UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA A DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. EM BOVINOS

Sandra Valéria Inácio
Bióloga

ARAÇATUBA – SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA A DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. EM BOVINOS

Sandra Valéria Inácio

Orientadora: Profª. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani

Co-orientador: Prof. Dr. Jancarlo Ferreira Gomes

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2016

Catalogação na Publicação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA / UNESP

Inácio, Sandra Valéria
I35v Validação diagnostica para a detecção de Cryptosporidium ssp em bovinos / Sandra Valéria Inácio. – Araçatuba, 2016.
XX f. : il.; tab. + 1 CD-ROM.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária.
Orientadora: Profa. Katia Denise Saraiva Bresciani
Coorientador: Prof. Jancarlo Ferreira Gomes

1. Parasitos. 2. Coccidioides. 3. Diagnóstico. I. T.

CDD 636.20896

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Validação diagnóstica para a detecção de *Cryptosporidium* spp. em bovinos

AUTORA: SANDRA VALÉRIA INÁCIO

ORIENTADORA: Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.

Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS

Dra. VALÉRIA MARIA SAVOYA DA SILVA

Dra. MÔNICA REGINA VENDRAME AMARANTE

Dra. SILVIA HELENA VENTUROLI PERRI

Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

DATA DA REALIZAÇÃO: 20 de janeiro de 2016.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SANDRA VALÉRIA INÁCIO – Araçatuba – SP, 22 de outubro de 1977. Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista de Araçatuba, no ano de 2008. Mestre pelo curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Universidade Estadual Paulista - UNESP (2012), campus de Araçatuba – SP, sob orientação da Professora Adjunta Katia Denise Saraiva Bresciani. Gestora Ambiental pela Universidade Paulista – UNIP – campus de Araçatuba – SP. Leciona na escola estadual de Araçatuba como professora eventual, com sede na E. E. Dr. Clóvis de Arruda Campos.

"Os sonhos que nos inspiram a criar, nos animam a superar, nos encorajam a conquistar. Assim como os noturnos, os sonhos diurnos não são produzidos apenas pela motivação lógica e consciente do "eu", mas também por fenômenos inconscientes que geram uma usina de emoções e uma fonte de pensamentos."

Augusto Cury

Primeiramente a Deus, base de tudo em minha vida, a minha amada e querida mãe Rosa que sempre me incentivou, ao meu pai Sebastião e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me coloca em seus braços, sempre nos momentos difíceis, e me concede força pra continuar na caminhada da vida;

Aos meus pais, que me deram a vida e me ensinaram que a vida é passageira e que temos que passar por ela deixando marcas de felicidade e alegrias, sabendo respeitar e amar o próximo e nos apresentarmos sempre com humildade;

À orientadora, amiga e Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani, pela paciência, amizade, orientação, confiança e por acreditar no meu potencial;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter concedido bolsa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela UNESP, campus de Araçatuba – SP, pela oportunidade em conquistar este sonho, título de “Doutora em Ciência Animal”, com muito orgulho de ser aluna desta instituição;

Ao Dr. Jancarlo Ferreira Gomes, pela co-orientação, ajuda com materiais, atenção, ensinamentos e por disponibilizar seu tempo para realização dessa pesquisa;

Ao Prof. Titular Alexandre Xavier Falcão por disponibilizar a ideia principal de seu projeto;

Aos meus amigos que acompanharam essa trajetória sempre me incentivando e acreditando em mim;

À todos os colaboradores que trabalharam arduamente para que este trabalho pudesse ser realizado;

Aos amigos Bruno, Gilmara, Rafaela, Pamella, Danilla, Alex, Luis Gustavo e Vinícius, Bianca e Celso pela grande ajuda com as colheitas e processamento do material;

A todos os proprietários e funcionários que abriram a porta de sua propriedade e gastaram um pouco do seu tempo;

Agradeço imensamente a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente na minha formação pessoal e acadêmica, minha gratidão eterna.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 12

REFERÊNCIAS..... 17

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UMA NOVA TÉCNICA PARASITOLÓGICA PARA A ANÁLISE DO PROTOZOÁRIO *Cryptosporidium* spp...... 23

1. INTRODUÇÃO..... 25

2. MATERIAL E MÉTODOS 26

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 30

4. RESULTADOS 30

5. DISCUSSÃO..... 33

6. CONCLUSÃO 35

AGRADECIMENTO 35

REFERÊNCIAS..... 36

APÊNDICE.....37

VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA A DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. EM BOVINOS

