

AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ROTINA NO DIAGNÓSTICO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium baileyi* EM AMOSTRAS DE FEZES DE FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus domesticus*)

SERGIAN V. CARDOZO¹; WALTER L. TEIXEIRA FILHO²; CARLOS WILSON G. LOPES²

ABSTRACT:- CARDOZO, S.V.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. [Evaluation of different diagnostic techniques for oocysts of *Cryptosporidium baileyi* in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) fecal samples]. Avaliação das técnicas de rotina no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi* em amostras de fezes de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 351-353, 2008. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Hospital Universitário Antônio Pedro, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Rua Marquês do Paraná, 303, Centro, Niterói, RJ 24030-210, Brasil. E-mail: sergian@ufrj.br

The objective of this work is to evaluate different diagnostic techniques for *Cryptosporidium baileyi* oocysts in broiler chickens fecal samples infected naturally. So 90 samples were collected and conditioned in bottles with 10% formaline and submitted to Sheater's technique in bright field. Besides it, duplicate smears of the same samples were stained by safranin-methylene blue and modified Ziehl-Neelsen. Among the staining techniques, modified Ziehl-Neelsen got better result in the detention of *C. baileyi* oocysts in comparison to safranin-methylene blue. In spite of no significant differences among these techniques in the diagnosis of *C. baileyi* oocysts of fecal samples, bright field presented better results.

KEY WORDS: *Cryptosporidium baileyi*, oocysts, fecal samples, bright field, safranin-methylene blue, modified Ziehl-Neelsen.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas na rotina do diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi* nas fezes de frangos de corte naturalmente infectados. Assim sendo, 90 amostras fecais foram coletadas e acondicionadas em frascos contendo formalina a 10%. Logo após, uma parte das amostras fecais foi submetida a técnica de Sheater e examinada em campo brilhante para a identificação de oocistos. Ao lado dessa, esfregaços feitos em duplicata da mesma amostra fecal foram corados em safranina-azul

de metileno e em Ziehl-Neelsen modificado. Quanto as técnicas tintoriais, Ziehl-Neelsen modificado foi o que teve o melhor resultado em identificar oocistos de *C. baileyi* em comparação com a de safranina-azul de metileno. Apesar de não haver diferenças significativas entre as técnicas de diagnóstico, campo brilhante foi a que apresentou melhor resultado em comparação com as técnicas tintoriais utilizadas nesse trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium baileyi*, oocistos, amostras de fezes, campo brilhante, safranina azul de metileno, Ziehl-Neelsen modificado.

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia, Hospital Universitário Antônio Pedro, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Rua Marquês do Paraná, 303, Centro, Niterói, RJ 24030-210, Brasil. E-mail: sergian@ufrj.br - bolsista CAPES.

² Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 07, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mails: leira@ufrj.br e lopescw@ufrj.br - bolsista CNPq.

Cryptosporidium baileyi é um parasita pertencente ao filo Apicomplexa que infecta frangos e outras espécies de aves (LINDSAY; BLAGBURN, 1990; CURRENT, 1991; CARDOZO et al., 2005). O tamanho de seus oocistos é consideravelmente pequeno quando comparado a outros coccídios, além de serem morfológicamente similares a células leveduriformes. Contudo, vários métodos de coloração têm

sido empregados para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes, devido a uma maior praticidade e sensibilidade dessas técnicas quando comparadas aos exames histológicos (CURRENT, 1985).

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 em relação aos animais sintomáticos (STERLING; ARROWOOD, 1993). Ao utilizar o método de concentração em solução de "Sheather" e coloração de esfregaços com Giemsa, Anderson (1981) encontrou um maior número de oocistos e uma melhor preservação de sua morfologia na técnica de concentração, enquanto que na técnica de Giemsa houve distorção e retração dos oocistos, algumas vezes com dificuldade de observação das estruturas internas permanecendo como forma negativa do oocisto no esfregaço de fezes (BOMFIM, 1989).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade e a especificidade das técnicas de rotina como a de centrífugo-flutuação de Sheather (ANDERSON, 1981), examinada em campo brilhante (S-CB) e de coloração de esfregaço fecal pelos métodos de Ziehl-Neelsen modificado (ZN-M) (HENRIKSEN; POLENZ, 1981) e safranina-azul de metileno (S-AM) (BAXBY et al., 1984) para detecção de oocistos de *C. baileyi* em fezes de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*).

Oocistos de *C. baileyi* foram obtidos das fezes de 90 frangos de corte da raça Cobe, naturalmente infectados, procedentes de três municípios do Estado do Rio de Janeiro. Destes, 30 de Magé, 30 de Seropédica e 30 do Rio de Janeiro, subprefeitura de Campo Grande. Todas as amostras, foram acondicionadas em frascos contendo formalina a 10% e posteriormente, diluídas em PBS pH 7,2, filtradas em tamis de plástico e gaze dobrada em quatro, e submetidas às técnicas de S-CB e centrífugo sedimentação formaldeído-éter (RICHTIE, 1948). Das mesmas amostras, esfregaços em duplicata do sedimento foram feitos, utilizando o material obtido pela técnica de Richtie (1948) e corados pelas técnicas de S-AM e ZN-M.

Para observação dos oocistos, tanto pelo método de concentração quanto pelas técnicas de coloração, foi utilizado um microscópio binocular Carl Zeiss (RFA) em objetiva de 40x e confirmação do diagnóstico com objetiva de imersão (100x).

A análise estatística foi realizada com base em Sampaio (2002).

