

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DE SEDIMENTAÇÃO PELO FORMALDEÍDO-ÉTER E DA TÉCNICA DE CENTRÍFUGO-FLUTUAÇÃO MODIFICADA NA DETECÇÃO DE CISTOS DE *Giardia* SP. E OOCISTOS DE *Cryptosporidium* SP. EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS

FRANZISKA HUBER¹; TERESA C. BOMFIM²; RAQUEL S. GOMES³

ABSTRACT:- HUBER, F.; BOMFIM, T.C.; GOMES, R.S. [Comparison between the efficiency of the formaldehyde-ether sedimentation technique and the sugar fluctuation technique for the detection of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* sp. oocysts in fecal samples from calves.] Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 3, p. 135-137, 2003. Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: fran_ufrj@hotmail.com

Thirty one fecal samples were examined using the formaldehyde-ether sedimentation technique and the sugar fluctuation technique with hypertonic sugar solution, to determine the technique more efficient for the diagnosis of *Cryptosporidium* sp. oocysts and *Giardia* sp. cysts. Using the sugar fluctuation technique, three fecal samples were positive for *Cryptosporidium* sp. oocysts. The formaldehyde-ether sedimentation technique failed to detect *Cryptosporidium* sp. in all samples. Because of the few positive cases, it was not possible to determine statistical significance, but the sugar fluctuation technique seems to be more efficient for the detection of *Cryptosporidium* oocysts than the formaldehyde-ether sedimentation technique. For *Giardia* sp. the sugar fluctuation technique detected 21 positive fecal samples, while the formaldehyde-ether sedimentation technique detected 19 positive fecal samples. There was a statistically significant difference ($p < 0.01$), thus the sugar fluctuation technique is most indicated for the diagnose of *Giardia* sp.

KEY WORDS: *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., diagnosis, calves, fluctuation.

RESUMO

Foram comparadas as técnicas de sedimentação pelo formaldeído-éter e de centrífugo-flutuação modificada utilizando solução saturada de açúcar para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* sp. e cistos de *Giardia* sp. em 31 amostras fecais de bezerros. Pela técnica da centrífugo-flutuação modificada foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* em três amostras enquanto que, pela técnica da sedimentação pelo formaldeído-éter, não foram encontrados oocistos nas amostras fecais. O pequeno número de amostras positivas não permitiu a realização de teste estatístico, apesar disso a técnica de centrífugo-flutuação modificada foi mais eficiente para o diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. que a técnica do formaldeído-éter. Já, quanto aos cistos de *Giardia* sp., observados pela técnica da centrífugo-flutuação modificada 21 amostras resultaram positivas e 19 pela técnica do formaldeído-éter. Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$), sendo a técnica de centrífugo-flutuação modificada mais eficiente que a técnica do formaldeído-éter, para o diagnóstico de *Giardia* sp.

Palavras-chave: *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., diagnóstico, bezerros, flutuação.

¹Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: fran_ufrj@hotmail.com

²Departamento de Parasitologia Animal – UFRRJ.

³Curso de Graduação em Zootecnia UFRRJ.

Giardia pertence aos protozoários flagelados que habitam o trato intestinal, parasitando uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, entre eles o homem. A giardíase, doença causada por este protozoário é, atualmente considerada uma doença re-emergente, devido a um aumento na frequência da infecção no homem, infectando principalmente crianças e indivíduos imunocomprometidos (THOMPSON, 2000).

Cryptosporidium compreende protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, sendo que as espécies são parasitas das microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal. A localização deste protozoário caracteriza-se por ser intracelular, porém extracitoplasmático, ocasionando danos aos microvilos e conseqüente prejuízo na eficiência de absorção dos nutrientes contidos na luz intestinal, podendo ocasionar quadro clínico de diarreia e má absorção conseqüentemente gerando prejuízos na produtividade de animais de exploração comercial (FAYER et al., 1997).

Devido à possibilidade de transmissão zoonótica, a infecção em ruminantes domésticos, tanto por *Giardia* sp. quanto por *Cryptosporidium* sp. merece atenção especial, pois estes são responsáveis pela contaminação ambiental. Formas infectantes desses protozoários podem chegar a fontes de água através do escoamento das pastagens e a utilização das fezes dos animais como adubo (OLSON et al., 1995). Epidemias de doenças intestinais infecciosas transmitidas pela água são bem documentadas. Enquanto que no início da década de 20 os agentes causais predominantes eram *Salmonella typhi* e *S. paratyphi*, nos últimos 20 anos tem se dado destaque a *Giardia*, *Campylobacter* sp. e *Cryptosporidium* como importantes causadores de doenças veiculadas pela água. (HOAR et al., 2001).