RESUMO - A criptosporidiose, tanto humana como animal, tem distribuição cosmopolita. Esse parasito ocasiona diarreia em bezerros, retardo no crescimento, mortalidade e consequentes perdas econômicas. Nós realizamos a viabilização, desenvolvimento, avaliação e validação intralaboratorial de uma nova técnica parasitológica para a análise em microscopia óptica de oocistos de *Cryptosporidium* spp., denominada de *TF-Test Coccidia*, em amostras fecais de bezerros do município de Araçatuba, São Paulo. Para o desenvolvimento deste estudo e confirmação da nova técnica diagnóstica *TF-Test Coccidia* foram empregadas duas metodologias: centrífugo-sedimentação seguida da coloração negativa de verde malaquita (*CSN-Malaquita*) e *Nested-PCR*. Amostras positivas e negativas de bezerros foram utilizadas para a confecção e validação do *TF-Test Coccidia.* Portanto, podemos concluir a eficácia da técnica parasitológica de *TF-Test Coccidia*, na detecção de oocistos do parasito *Cryptosporidium* spp. e observamos boa concentração e morfologia das estruturas de eliminação do mencionado parasito, com baixa quantidade de impureza em esfregaço fecal.

Palavras-chave: parasitos, coccidioides, diagnóstico

DIAGNOSTIC VALIDATION FOR DETECTION OF *Cryptosporidium* spp. IN CATTLE

SUMMARY – Cryptosporidiosis, both human and animal, has a worldwide distribution. This parasite causes diarrhea in calves, growth retardation, mortality and consequent economic losses. We performed the feasibility, development, evaluation and within-laboratory validation of a new parasitological technique by optical microscopy analysis of *Cryptosporidium* spp., Called *TF-Test Coccidia* in fecal samples of calves in the city of Araçatuba, São Paulo. To develop this study and confirmation of the new diagnostic technique *TF-Test Coccidia* were employed two methodologies: the centrifugal sedimentation followed by negative staining of malachite green *(CSN-Malachite)* and *nested PCR*. Positive and negative samples from calves were used for the preparation and validation of *TF-Test Coccidia*. Therefore, we conclude the effectiveness of parasitological technique *TF-Test Coccidia*, on the oocysts detection of the parasite *Cryptosporidium* spp. and observe good concentration and morphology of eliminated parasitic structures mentioned, with low amount of impurity in fecal smear.

Keywords: parasites, coccidioides, diagnostic

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os protozoários e helmintos são considerados como um extenso grupo representativo de parasitos intestinais em humanos (HARHAY et al., 2010). As doenças infecciosas e parasitárias estão entre as principais causas de óbito no mundo com cerca de dois a três milhões de mortes anualmente (VASCONCELOS et al., 2011).

O Brasil, um país tropical e em desenvolvimento, o apresenta condições favoráveis para os parasitos do trato intestinal, que representa um dos principais problemas de saúde pública há mais de um século (BARRETO et al., 2010; MUNIZ-JUNQUEIRA; QUEIROZ, 2002). A presença deste parasito no organismo implica em grande dano ao individuo, como lesões na mucosa intestinal, diarreia e má absorção dos nutrientes (AJJAMPUR et al., 2011; ARONSON, 2011).

Grande parte das complicações geradas pela ocorrência de parasitos poderiam ser sanadas com a utilização dos médotos coproparasitológicos, se esses não fossem negligenciados. Assim, é de fundamental importância que o exame diagnóstico seja realizado (SANTOS et al., 2006).

Os ovos e larvas de helmintos e trofozoitos, cistos, oocistos e esporos de protozoários são frequentemente diagnosticados por meio de exames de fezes, com o uso de técnicas convencionais ou kits comerciais, apresentando vários métodos de concentração com eliminação dos detritos fecais (GOMES et al., 2004, 2008).

Para a melhora do diagnóstico destas enfermidades a Universidade de Campinas (Unicamp) e a Universidade de São Paulo (Usp) juntamente com a Immunoassay®, empresa de material hospitalar e laboratorial, confeccionaram em 2004 uma nova tecnologia para a identificação de parasitoses intestinais no homem, chamado de *TF-Test*® (*Three Fecal Test*, sigla em inglês) que vem sendo distribuído em vários hospitais e laboratórios de análises clínicas, entre os quais o Hospital Albert Einstein, o Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP) e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (FAPESP, 2008a; GOMES et al., 2008).

