
16	Leiteira	Poço	7	---	Animais	4	2
17	Leiteira e de Carne	Furo	80	200	Animais e produtores	3	3
18	Leiteira	Poço	10	---	Animais	3	3
Total						63	48

Tabela 5: Caracterização das explorações e da amostragem

Caracterização da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e de cistos de *G. duodenalis* dentro da exploração

Exploração		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
		n (%)	n (%)
1	N = 7	5 (71,4)	1 (14,3)
2	N = 6	4 (66,7)	0 (0,0)
3	N = 6	6 (100,0)	0 (0,0)
4	N = 4	4 (100,0)	0 (0,0)
5	N = 6	4 (66,7)	4 (66,7)
6	N = 6	2 (33,3)	2 (33,3)
7	N = 5	0 (0,0)	0 (0,0)
8	N = 9	1 (11,1)	3 (33,3)
9	N = 6	0 (0,0)	3 (50,0)
10	N = 7	2 (28,6)	0 (0,0)
11	N = 7	2 (28,6)	1 (14,3)
12	N = 6	3 (50,0)	2 (33,3)
13	N = 7	0 (0,0)	1 (14,3)
14	N = 5	2 (40,0)	4 (80,0)
15	N = 6	1 (16,7)	2 (33,3)
16	N = 6	0 (0,0)	2 (33,3)
17	N = 6	0 (0,0)	2 (33,3)
18	N = 6	1 (16,7)	1 (16,7)
Total	N = 111	37 (33,3)	28 (25,2)

Tabela 6: Ocorrência de (oo)cistos de *Cryptosporidium spp.* e de *G. duodenalis* em bovinos nas explorações, expressa por número de amostras positivas e em percentagem

N = total de animais estudados por exploração

n = número de animais positivos para um dos parasitas em estudo