

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

FRANZISKA HUBER¹; TERESA C. BOMFIM²; RAQUEL S. GOMES¹

ABSTRACT:- HUBER, F.; BOMFIM, T.C.; GOMES, R.S. [Comparison between the efficiency of the hot safranin stain and the centrifugation-fluctuation technique for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples of domestic animals.] 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, n. 2, p. 81-84, 2004. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Br 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: fran_ufrj@hotmail.com

The objective of the present work was to compare the diagnostic efficiency between the hot safranin stain and the centrifugation-fluctuation technique, for *Cryptosporidium* oocysts, in faecal samples of domestic animals. There were analyzed 166 dog faecal samples, 48 cat samples, 105 goat samples and 21 bovine samples, totalizing 340 samples. After processing the faecal samples, one drop of the resulting sediment was used in faecal smears which were stained using the standard method for the hot safranin stain, with the rest of the sediment was realized the sedimentation-fluctuation technique with hypertonic sugar solution. Statistical analysis was performed using the Fishers exact test. Of the 340 faecal samples, 20 contained *Cryptosporidium* sp. oocysts, when analyzed with the sedimentation-fluctuation method, being 4 dog samples, 6 cat samples, 5 goat samples and 5 bovine samples. Using the hot safranin stain, oocysts were found in only 4 samples, being 2 dog samples and 2 goat samples. There was a statistical significant difference between the two methods ($p < 0.001$), showing that the centrifugation-fluctuation method is more indicated, than the hot safranin stain, for the diagnosis of *Cryptosporidium* sp. oocysts in faeces of domestic animals.

KEY WORDS: *Cryptosporidium*, safranin stain, fluctuation, diagnosis, domestic animals.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi comparar a eficiência diagnóstica, para oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de animais domésticos, utilizando as técnicas

de centrífugo-flutuação e o método da safranina a quente. Foram coletadas 166 amostras fecais de cães, 48 de gatos, 105 de caprinos e 21 de bovinos, totalizando 340 amostras. Após o processamento das fezes, uma gota do sedimento foi utilizada em esfregaços em lamina de vidro, para serem coradas pelo método da safranina-azul de metileno a quente. Com o sedimento restante foi realizada a técnica da centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar. Para análise estatística foi utilizado o teste Fisher exato. Dos 340 exames

¹ Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Br 465, Km 7, CEP23890-000, Seropédica, RJ. E-mail: fran_ufrj@hotmail.com

² Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ.

fecais examinados pela centrífugo-flutuação, 20 continham oocistos de *Cryptosporidium* sp., sendo quatro de cães, seis de gatos, cinco de caprinos e cinco de bovinos. Já, nas lâminas coradas pela técnica da safranina a quente, foi possível a visualização de oocistos em apenas duas lâminas de esfregaço de fezes de cães e duas de caprinos. Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$) entre as duas técnicas, sendo que a centrífugo-flutuação foi considerada como a mais indicada para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium*, safranina-azul de metileno, centrífugo- flutuação, diagnóstico, animais domésticos.

Cryptosporidium compreende protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, sendo que as espécies são parasitas das microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal. A localização deste parasito caracteriza-se por ser intracelular, porém extracitoplasmático, ocasionando perda das microvilosidades e conseqüente prejuízo na eficiência de absorção dos nutrientes contidos na luz intestinal, podendo ocasionar quadros clínicos de diarreia e má absorção com resultantes prejuízos na produtividade de animais de exploração comercial (FAYER, 1997).

O pequeno tamanho dos oocistos das diversas espécies do gênero *Cryptosporidium*, que apresentam em média 5,3 x 4,6 µm, dificulta o diagnóstico, sendo geralmente necessário que o exame microscópico seja realizado por uma pessoa treinada (IRWIN, 2002).

A principal metodologia de diagnóstico utilizada, na maioria dos laboratórios, é a que permite a identificação da presença de oocistos nas fezes, sem a determinação da espécie de *Cryptosporidium* envolvida (O'DONOUGHUE, 1995). Este fato deve-se a duas razões principais: a facilidade dos procedimentos laboratoriais e o relativo baixo custo, quando comparados a metodologias mais elaboradas, como a reação da Polimerase em cadeia (PCR). Essa identificação pode ser realizada mediante técnicas de coloração de esfregaços fecais em lâminas de vidro ou por técnicas de exames a fresco.

