

## COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE SEDIMENTAÇÃO PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* SPP. EM FEZES DE CÃES E GATOS

ANDRIOS DA SILVA MOREIRA<sup>1</sup>; CRISTIANE TELLES BAPTISTA<sup>2</sup>; BRUNA BACCEGA<sup>3</sup>; CAROLINA LITCHINA BRASIL<sup>4</sup>; JULIA DE SOUZA SILVEIRA VALENTE<sup>5</sup>; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – andriossilvamoreira@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – pequenatellesbaptista@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – brubaccega@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – carolinallitchinabrasil@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – juliassilveira@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Cryptosporidium* spp. é um parasito intracelular obrigatório, zoonótico, estando presente no homem, animais domésticos e selvagens (XIAO & FENG, 2008). Este protozoário tem capacidade de infectar as células epiteliais da mucosa intestinal de hospedeiros vertebrados, podendo determinar diarreias autolimitantes ou crônicas e, em hospedeiros imunocomprometidos, oferece risco de vida (CURRENT; GARCIA, 1991).

São descritas inúmeras técnicas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes humanas e de animais. Entretanto, inexistente um método universalmente aceito pelos pesquisadores para esta finalidade (CARVALHO, 2009).

Entre os mais utilizados, está o de sedimentação. Desde a primeira descrição da técnica, houveram várias modificações afim de aprimorar o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. Dessa forma, a utilização dos solventes a base de formalina-éter foi substituída pelo acetato de etila, pois o éter causava alterações na morfologia dos oocistos, dificultando a visualização em testes de coloração como o Ziehl-Neelsen (RITCHIE, L. S., 1948; YOUNG, K. H., 1979; CLAVEL *et. al.*, 1996).

Tendo em vista as dificuldades na identificação dos oocistos pelas mais variadas técnicas, estudos visando a melhoria e otimização dessas mesmas técnicas são descritos. Neste sentido, a auramina fenicada foi empregada como método de coloração por fluorescência e tem demonstrado resultados satisfatórios. Além disso, é uma técnica rápida comparada a outros métodos de coloração convencional (HÄNSCHEID; VALADAS, 2009).

O objetivo deste trabalho foi comparar dois diferentes métodos de sedimentação para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de cães e gatos.

### 2. METODOLOGIA

Amostras de fezes de cães (n=85) e gatos (n=5) foram coletadas de clínicas particulares na cidade de Pelotas e da zona rural dos municípios de Aceguá, Hulha Negra, Candiota e Piratini. Também foram coletadas fezes dos animais internados no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

Foi utilizado 2 gramas de cada amostra, diluídas em 10ml de água destilada, fracionadas em dois tubos e centrifugadas a 3.000 rpm/3 minutos. O sobrenadante foi desprezado, sendo utilizado somente o sedimento.

Posteriormente, um tubo foi centrifugado seguindo a técnica descrita por Ritchie (1948), usando éter como solvente e o segundo pela técnica de Ritchie modificada por Young (1979) usando acetato de etila. Para cada tubo foi confeccionada uma lâmina, e logo após foram coradas com auramina fenicada. As lâminas foram analisadas em microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse E400 - excitation filter: 450-490nm, dichroic mirror: 505nm, barrier filter: 520nm) em objetiva de 100x e 400x.

Para análise estatística foi usado o teste de Fisher (Fisher's exact test – Graphpad software) e odds ratio (Medcalc).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 30 amostras positivas (29 cães e 1 gato) para oocistos de *Cryptosporidium* spp., 90% (27/30) foram observadas em lâminas quando empregado o acetato de etila e 70% (21/30) em lâminas confeccionadas com formalina-éter (Tabela 1). Na análise estatística não houve diferença ( $P < 0,05$ ) na detecção dos oocistos. No entanto, observou-se que a chance de obter detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em lâminas confeccionadas com acetato de etila foi três vezes maior do que quando empregado éter como solvente no processo de sedimentação (odds ratio=3,8571). Os resultados obtidos no presente estudo são similares aos relatados por Clavel et. al. (1996) que obtiveram 99% de positividade com acetato de etila frente à 86% com éter empregando a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen em amostras de fezes humanas. Outro trabalho com resultados similares foi realizado por Young et. al. (1979), que comparou acetato de etila e éter para sedimentação e também evidenciou maior eficácia do acetato de acetila, apesar de não utilizar métodos de coloração após a sedimentação, e do enfoque não ser oocistos de *Cryptosporidium*, mas sim cistos de outros protozoários e ovos de helmintos.

Tabela 1: Técnica de sedimentação empregando dois diferentes tipos de solventes em fezes positivas de cães e gatos para *Cryptosporidium* spp.

| Técnica de sedimentação | Lâminas positivas | Lâminas negativas | Percentual de positividade (%) | OR    | P     |
|-------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|-------|-------|
| Éter/formalina          | 21                | 9                 | 70                             | 3,857 | 0,052 |
| Acetato de etila        | 27                | 3                 | 90                             |       |       |

OR - razão de chances; P - nível de significância (Fisher's exact test).

### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que, ao comparar dois diferentes métodos de sedimentação, as duas técnicas apresentaram resultados satisfatórios. Entretanto, pode-se observar que, a técnica utilizando o acetato de etila como solvente no processo de sedimentação para coloração com auramina fenicada foi capaz de detectar maior percentual de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de fezes analisadas.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, T. T. R. Estado Atual do Conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. In: **Revista de Patologia Tropical**. Volume 38. p. 1-16. 2009.

CLAVEL, A. et. al. Comparison of 2 Centrifugation Procedures in the Formalin-Ethyl Acetate Stool Concentration Technique for the Detection of *Cryptosporidium* Oocysts. In: **International Journal for Parasitology**. Vol. 26, n. 6. p. 671-672. 1996.

CURRENT, W. L; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. In: **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 4, n. 3. 325-358. 1991.

HÄNSCHEID, T; VALADAS, E. Diagnosis of cryptosporidiosis using PCR or auramine O with LED fluorescent microscopy: which end of the stick? In: **Acta Tropica**. Vol 109, n. 3. p. 247-248. 2009.

LINDSAY, D. S; ZAJAC, A. M. *Cryptosporidium* infections in cats and dogs. In: **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian-North American Edition**. v. 26, n. 11. p. 864-876. 2004.

RITCHIE, L. S. An Ether Sedimentation Technique for Routine Stool Examinations. In: **Bulletin of the U.S. Army Medicine Department**. Vol. 8, n. 4. p 326. 1948.

XIAO, L; FENG, Y. Zoonotic Cryptosporidiosis. In: **Imunology & Medical Microbiology**. Vol. 52, n. 3. p. 309-323. 2008.

YOUNG et. al. Ethyl Acetate as a Substitute for Diethyl Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Technique. In: **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 10, n. 6. p. 852-853. 1979.