Este projeto contou com o apoio da Fapesp pelo programa Pesquisa Inovativa na Pequena e Micro-Empresa (Pipe), sendo articulado pela Agência de Inovação Inova Unicamp (FAPESP, 2008a).

Este teste, além de ser prático e rápido tem mostrado alta eficiência no diagnóstico das enteroparasitoses, principalmente devido a colheita de amostras

fecais em três dias alternados, que são processadas de uma única vez, aumentando, assim, a concentração de parasitos e melhorando a eliminação de detritos fecais por meio da centrífugo sedimentação (GOMES et al., 2004).

O *TF-Test®* é composto por um kit-usuário e um kit para laboratório, possuindo alta sensibilidade diagnóstica (FAPESP, 2008b). Sendo o primeiro a ser fabricado e utilizado, também conhecido como *TF-Test Conventional.* Com o passar dos anos, houve a necessidade de aprimoramento desta técnica, e em 2010, a UNICAMP, validou uma nova técnica, chamada de *TF-Test Modified* (CARVALHO et al., 2015). Esta nova técnica tem como característica centrífugo-sedimentação, flutuação espontânea e sedimentação espontânea (CARVALHO et al., 2015).

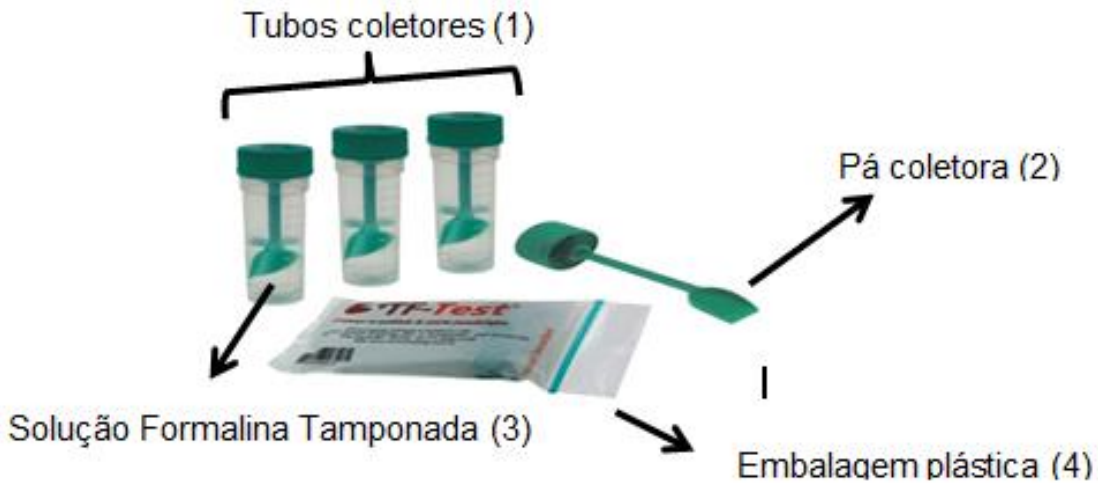
Estudos já foram realizados em amostras fecais de humanos pelo *TF-Test Conventional* (GOMES et al., 2004; CARVALHO et al., 2012) e com o *TF-Test Modified* (CARVALHO et al., 2015), como também na medicina veterinária em ovinos (LUMINA et al., 2006) e caninos (COELHO et al., 2013, 2015).

TÉCNICA *TF-TEST MODIFIED*

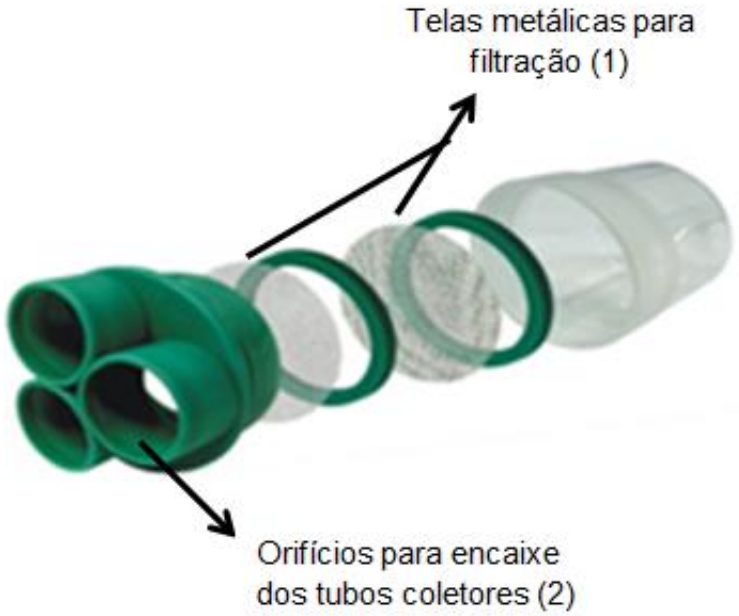
A inovadora técnica parasitológica de *TF-Test Modified* é constituída por um kit que apresenta três tubos coletores-usuário, apresentando conservante de solução de formalina tamponada [Fig. 1: (A)], um tubo de centrifugação [Fig. 1: (B)] e um conjunto de filtros contendo duas telas metálicas [Fig. 1: (B)], denominados, quando unificados, de Conjunto Processador *TF-Test.* Cada tubo coletor-usuário contém, acoplado a sua tampa, [Fig. 1: (A)] uma colher, ou pá coletora [Fig. 1: (A)] para acomodar cerca de 1,8 gramas de fezes.

