

AVALIAÇÃO DE ALGUNS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE OOCISTOS DO GÊNERO *CRYPTOSPORIDIUM* TYZZER, 1907 (APICOMPLEXA:CRYPTOSPORIDIIDAE) EM SURTO DE DIARRÉIA EM SUÍNOS

T. C. B. BOMFIM¹ & C. W. G. LOPES²

(1) Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária. UFRRJ. CEP: 23.851-970, Itaguaí, RJ.

(2) Departamento de Parasitologia Animal-IB, UFRRJ. CEP: 23.851-970, Itaguaí, RJ.

SUMÁRIO. Este trabalho foi desenvolvido em uma suinocultura, onde os animais pós-desmamados apresentavam um quadro clínico de diarreia, sendo estes positivos para protozoários do gênero *Cryptosporidium*. Para evidenciar os oocistos de *Cryptosporidium*, amostras de fezes foram coradas pelo Giemsa, Safranina-Azul de Metileno, Ziehl-Neelsen modificado e fezes também foram observadas a fresco em contraste de fase após sofrer concentração pelo método de centrifugo-flutuação em açúcar modificado. Os oocistos foram observados em microscópio óptico e mensurados com auxílio de uma ocular micrométrica, onde avaliou-se a influência de cada metodologia aplicada sobre o diâmetro polar (DP) e diâmetro equatorial (DE). Obteve-se os seguintes resultados: fezes coradas pelo Giemsa (DP = $4,71 \pm 0,24\mu\text{m}$; DE = $4,86 \pm 0,26\mu\text{m}$); fezes coradas pela Safranina-Azul de Metileno (DP = $4,78 \pm 0,35\mu\text{m}$; DE = $5,10 \pm 0,19\mu\text{m}$); fezes coradas pelo Ziehl-Neelsen Modificado (DP = $3,20 \pm 0,01\mu\text{m}$) e fezes observadas a fresco em contraste de fase, concentradas pelo Método de Centrifugo-flutuação em açúcar modificado (DP = $6,22 \pm 0,56\mu\text{m}$; DE = $6,39 \pm 0,56\mu\text{m}$).

PALAVRAS-CHAVE: Oocistos, *Cryptosporidium*, métodos de coloração, suínos.

INTRODUÇÃO

A criptosporidiose tem sido uma parasitose observada em diversas espécies de vertebrados (ANDERSON, 1984, POHJOLA, 1984, CURRENT *et alii*, 1986 e ANDERSON, 1982).

Nestes últimos anos, a criptosporidiose tem tido grande importância por estar associada à síndrome da diarreia neonatal em espécies de importância econômica (GONZÁLEZ *et alii*, 1983), inclusive podendo ser transmitida para a espécie humana (ANDERSON, 1982).

Na infecção das espécies deste gênero *Cryptosporidium*, estão associadas, em sua maioria a uma proteção imune deficiente em associação com outros agentes etiológicos (ANGUS, 1983).

De maneira geral, várias técnicas tem sido utilizadas para facilitar o diagnóstico desta doença com base no aparecimento de oocistos das espécies desse gênero nas fezes (WILLSON & ACRES, 1982, BAXBY *et alii*, 1984 e MARTÍNEZ-VILLALOBOS & ALUJA, 1986). Porém

poucas, apesar de identificar os oocistos das espécies deste gênero, poderiam ser consideradas eficazes em um diagnóstico mais apurado; caso se faça necessário a identificação das espécies deste gênero encontradas em vertebrados (LEVINE, 1984) ou as que foram caracterizadas para mamíferos (TYZZER, 1907 e 1912 e UPTON & CURRENT, 1985).

Este trabalho tem como objetivo comparar algumas técnicas utilizadas no diagnóstico dos oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes de suínos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em uma suinocultura localizada no município de Itaguaí no Estado do Rio de Janeiro, onde os animais apresentavam um quadro clínico caracterizado como síndrome de diarreia. Amostras de fezes foram colhidas de todos os estratos de desenvolvimento da criação, tendo os animais diarreia ou não. As técnicas utilizadas neste trabalho foram caracterizadas em dois

Tabela 1 - Avaliação de quatro técnicas utilizadas na identificação do gênero *Cryptosporidium* provenientes de suínos¹.