As técnicas de coloração são variadas, sendo que as técnicas mais utilizadas atualmente, é a de Ziehl-Neelsen e suas variantes, que compreendem os métodos de Kinyoun modificado a frio, Ziehl-Neelsen modificado a quente, Safranina modificada a quente e Ziehl-Neelsen-Dimetilsulfóxido (DE CARLI, 2000).

Pela técnica de Ziehl-Neelsen e suas variantes, os oocistos são corados em tons vermelho-alaranjados, enquanto que os artefatos fecais coram-se em azul ou verde de acordo com o contracorante utilizado. A coloração de esfregaços de fezes permite um diagnóstico fácil e rápido para a detecção de oocistos nas fezes (ARROWOOD, 1997), porém, nem sempre

este método é o mais sensível, principalmente considerando-se que animais assintomáticos podem eliminar poucos oocistos, pois o sucesso no diagnóstico dependerá sempre da presença e da quantidade de oocistos no esfregaço fecal (TZIPORI, 1988).

Existem divergências entre os autores sobre qual das técnicas ou métodos de coloração é o mais indicado para o diagnóstico de *Cryptosporidium*. Alguns pesquisadores descrevem como sendo a coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, mais eficiente que a Safranina- Azul de metileno (MOODLEY et al., 1991; EL-WAHED, 1999), enquanto que outros consideram as técnicas como sendo equivalentes (WEITZ; TASSARA, 1989; NACE et al., 1999). Quando considerada a equivalência diagnóstica de ambas colorações, a Safranina-azul de metileno apresenta menor custo dos reagentes, maior facilidade operacional e maior rapidez na execução que a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen modificada (BOGAERTS, et al., 1984; WEITZ; TASSARA, 1989; NACE et al., 1999).

Na década de 80, a maioria dos diagnósticos baseava-se no exame de esfregaços fecais corados (TZIPORI, 1988), atualmente as técnicas de concentração do material fecal, através da utilização de soluções saturadas de açúcar, cloreto de sódio ou sulfato de zinco, têm sido muito utilizadas, por aumentarem as chances de encontrar oocistos, principalmente em animais assintomáticos, nos quais a quantidade de oocistos eliminados nas fezes é bem menor quando comparadas aos animais sintomáticos (STERLING; ARROWOOD, 1993).

Quando se utiliza a técnica de centrífugo-flutuação em solução de açúcar, os oocistos provenientes de fezes frescas, podem ser observados ligeiramente róseos, na microscopia de campo claro, e claros e refringentes quando vistos em contraste de fase. Os oocistos encarquilham a partir de 15 minutos, perdendo sua forma esférica, assim como também, a sua coloração rósea (CURRENT; GARCIA, 1991).

Devido ao pequeno tamanho dos oocistos de *Cryptosporidium*, torna-se necessária uma centrifugação em alta rotação e por um maior tempo, que o utilizado pelas técnicas rotineiras de sedimentação fecal. Semelhantemente, as melhores técnicas de flutuação parecem ser aquelas que utilizam soluções de alta gravidade específica, porém as amostras precisam ser examinadas logo após o preparo (em 10 minutos), pois os oocistos encarquilham ou podem colabar quando expostos por muito tempo à solução saturada (O'DONOUGHUE, 1995).

Mtambo et al. (1991), compararam seis técnicas diagnósticas para oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de gatos, entre elas a flutuação em solução saturada de açúcar e o exame de lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Os resultados mostraram que a técnica de flutuação foi capaz de diagnosticar oocistos de *Cryptosporidium* em 13 amostras, enquanto o exame do esfregaço fecal diagnosticou oito amostras de um total de 19 amostras positivas. Os autores concluíram que a leitura de esfregaços fecais corados, foi dispendiosa em tempo, pois

eram poucos os oocistos presentes, além de ser menos sensível que as outras técnicas testadas.

Moodley et al. (1991) e Miranda et al. (1997) examinaram amostras fecais de pacientes humanos, utilizando as técnicas de centrífugo-flutuação e de coloração de esfregaços fecais pela Safranina-azul de metileno. Os autores constataram que a técnica da centrífugo-flutuação foi o melhor método para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* sp.