Existem divergências entre as técnicas de coloração e qual a mais indicada para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes de animais com infecção natural. Alguns pesquisadores descrevem como sendo a coloração pela técnica de ZN-M, mais eficiente que a S-AM (MOODLEY et al. 1991; EL-WAHED, 1999), enquanto que outros consideram as técnicas como sendo equivalentes (WEITZ; TASSARA, 1989;

Tabela 1. Comparação das técnicas de Ziehl-Neelsen modificado e safranina-azul de metileno no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi*.

Ziehl-Neelsen modificado	Safranina-azul de metileno		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	22	10	32
Negativo	8	50	58
Total	30	60	90

p < 0,0001; sensibilidade →73,33%; especificidade →83,33%; valor preditivo positivo →68,75%; valor preditivo negativo →86,20%

NACE et al. 1999). No presente trabalho, dentre as técnicas tintoriais utilizadas, a ZN-M obteve melhor resultado na detecção de oocistos de *C. baileyi* (Tabela 1). Segundo Baxby et al. (1984), a técnica da S-AM é mais simples e mais rápida que a de ZN-M, que apesar de um bom contraste, apresenta uma etapa crítica de descoloração. Essa mesma desvantagem da técnica de ZN-M também foi observada neste trabalho.

Mtambo et al. (1991), compararam seis técnicas de diagnóstico 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 ZN-M. Os resultados mostraram que a técnica de flutuação foi capaz de detectar oocistos de *Cryptosporidium* em 13 amostras, enquanto que o exame de esfregaço fecal revelou oito amostras de um total de 19 amostras positivas.

Para análise comparativa dos oocistos de *C. baileyi* nas fezes, observa-se que a visualização pela técnica de S-CB obteve melhor resultado do que as técnicas de coloração utilizadas (Tabelas 2 e 3). Segundo, Sterling e Arrowood (1993) e Miranda et al. (1997) a técnica de centrífugo-flutuação é mais sensível, quando comparada com os métodos de coloração,

Tabela 2. Comparação das técnicas de Sheather-campo brilhante e safranina-azul de metileno no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi*.

Sheather-campo brilhante	Safranina-azul de metileno		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	27	22	49
Negativo	3	38	41
Total	30	60	90

p < 0,0001; sensibilidade →90,00%; especificidade →63,33%; valor preditivo positivo →55,10%; valor preditivo negativo →92,68%

Tabela 3. Comparação das técnicas de Sheather-campo brilhante e Ziehl-Neelsen modificado no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi*.

Sheather-campo brilhante	Ziehl-Neelsen modificado		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	25	25	50
Negativo	7	33	40
Total	32	58	90

p < 0,0001; sensibilidade →78,12%; especificidade →56,89%; valor preditivo positivo →50,00%; valor preditivo negativo →82,50%

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. Resultados semelhantes foram observados por Bomfim e Lopes (1998) para *C. muris*. Já, Garcia et al. (1983) citaram que os métodos de coloração permanente são os mais efetivos.

As técnicas utilizadas para diagnóstico dos oocistos de *C. baileyi* nas fezes nesse trabalho foram eficazes em identificá-los, porém causaram alterações em suas estruturas, ficando assim a técnica de S-CB a melhor para identificar os oocistos nas fezes. Esta diferença pode estar relacionada à concentração de oocistos do sedimento fecal pela solução saturada de açúcar, enquanto que nas técnicas tintoriais são examinadas quantidades reduzidas de oocistos nos sedimento dos esfregaços de fezes utilizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B. C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 178, n. 9, p. 892-984, 1981.
- BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C. A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *Journal of Hygiene*, v. 93, n. 2, p. 317-323, 1984.
- BOMFIM, T.C.B. DO. *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em suínos: identificação, diagnóstico e alguns aspectos epidemiológicos. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária (Parasitologia Veterinária). 1989. 113 f - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí, 1989.
- BOMFIM, T. C. B. DO; LOPES, C. W. G. Comparative aspects of *Cryptosporidium muris*, Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: cryptosporidiidae) oocysts on *Rattus norvegicus* from two different habitats. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 7, n.2, p. 129-136, 1998.
- CARDOZO, S.V.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. Transmissão experimental de *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) isolado de frango de corte à codorna japonesa. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 14, n. 3, p. 119-124, 2005.
- CURRENT, W. L. Cryptosporidiosis. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 187, n. 12, p. 1334-1338, 1985.
- CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Review*, v.4, n. 3, p. 325-358, 1991.
- EL-WAHED, M. M. A. *Cryptosporidium* infection among sheep in Oalubioa Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v.29, n.1, p.113-118, 1999.
- GARCIA, L.S.; BRUCKNER, D.A.; BREWER, T.C.; 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.
- HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 22, n. 3-4, p. 594-596, 1981.
- LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Crptosporidiosis in birds. In: DUBEY, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. (Eds.) *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 133-148.
- MIRANDA, C.; ALBUQUERQUE, Y.M.; ARCOVERDE, C.; MAGALHÃES, V.; MELO, V.; SANTOS, A. Q. Ocorrência de cryptosporidiose e isosporíase 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.; VAN DEN 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.; NASH, A. S.; BLEWETT, D. A.; SMITH, H. V.; WRIGHT, S. *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic end feral cats in the Glasgow area. *Veterinary Record*, v.129, n. 23, p.502-504, 1991.
- 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.
- RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the United State Armed, Medical Department*, v. 8, p. 326, 1948.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 2002. p. 265.
- STERLING, C. R.; ARROWOOD, M. J. Cryptosporidia. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. v. 9, p. 159-213.
- 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 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.