Técnicas	Medidas ¹	
	Diâmetro polar (μ m)	Diâmetro equatorial (μ m)
Ziehl-Neelsen Modificada	3,10 \pm 0,10 a	3,20 \pm 0,01 a
Safranina-Azul de Metileno	4,78 \pm 0,35 b	5,10 \pm 0,29 b
Coloração pelo Giemsa	4,71 \pm 0,24 bc	4,86 \pm 0,26 c
Centrifugo-flutuação modificado/contraste de fase	6,22 \pm 0,56 d	6,39 \pm 0,56 d

¹ Os dados são referentes a medidas de 100 oocistos para cada técnica e os valores expressos em média e desvio padrão.

² Letras iguais não diferem significativamente à nível de 5% pelo teste de D.M.S.

segmentos: o primeiro por centrifugo flutuação modificado (FIGUEIREDO *et alii*, 1984) em contraste de fase e o outro caracterizado como técnicas tintoriais, onde esfregaços de fezes foram corados pelo Giemsa (TZIPORI, 1981), Safranina-Azul de metileno (S-AM) (BAXY *et alii*, 1984) e Ziehl-Neelsen modificado (ZN-M) (HENRICKSEN & POHLENZ, 1981), todas para evidenciar os oocistos nas fezes.

Os oocistos observados foram medidos com auxílio de uma ocular micrométrica SK-15 WILD acoplada a um microscópio S-M Lux Leitz e Wild M-20, quando se utilizou o contraste de fase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversas técnicas tem sido utilizadas no diagnóstico dos oocistos do gênero *Cryptosporidium* (FAYER & UNGAR, 1986), sendo que as que mais freqüentemente utilizadas no diagnóstico foram, as de solução saturada de açúcar/contraste de fase (BOMFIM, 1989, GARCIA *et alii*, 1983), Giemsa (ANDERSON & BULGING, 1981 e ANGUS *et alii*, 1981), S-AM (BAXBY *et alii*, 1984) e ZN-M (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981). Oocistos corados pelo Giemsa foi a que trouxe maior dificuldade na identificação dos mesmos em esfregaços e fezes, corroborando com o observado por MARTÍNEZ-VILLALOBOS & ALUJA (1986) e BOMFIM (1989). Da mesma maneira, os oocistos corados em ZN-M foram semelhantes as descrições morfológicas observadas por HENRIKSEN & POHLENZ (1981) e MARTÍNEZ-VILLALOBOS & ALUJA (1986).

Na técnica utilizada, centrifugo flutuação modificado-contraste de fase, observou-se os oocistos com um halo de

refringência a sua volta, podendo ser evidenciado no seu interior formas identificadas como esporozoítas, diferindo, por sua vez dos leveduriformes por serem refringentes e terem somente um núcleo, separando-os com facilidade das bactérias e restos celulares.

Já, nos esfregaços de fezes corados pelo Giemsa, os oocistos foram difíceis de serem distingüidos com facilidade, pois pouca diferença se observou entre os oocistos, leveduras, bactérias e restos celulares. Porém, quando se observam os oocistos em esfregaços corados pela técnica S-AM, estes coraram-se em vermelho rubi, tendo o fundo azul como contraste, constituído por leveduriformes, bactérias e restos celulares. Quanto aos esfregaços corados pelo ZN-M, foi onde se observaram com maior nitidez os oocistos que se coraram em vermelho, tendo como contraste um fundo verde caracterizado por bactérias, leveduras e restos celulares.

Apesar destas técnicas serem eficazes em diagnosticar a presença de oocistos do gênero *Cryptosporidium*, dificuldades podem aparecer na identificação das espécies que possam ser encontradas nas fezes dos animais parasitados, como se observam em medidas de oocistos deste gênero, quando se utilizou estas técnicas em amostras de fezes provenientes de suínos (Tabela 1). Por outro lado, quando se compara as regressões lineares obtidas com as medidas dos diâmetros polares e equatoriais destes oocistos, em contraste de fase, Giemsa, S-AM e ZN-M, observam-se que as alterações no tamanho e distribuição dos oocistos dificultam na identificação a nível de espécie, neste trabalho estudada (Fig.1).

Ao se comparar os oocistos oriundos de mesmas amostras de fezes, porém preparados por técnicas diferentes, pôde-se observar modificações relevantes que impossibilitariam enquadrar os oocistos encontrados nas características morfológicas observadas, tanto para *C. parvum* como para *C. muris*, com exceção dos oocistos observados em solução saturada de açúcar/contraste de fase e os corados pela S-AM, que mais de aproximaram das medidas observadas por TYZZER (1907 e 1912) e UPTON & CURRENT (1985), como *Cryptosporidium muris*.