O pequeno tamanho dos oocistos das diversas espécies do gênero *Cryptosporidium*, que medem, aproximadamente 5,3 x 4,6 µm, dificulta o diagnóstico, sendo geralmente necessário um exame microscópico realizado por uma pessoa treinada (IRWIN, 2002). Aliado a este fator está também o baixo peso dos oocistos, tornando necessária a utilização de cuidados especiais durante o processamento laboratorial, para que um diagnóstico seguro possa ser emitido (ARROWOOD, 1997; O'DONOUGHUE, 1995).

Diversos métodos de diagnóstico para *Giardia* sp. podem ser empregados, de acordo com a sensibilidade diagnóstica desejada. Geralmente, o diagnóstico depende da visualização de cistos em amostras fecais, ou de trofozoítas nos aspirados e conteúdo duodenal ou em biópsias de mucosa intestinal. Existem também métodos indiretos de diagnóstico, através de testes de imunoabsorção de antígenos parasitários solúveis (ELISA) (KULDA; NOHÝNKOVÁ, 1995).

Na década de 80, a maioria dos diagnósticos baseava-se no exame de esfregaços fecais corados (TZIPORI, 1988), já atualmente as técnicas de concentração do material fecal, através da flutuação mediante utilização de soluções saturadas de açúcar, sal ou sulfato de zinco, ou pela sedimentação, geralmente utilizando-se o formaldeído-éter, têm ganhado adeptos, por aumentarem as chances de encontrar oocistos e cistos, principalmente em animais assintomáticos, quando comparados aos animais sintomáticos (STERLING; ARROWOOD, 1993). Além das técnicas de concentração aumentarem o número de oocistos e cistos nas preparações, elas também eliminam a maioria dos detritos fecais e, em al-

gumas técnicas, apresentam o protozoário inalterado, facilitando sua identificação (DE CARLI, 1994).

Devido ao pequeno tamanho dos oocistos de *Cryptosporidium*, torna-se necessária uma centrifugação de alta velocidade e por maior tempo, que o utilizado pelas técnicas rotineiras de sedimentação fecal. 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 mais tempo à solução saturada (O'DONOUGHUE, 1995).

Já a técnica de formaldeído-éter, possui a vantagem de retirar as gorduras e as fibras presentes nas fezes, sendo recomendada principalmente para o diagnóstico de protozoários em amostras fecais de bezerros (FAYER et al., 1997).

Estudos comparativos entre as técnicas de centrifugo-flutuação modificada e do formaldeído-éter, para o diagnóstico de *Cryptosporidium* sp., têm apresentado resultados conflitantes. Sendo que alguns autores não encontraram diferenças significativas (ANDERSON, 1983) enquanto outros relatam maior eficiência para a centrifugo-flutuação modificada (GARCIA et al., 1983) ou para a sedimentação com formaldeído-éter (MTAMBO et al., 1992).

O objetivo do presente trabalho foi comparar a eficiência das técnicas de sedimentação em formaldeído-éter e do centrifugo-flutuação modificado para o diagnóstico de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros.

Foram coletadas 31 amostras fecais de bezerros com menos de três meses de idade. 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 dois tubos de ensaio cônico de 15 ml e centrifugado a 402,28g por 10 minutos. Posteriormente, desprezou-se o sobrenadante e do sedimento de um dos tubos foi realizada a técnica do centrifugo-flutuação modificada e com o sedimento do outro, a técnica da sedimentação pelo formaldeído-éter.

Para a técnica do centrifugo-flutuação modificado (FIGUEIREDO et al., 1984), no sedimento fecal foi adicionada solução saturada de açúcar (330 ml de água destilada e 500g de açúcar) e após ser homogeneizado, o material foi centrifugado a 402, 28g por cinco minutos. Logo após, o tubo foi completado com solução de açúcar e coberto com 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 realização da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter, segundo protocolo de Arrowood, (1997) o sedimento fecal do segundo tubo foi transferido para um tubo de vidro com capacidade para 14 ml. Foram adicionados 10 ml de formol a 10% ao sedimento e após um descanso de pelo menos 20 min foram acrescentados 4 ml de éter. O tubo foi tampado e agitado vigorosamente. O tubo foi destampado, para permitir a diminuição da pressão interna, sendo tampado novamente para ser centrifugado a 402,28 g por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado sendo uma gota o sedimento montado sobre lâmina de vidro, coberta com lamínula e visualizado em microscópio óptico

com e sem contraste de fase. Em ambas as técnicas o exame das lâminas foi feito com objetiva de 40x e confirmação do diagnóstico com objetiva de 100x.

Para a análise estatística dos resultados 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 31 exames fecais examinados para cistos de *Giardia*, 19 amostras foram positivas e 10 amostras negativas em ambas as técnicas. Duas amostras foram positivas apenas na técnica da centrífugo-flutuação modificada.

