

DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS FECAIS DE CABRITOS, BEZERROS E LEITÕES: Comparação entre métodos de concentração, coloração e análise molecular

Juliana de Carvalho Apolinário Coêlho

Fisioterapeuta-Doutora; Docente das Faculdades Integradas de Três Lagoas-AEMS

Natalia Marinho Dourado Coelho

Doutoranda UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.
Docente e Coordenadora do Curso de Enfermagem das Faculdades Integradas de Três Lagoas – AEMS, Três Lagoas, MS, Brasil.

Gisele de Carvalho Apolinário Santos

Doutora; Professora Contratada do Departamento de Matemática - UNESP – Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, SP, Brasil. Professora das Faculdades Integradas Rui Barbosa – FIRB – Andradina, SP, Brasil.

Willian Marinho Dourado Coelho

Pós-Doutor; Docente da Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, FEA – Fundação Educacional de Andradina, Andradina, SP, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar as técnicas de centrífugo-flutuação em solução de sacarose, centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, Kinyoun modificado e reação em cadeia da polimerase para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais frescas de caprinos, bovinos e suínos. Fezes foram colhidas diretamente do reto de 192 cabritos, 184 bezerros e 47 leitões. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram constatados em 11,45% (22/192) e 5,72% (11/192) dos cabritos, 4,34% (8/184) e 3,26% (6/184) dos bezerros, 2,12% (1/47) e 2,12% (1/47) dos leitões pelos métodos de Sheather e Faust, respectivamente. Nos esfregaços diretos de fezes, corados pelo método de Kinyoun, foram observados oocistos do referido protozoário em 6,77% (13/192), 4,34% (8/184) e 2,12% (1/47) dos cabritos, bezerros e leitões respectivamente. Por meio da análise molecular, 16,66% (32/192) dos cabritos, 6,52% (12/184) dos bezerros e 2,12% (1/47) dos leitões apresentaram amplificação positiva para *Cryptosporidium*. Todas as amostras positivas pelos métodos de concentração e coloração foram igualmente positivas pela técnica de nested-PCR. A partir destes resultados pode-se inferir que a técnica de nested-PCR foi o método superior na detecção de *Cryptosporidium* quando comparado com os demais métodos empregados neste estudo, sendo capaz de revelar este parasito mesmo naquelas amostras com reduzido número de oocistos.

PALAVRAS-CHAVE: Faust; Kinyoun modificado; Nested-PCR; Sheather; técnicas coproparasitológicas

INTRODUÇÃO

Diversos pesquisadores têm relatado em seus estudos a ocorrência de divergências entre a eficiência dos diferentes métodos coproparasitológicos para a detecção de *Cryptosporidium* (BOMFIM; LOPES, 1994; FEITOSA *et al.*, 2004). Deste modo, técnicas de concentração (BUKHARI; SMITH, 1995), de coloração (LALLO *et al.*, 2009) e nested-PCR (KAUSHIK *et al.*, 2008) têm sido empregadas na detecção deste protozoário em caprinos (BOMFIM *et al.*, 2005), bovinos (HUBER *et al.*, 2004) e suínos (CALDERARO *et al.*, 2001).

O objetivo deste estudo foi determinar e comparar a eficiência das técnicas de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (Sheather), centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Faust), Kinyoun modificado e reação em cadeia da polimerase tipo nested (n-PCR) para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais frescas de caprinos, bovinos e suínos.

METODOLOGIA

Fezes foram colhidas diretamente do reto de 192 cabritos, 184 bezerros e 47 leitões, machos e fêmeas, de diferentes raças. Foram utilizadas como técnicas de concentração a centrífugo-flutuação em solução de sacarose (densidade específica de 1,20 g/mL) e a centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (densidade específica 1.180 kg/m⁻³). Para a coloração dos esfregaços fecais foi empregado o método de Kinyoun modificado..

A análise molecular foi realizada com a técnica de n-PCR, após extração de DNA dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. conforme Meireles *et al.* (2007), seguindo-se a amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA (XIAO *et al.*, 1999), permitindo a amplificação de fragmentos de DNA de todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* conhecidos.

Foi elaborado um índice de contagem média de oocistos por campos de microscopia. Pela visualização aleatória em aumento de 400 vezes, determinou-se: 0 = ausência de oocistos, 1 a 2 = raros, 3 a 4 = +, 5 a 7 = ++, 8 a 10 = +++ e acima de 10 = ++++. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo Teste Qui-Quadrado.