SUMMARY

This research was developed in a pigsty where the animals post-weaned developed clinical signals of diarrhea, being these animals positive to *Cryptosporidium*.

To evidence the oocysts of *Cryptosporidium*, feces samples were stained by Giemsa, Safranin-Metilen Blue, Ziehl-Neelsen modified, and fresh feces were observed under phase contrast after concentration by a modified sugar centrifuge-floatation method.

Oocysts were observed in an optical microscope and they were measured, to evaluate the influence of each method

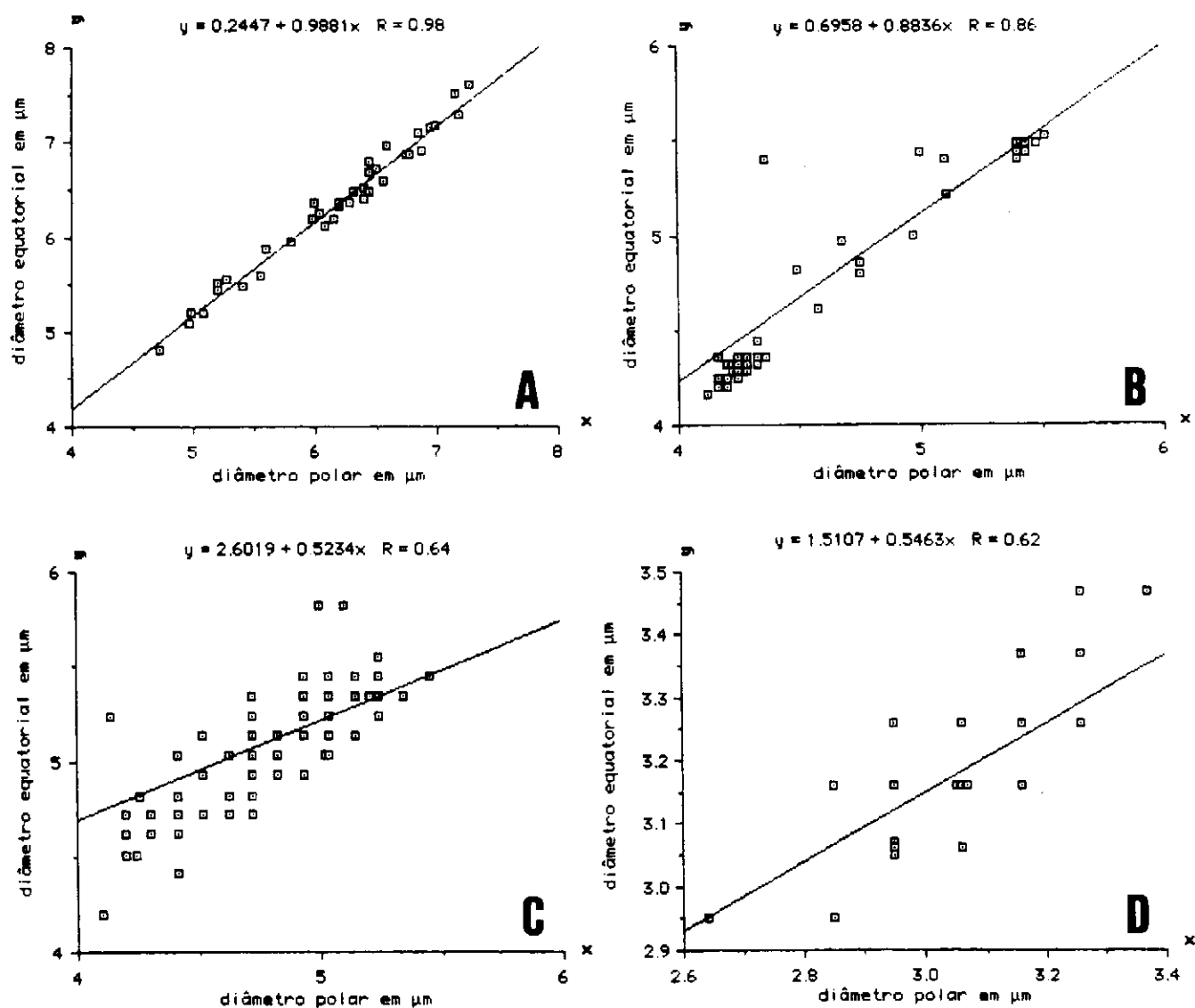


Fig. 1. Representação gráfica das regressões lineares dos diâmetros polar e equatorial de oocistos do gênero *Cryptosporidium*, provenientes de suínos. A) Em contraste de fase; B) corados pelo Giemsa; C) corados com Safranina-Azul de Metileno; D) corados com o Ziehl-Neelsen/Modificado.