Quanto à detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp., das 31 amostras, 28 resultaram negativas em ambas as técnicas. Três amostras foram positivas apenas pela técnica da centrífugo-flutuação modificada. Todas as amostras examinadas pela técnica da sedimentação pelo formaldeído-éter foram negativas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$) entre as duas técnicas, sendo que a centrífugo-flutuação modificada mostrou ser mais eficiente no diagnóstico dos cistos de *Giardia* sp. Apesar desta mesma técnica ter detectado três casos de *Cryptosporidium* sp., o pequeno número de amostras fecais positivas não permitiu a realização de teste estatístico.

A diferença entre as duas pode ser explicada pela concentração do sedimento fecal pela solução saturada de açúcar e o exame de todo o sedimento fecal. Enquanto que na técnica do formaldeído-éter é examinada uma quantidade reduzida de sedimento fecal concentrado, diminuindo assim as chances de serem encontradas formas parasitárias em fezes de hospedeiros com baixa carga parasitária, podendo resultar em falsos negativos. Na técnica de centrífugo-flutuação modificada os detritos fecais dividem-se por estratos sendo que os mais pesados ficam logo acima da lâmina, enquanto os mais leves, entre eles cistos e oocistos, ficam abaixo da laminula. Assim o campo microscópico examinado apresenta-se relativamente limpo, facilitando o reconhecimento de formas parasitárias. Já na técnica do formaldeído-éter não ocorre desta maneira, sendo que os detritos fecais permanecem no mesmo nível dos cistos e oocistos, dificultando a visualização clara destes, principalmente em amostras fecais de baixa carga parasitária.

Reforça-se assim, a importância da utilização de técnicas de concentração e flutuação de fezes, para facilitar o diagnóstico de cistos de *Giardia* sp. (KULDA; NOHÝNKOVÁ, 1995) e de oocistos de *Cryptosporidium* sp., principalmente em hospedeiros subclínicos, como já foi considerado por Fayer et al. (1997), Sterling e Arrowood (1993) e Mtambo et al. (1992).

A técnica de centrífugo-flutuação modificada foi mais eficiente no diagnóstico de cistos de *Giardia* sp. do que a técnica do formaldeído-éter.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B.C. Cryptosporidiosis. Laboratory Medicine, v. 14, n. 1, p. 55-56, 1983.
- ARROWOOD, M.J. Diagnosis. In: FAYER, R. (Ed.). Cryptosporidium and cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 43-60.
- 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.
- DE CARLI, G.A. Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses humanas – Métodos e Técnicas. Rio de Janeiro: Medsi, 1994. p. 810.
- 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.; SERRA-FREIRE, N.M.; GRISI, L. Eimerias de bovinos leiteiros no estado do Rio de Janeiro: técnicas de diagnóstico e espécies identificadas. Atas Sociedade Biológica do Rio de Janeiro, n. 24, p. 3-10, 1984.
- GARCIA, L.S.; BREWER, T.C.; BRUCKNER, D.A.; SHIMIZU, R.Y. Techniques for the recovery and identification of Cryptosporidium oocysts from stool specimens. Journal of Clinical Microbiology, v. 18, n. 1, p. 185-190, 1983.
- HOAR, B.R.; ATWILL, E.R.; ELMI, C.; FARVER, T.B. An examination of risk factors associated with beef cattle shedding pathogens of potential zoonotic concern. Epidemiology and Infection, v. 127, n. 1, p. 147-155, 2001.
- IRWIN, P.J. Companion Animal Parasitology: A clinical perspective. International Journal for Parasitology, v. 32, n. 5, p. 581-593, 2002.
- KULDA, J.; NOHÝNKOVÁ, E. Giardia in Humans and Animals. In: KREIER, J.P. (Ed.) Parasitic Protozoa, 2ª. ed. San Diego: Academic Press, 1995. v. 10, p. 225-422.
- 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.
- O'DONOUGHUE, P.J. Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals. International Journal for Parasitology, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.
- OLSON, M.E.; MCALLISTER, T.A.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; CHENG, K.J.; BURET, A.G.; CERI, C. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. Journal of American Medical Veterinary Research, v. 56, n. 11, p. 1470-1474, 1995.
- STERLING, C.R.; ARROWOOD, M.J. Cryptosporidia. In: KREIER, J. P. Parasitic Protozoa, 2ª. ed. San Diego: Academic Press, 1993, v. 6, p. 159-213.
- THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. International Journal for Parasitology, v. 30, n. 12-13, p. 1259-1267, 2000.
- TZIPORI, Criptosporidiosis in perspective. Advances in Parasitology, v. 27, n.1, p. 63-129. 1988.

Recebido em 24 de setembro de 2003.

Aceito para publicação em 30 de dezembro de 2003.