O objetivo do presente trabalho foi de comparar as técnicas de centrífugo-flutuação e de coloração de esfregaços fecais com o método da Safranina- azul de metileno, para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* sp., em fezes de animais de companhia e animais de produção.

Foram coletadas 166 amostras fecais de cães, 48 amostras fecais de gatos, 105 amostras fecais de caprinos e 21 amostras fecais de bezerras, totalizando 340 amostras. No laboratório, as fezes foram homogeneizadas com água destilada e filtradas em tamis de plástico descartáveis contendo uma gaze. Após esta filtragem, o material fecal foi colocado em tubos de ensaio cônicos e centrifugados a 402,28g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, e com uma gota do sedimento foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro, para a realização da coloração pelo método da Safranina a quente.

Ao sedimento restante adicionou-se solução saturada de açúcar (330 ml de água destilada e 500g de açúcar) que foi homogeneizado, o material foi centrifugado a 402,28g por 5 minutos. Após este procedimento, o tubo foi completado com solução de açúcar e coberto com uma lamínula, ficando em repouso por três minutos. A lamínula foi montada sobre uma lâmina de vidro e examinada em microscópio óptico com e sem contraste de fase.

Para a técnica de centrífugo-flutuação modificada, foi utilizada a metodologia descrita por Figueiredo et al. (1984) e para o método da Safranina – azul de metileno a quente, seguiu a metodologia de De Carli (2000).

Após o esfregaço do sedimento fecal em lâminas, estas foram secas ao ar, fixadas em ácido-álcool por cinco minutos. Em seguida a lâmina foi lavada em água corrente e posteriormente coberta com solução de safranina 1% e aquecida sobre uma chama durante um minuto, contados a partir da emissão de vapores. Logo após, a lâmina foi lavada em água corrente e corada com azul de metileno a 3% durante dois minutos para depois ser novamente lavada e examinada ao microscópio óptico, após a secagem.

Para a visualização dos oocistos foi utilizado um microscópio biocular Olympus BX 51. Em ambas as técnicas o exame das lâminas foi feito com objetiva de 40x e confirmação do diagnóstico com objetiva de 100x.

Para análise estatística foi utilizado o teste Fisher exato. O programa estatístico utilizado foi Statcalc do Epiinfo, programa de análises epidemiológicas do Center of Disease Control and Prevention (DEAN et al., 2000).

Dos 340 exames fecais examinados pela centrífugo-flutuação, 20 continham oocistos de *Cryptosporidium* sp., sendo que quatro amostras de cães, seis amostras de gatos,

Tabela 1. Eficiência da detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes de diferentes hospedeiros, comparando a técnica da centrífugo-flutuação e a da coloração pela safranina a quente.

Hospedeiros	Total	Amostras positivas		
		Técnica de Centrífugo-Flutuação	Técnica de Safranina-Azul de metileno	Número de amostras negativas
Cães	166	4	2	162
Gatos	48	6	-	42
Caprinos	105	5	2	100
Bezerras	21	5	-	16
TOTAL	340	20	4	320

cinco amostras de caprinos e cinco de bezerras. Já, nas lâminas coradas pelo método da safranina a quente, foi possível a visualização de oocistos num total de quatro lâminas, sendo duas de esfregaço de fezes de cães e duas de esfregaço de fezes de caprinos, as 16 amostras restantes, foram positivas para técnica da centrífugo-flutuação, resultando em falsos negativos pelo método da safranina a quente. A comparação das duas técnicas poderá ser melhor visualizada na Tabela 1.

Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre as duas técnicas, sendo que a centrífugo-flutuação mostrou-se mais eficiente no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais. Esta diferença pode ser devido à concentração do sedimento fecal pela solução saturada de açúcar, enquanto que na técnica do esfregaço de fezes é examinada uma quantidade reduzida de sedimento fecal, sendo que o exame de apenas uma lâmina corada mostrou ser insuficiente para o diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. em animais que estão eliminando poucos oocistos nas fezes.

Estes resultados concordam com Miranda et al. (1997), Moodley et al. (1991) e Mtambo et al. (1991).