based on the polar diameter (DP- μm) and equatorial diameter (DE- μm). Results observed in this research were followed: feces stained by Giemsa (DP = $4.71 \pm 0.24 \mu\text{m}$; DE = $4.86 \pm 0.26 \mu\text{m}$); feces stained by Safranin-Metilen Blue (DP = $4.78 \pm 0.35 \mu\text{m}$; DE = $5.10 \pm 0.29 \mu\text{m}$); feces stained by Ziehl-Neelsen modified (DP = $3.10 \pm 0.10 \mu\text{m}$; DE = $3.20 \pm 0.01 \mu\text{m}$), and fresh feces samples observed in phase contrast after concentrated by the sugar Centrifuge-floatation method (DP = $6.22 \pm 0.56 \mu\text{m}$; DE = $6.39 \pm 0.56 \mu\text{m}$).

KEY WORDS: Oocysts, *Cryptosporidium*, staining methods, swine.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, B. C. (1982). Cryptosporidiosis in Idaho lambs: natural and experimental infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 181: 151-153.
- ANDERSON, B. C. (1984). Location of cryptosporidia: review of the literature and experimental infections in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 1474-1477.
- ANDERSON, B. C. & BULGING, M. S. (1981). Enteritis caused by *Cryptosporidium* in calves. *Vet. Med. Small. Anim. Clin.*, 76: 865-868.

- ANGUS, K. W. (1983). Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review. *J. R. Soc. Med.*, 76: 62-70.
- ANGUS, K. W.; CAMPBELL, I.; GRAY, E. W. & SHERWOOD, D. (1981). Staining of faecal yeasts and *Cryptosporidium* oocysts. *Vet. Rec.*, 108: 173.
- BAXBY, D.; BUUNDELL, N. & HART, C. A. (1984). The development and performance of a simple sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *J. Hyg.*, 93: 317-323.
- BOMFIM, T. C. B. do (1989). *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em suínos: identificação, diagnóstico e alguns aspectos epidemiológicos. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí-RJ. 113 p.
- CURREN, W. L.; UPTON, S. J. & HAYNES, T. B. (1986). The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in fecing chickens. *J. Protozool.*, 33: 289-196.
- FAYER, R. & UNGAR, B. L. P. (1986). *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiol. Reviews*, 50: 458-483.
- FIGUEIREDO, P. C.; SERRA FREIRE, N. M. & GRISI, L. (1984). Eimerias de bovinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro: Técnica de diagnóstico e espécies identificadas. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 24: 3-10.
- GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D. A.; BREWER, T. C. & SHIMIZY, R. Y. (1983). Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 18: 185-190.
- GONZÁLEZ, M. C.; GOMES, E. S. & ALUJA, A. S. (1983). Cryptosporidiosis en bovinos lactantes (histopatologia, microscopia eletrônica de transmissão y de barrido). *Vet. Mexico*, 14: 12-22.
- HENRICKSEN, S. A. & POHLENZ, J. F. L. (1981). Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta. Vet. Scand.*, 22: 594-596.
- LEVINE, N.D. (1984). Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *J. Protozool.*, 31: 94-98.
- MARTÍNEZ VILLALOBOS, A. N. & ALUJA, A. S. (1986). Evaluación de dos métodos de tinción de frotis fecales para el diagnóstico de la cryptosporidiosis em becerros. *Vet. Mex.*, 17: 303-307.
- POHJOI, A. S. (1984). Survey of Cryptosporidiosis in faeces of normal healthy dogs. *Nordisk. Vet. Med.*, 36: 189-190.
- TYZZER, E. E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 5: 12-13.
- TYZZER, E. E. (1912). *Cryptosporidium parvum*, a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenked.*, 26: 394-412.
- TZIPORI, S. (1981). The etiology and diagnosis of calf diarrhea. *Vet. Rec.*, 108: 510-514.
- UPTON, S. J. & CURREN, W. L. (1985). The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J. Parasitol.*, 71: 625-629.
- WILLSON, P.J. & ACRES, S. D. (1982). A comparison of dichromate solution flotation and fecal smears for diagnosis of cryptosporidiosis in calves. *Can. Vet. J.*, 23: 240-246.

(Received 27 December 1993, Accepted 17 February 1994).