RESULTADOS

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram constatados em 11,45% (22/192) e 5,72% (11/192) dos cabritos, 4,34% (8/184) e 3,26% (6/184) dos bezerros, 2,12% (1/47) e 2,12% (1/47) dos leitões pelos métodos de Sheather e Faust, respectivamente. Pelo método de Kinyoun modificado, oocistos foram observados em 6,77% (13/192), 4,34% (8/184) e 2,12% (1/47) dos cabritos, bezerros e leitões respectivamente. Por meio da análise molecular, 16,66% (32/192) dos cabritos, 6,52% (12/184) dos bezerros e 2,12% (1/47) dos leitões apresentaram amplificação positiva para *Cryptosporidium*. Todas as amostras positivas pelos métodos de concentração e coloração foram igualmente positivas pela técnica de n-PCR.

Por meio do Teste Qui-Quadrado, nos cabritos, a detecção de oocistos pelo método de Sheather foi superior aos resultados obtidos pelas técnicas de Faust ($P < 0,0009$) e Kinyoun ($P > 0,5930$). Este fato não foi observado nas amostras fecais dos bezerros quando comparadas as técnicas de Sheather e Faust ($P > 0,1573$). O número médio de oocistos observados por campo de microscópio em aumento de 400 vezes foi maior nos bezerros e leitões, e notadamente menor nos cabritos (Tabela 1).

Tabela 1: Nível estimado de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de 192 cabritos, 184 bezerros e 47 leitões pelas técnicas coproparasitológicas de Sheather, Faust e Kinyoun modificado.

Técnica	Índice	Cabritos	Bezerros	Leitões
		Frequência (Porcentagem)	Frequência (Porcentagem)	Frequência (Porcentagem)
Sheather	Negativo	170 (88,54%)	176 (95,65%)	46 (97,87%)
	raros	4 (2,08%)	1 (0,54%)	0 (0,0%)
	+	6 (3,13%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	++	9 (4,69%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	+++	2 (1,04%)	2 (1,09%)	0 (0,0%)
	++++	1 (0,52%)	5 (2,72%)	1 (2,12%)
Faust	Negativo	181 (94,27%)	178 (96,74%)	46 (97,87%)
	raros	7 (3,65%)	2 (1,09%)	0 (0,0%)
	+	3 (1,56%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	++	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	+++	1 (0,52%)	3 (1,63%)	0 (0,0%)

	++++	0 (0,0%)	1 (0,54%)	1 (2,12%)
	Negativo	179 (93,23%)	176 (95,65%)	46 (97,87%)
	raros	9 (4,69%)	2 (1,09%)	0 (0,0%)
Kinyoun	+	1 (0,52%)	1 (0,54%)	0 (0,0%)
modificado	++	1 (0,52%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	+++	1 (0,52%)	3 (1,63%)	0 (0,0%)
	++++	1 (0,52%)	2 (1,09%)	1 (2,12%)

Fonte: da pesquisa (2015).

DISCUSSÃO

Diversos pesquisadores têm classificado a técnica de Sheather como um dos melhores métodos de concentração de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de diferentes espécies animais (ANDERSON, 1981; ALVES *et al.*, 2005; CARDOZO *et al.*, 2008). A eficácia do método de Sheather é comparável às técnicas de Ritchie e Kinyoun associados na identificação de oocistos de *Cryptosporidium*, como pode ser observado no trabalho de Scott *et al.* (1985) que, ao comparar estas técnicas, constataram 18,1% (127/703) e 18,4% (129/703) de amostras positivas respectivamente.

Corroborando com nossos resultados, diversos estudos têm demonstrado a técnica de Sheather como superior na detecção de *Cryptosporidium*, mesmo quando comparada com outras técnicas de coloração (HUBER *et al.*, 2004), ensaio imunoenzimático (FEITOSA *et al.*, 2004) e Faust (ALVES *et al.*, 2005).

Ainda que no presente estudo a técnica de Faust tenha possibilitado recuperar um menor número de oocistos em confronto com a técnica de Sheather, pesquisadores tem empregado este primeiro método como importante ferramenta na detecção de *Cryptosporidium* em amostras de fezes de humanos (CARVALHO *et al.*, 2006), eqüinos (GOMES *et al.*, 2008) e animais silvestres (SOARES *et al.*, 2008; LALLO *et al.*, 2009).