Nos cães e gatos, o número de oocistos visualizados por lâmina de centrífugo-flutuação nunca foi maior que cinco. Sendo que nos dois esfregaços de amostras fecais de cães, positivos pela técnica da Safranina a quente, foi detectado apenas um oocisto por lâmina de esfregaço.

De maneira geral, as amostras fecais continham poucos oocistos nas lâminas de centrífugo-flutuação, exceção feita às duas amostras de caprinos, nas quais foram detectados abundantes oocistos, em ambas as técnicas realizadas.

Reforça-se assim, a importância da utilização de técnicas de concentração e flutuação de fezes, para facilitar o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* sp. principalmente em hospedeiros que apresentam a doença subclínica, como já foi considerado por outros autores.

Agradecimentos:- Agradecemos ao CNPq, a FAPERJ e a CAPES pelo apoio financeiro recebido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARROWOOD, M.J. Diagnosis. In: FAYER, R. (Ed.). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 43-60.
- BOGAERTS, J.; LEPAGE, P.; ROUVROY, D.; VANDEPITTE, J. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea in Central Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 20, n. 5, p. 874-876, 1984.
- CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiological Reviews*, v. 4, n. 3, p. 325-358, 1991.
- DE CARLI, G. A. Cadernos EDIPUCRS – *Parasitologia Clínica: Diagnóstico de laboratório dos coccídios e Microsporídios intestinais*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000. p. 17-23.
- DEAN, A.G.; ARNER, T.G.; SANGAN, S.; SUNKI, G.G.; FRIEDMAN, R.; LANTINGA, M.; ZUBIETA, J.C.; SULLIVAN, K.M.; SMITH, D.C. EpiInfo 2000, a database and statistics program for public health professionals for use on Windows 94, 98, NT and 2000 Computers. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention, 2000.
- EL-WAHED, M.M.A. *Cryptosporidium* infection among sheep in Oalubioa Governadorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 29, n. 1, p. 113-118, 1999.
- FAYER, R.; SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. The general Biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER, R. (Ed.) *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 1-60.
- FIGUEIREDO, P. C.; SERRAFREIRE, N. M.; GRISI, L. Eimerias de bovinos leiteiros no estado do Rio de Janeiro: técnicas de diagnóstico e espécies identificadas. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, n. 24, p. 3-10, 1984.
- IRWIN, P.J. Companion Animal Parasitology: A clinical perspective. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 5, p. 581-593, 2002.
- MIRANDA, C.; ALBUQUERQUE, Y.M.; ARCOVERDE, C.; MAGALHÃES, V.; MELO, V.; SANTOS, A.Q. Ocorrência de criptosporidiose e isosporiase intestinal em pacientes infectados pelo HIV atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE e avaliação comparativa de três métodos laboratoriais para o seu diagnóstico. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 54, n. 11, p. 916-921, 1997
- MOODLEY, D.; JACKSON, T.F.; GATHIRAM, V.; VANDEN ENDE, J. A comparative assessment of commonly employed staining procedures for the diagnose of cryptosporidiosis. *South African Medical Journal*, v. 79, n. 6, p. 314-317, 1991
- MTAMBO, M.M.A.; NASH, A.S.; BLEWETT, D.A.; WRIGHT, S. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens. *Veterinary Parasitology*, v. 45, n. 1-2, p. 49-57, 1992.
- NACE, E.K.; STEURER, F.J.; EBERHARD, M.L. Evaluation of Streck tissue fixative, a non formaline fixative for preservation of stool samples and subsequent parasitologic examination. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 12, p. 4113-4119, 1999.
- O'DONOUGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.
- STERLING, C.R.; ARROWOOD, M.J. Cryptosporidia. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. v. 6, p. 159-213.
- TZIPORI, Criptosporidiosis in perspective. *Advances in Parasitology*. v. 27. n. 1 p. 63-129. 1988.
- WEITZ, J.C.; TASSARA, R. Diagnosis of Cryptosporidiosis: a comparative study on Ziehl-Neelsen and Safranin stain methods. *Revista Médica de Chile*, v. 117, n. 8, p. 899-902, 1989.

Recebido em 24 de setembro de 2003.

Aceito para publicação em 29 de julho de 2004.