Kaushik *et al.* (2008) demonstraram em seus estudos que a técnica de n-PCR é considerada como o método mais sensível e específico na detecção de *Cryptosporidium*, em confrontação com diversos métodos de coloração e de ELISA, chegando a 100% de sensibilidade e especificidade. Contrariamente, Magi *et al.* (2004) constataram que o método de Kinyoun foi superior à técnica de PCR e testes

imunológicos rápidos, sendo considerado como o método mais prático, barato e eficaz no diagnóstico deste protozoário.

O método de coloração de Kinyoun é amplamente utilizado na rotina laboratorial, revelando oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes conservadas (AMATO NETO *et al.*, 2003) ou frescas (FANFA *et al.*, 2010), viabilizando ainda a preservação das amostras coradas e da morfologia dos oocistos (AMATO NETO *et al.*, 1996).

CONCLUSÃO

Baseado em nossos resultados, a técnica de nested-PCR foi superior aos demais métodos para a detecção de *Cryptosporidium* em cotejo às demais técnicas empregadas neste estudo, detectando este protozoário mesmo naquelas amostras com reduzido número de oocistos.

REFERÊNCIAS

AMATO NETO, V.; BEZERRA, R. C.; ALARCÓN, R. S. R.; BRAZ, L. M. A. Conservação de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes para exame parasitológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 303-304, 2003.

AMATO NETO, V.; BRAZ, L. M.; DI PIETRO, A. O.; MÓDOLO, J. R. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. in feces: comparison of the modified Kinyoun and Heine methods. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 575-578, 1996.

ANDERSON, B. C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 178, p. 892-984, 1981.

ALVES, O. F.; GOMES, A. G.; DA SILVA, A. C. Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia, Goiás: comparação de técnicas de diagnóstico. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 127-133, 2005.

BOMFIM, T. C. B.; LOPES, C. W. G. Avaliação de alguns métodos de identificação de oocistos do gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em surto de diarreia em suínos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, p. 37-40, 1994.

BOMFIM, T. C. B.; HUBER, F.; GOMES, R. S.; ALVES, L. L. Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy goats, associated with possible risk factors on the studied properties. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 9-13, 2005.

CALDERARO, F. F.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; FERREIRA, A. J. P.; JEREZ, A. J.; PENA, H. J. F. Freqüência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, p. 29-34, 2001.

CARDOZO, S. V.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. Avaliação das técnicas de rotina no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi* em amostras de fezes de frango de corte (*Gallus gallus domesticus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 351-353, 2008.

CARVALHO, T. B.; CARVALHO, L. R.; MASCARINI, L. M. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis*, and *Enterobius vermicularis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 269-273, 2006.

FANFA, V. R.; FARRET, M. H.; DA SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G. *Cryptosporidium* spp. em furão (*Mustela putorius furo*) no Sul do Brasil. **Biotemas**, v. 23, p. 225-227, 2010.

FEITOSA, F. L. F.; SHIMAMURA, G. M.; ROBERTO, T.; MEIRELES, M. V.; NUNES, C. M.; CIARLINI, P. C.; BORGES, A. S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 189-193, 2004.

GOMES, A. D.; BARRETA, C.; ZIEGLER, D. P.; SAUSEN, L.; STOEVEER, N.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G.; ZANELLA, A. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em eqüinos estabulados no Jockey Club de Santa Maria-RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2662-2665, 2008.

HUBER, F.; BOMFIM, T. C.; GOMES, R. S. Comparação da eficiência da coloração pelo método da safranina a quente e da técnica de centrífugo-flutuação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 81-84, 2004.

KAUSHIK, K.; KHURANA, S.; WANCHU, A.; MALLA, N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 1-7, 2008.

LALLO, M. A.; PEREIRA, A.; ARAÚJO, R.; FAVORITO, S. E.; BERTOLLA, P.; BONDAN, E. F. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em área de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1465-1470, 2009.

MAGI, B.; CANOCCHI, V.; TORDINI, G.; CELLESI, C.; BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**, v. 98, p. 150-152, 2006.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F.; GENNARI, S. M. *Natural infection with zoonotic subtype of Cryptosporidium parvum in Capybara (Hydrochoerus hydrochaeris) from Brazil. Veterinary Parasitology*, v. 147, p. 166-170, 2007.

SOARES, J. F.; DA SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; DA SILVA, M. K.; MARISCANO, G.; SALOMÃO, E. L.; MONTEIRO, S. G. Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. *Ciência Rural*, v. 38, n. 2, p. 548-550, 2008.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. *Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1578-1583, 1999.