Externamente, o tubo coletor-usuário possui graduações que vão de 1 a 10 mL. O tubo de centrifugação é acoplado a uma peça intermediária, denominada conjunto de filtros [Fig. 1: (B)], que apresenta três orifícios na extremidade oposta, aos quais são introduzidos os tubos coletores-usuário no processamento laboratorial de centrifugação. O Conjunto Processador é centrifugado a uma rotação de 1.500 rpm (500 g - a depender da dimensão do rotor da centrífuga), por dois minutos, utilizando caçapas universais de 100 mL. Encaixadas internamente ao conjunto de filtros existem duas telas metálicas para filtração, as quais apresentam orifícios com 400 e 200 micrometros [Fig. 1: (B)]. O protocolo operacional desta técnica encontra-

se disponível no site do Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI (www.inpi.gov.br), sob a concessão de patente PI-0104372-2.



(A)



(B)

Figura 1- (A). Tubos coletores (1) envasados com solução de formalina tamponada (2), pá coletora (3) e embalagem plástica (4) *TF-Test* (*Kit* paciente); **(B).** Conjunto de filtros (1), telas metálicas para filtração (2).

***Cryptosporidium* spp.**

Em 1907, Tyzzer descreveu pela primeira vez o gênero *Cryptosporidium*, em camundongos. Este protozoário foi registrado posteriormente em uma criança de três anos de idade, com enterocolite aguda, e a seguir em um homem de 39 anos, imunodeprimido e com sintomas intestinais intensos (JIRKŮ et al., 2008; MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976).

Mais recentemente, o parasito *Cryptosporidium* spp. foi incluído na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (em inglês, World Health Organization Neglected Diseases Initiative) pela relação com a população de baixa renda, as precárias condições de saneamento básico e a qualidade da água consumida (SAVIOLI et al., 2006).

Quanto à classificação sistemática, este coccídio da luz intestinal, infecta vários hospedeiros, desde mamíferos até peixes, répteis e aves, e foi classificado como pertencente ao Filo Apicomplexa, por meio de estudos moleculares com utilização do gene 18S do RNA (ácido desoxirribonucleico). Vale ressaltar que o gênero *Cryptosporidium* spp. já foi considerado filogeneticamente mais próximo da subclasse Gregarinia (CARRENO et al., 1999).

Atualmente são reconhecidas 27 espécies de *Cryptosporidium* (RYAN et al., 2014, 2015). Destas, 10 causam infecções em humanos; no entanto, 61 genótipos foram relatados de acordo com a caracterização genética e espécie hospedeira (FAYER, 2010; PLUTZER; KARANIS, 2009; ROBINSON et al., 2010). Aproximadamente 20 espécies têm sido descritas em humanos (RYAN et al., 2014; XIAO, 2010).

Os oocistos (estruturas de eliminação) de *Cryptosporidium* spp. são altamente resistente aos desinfetantes comuns e ao cloro utilizado para tratamento de água, assim, eles podem sobreviver por um longo período no meio ambiente (XIAO; RYAN, 2004).

Com relação à condição imunitária, em animais imunocompetentes, a infecção assume caráter autolimitante e a detecção deste parasito é mais frequente em animais jovens. Em adultos, o estresse pode induzir queda na resistência, acarretando no hospedeiro a infecção subclínica crônica (THOMPSON et al., 2008). A gravidade e a duração da infecção dependem exclusivamente do sistema imunitário do hospedeiro, seja humano ou animal. Em indivíduos imunocompetentes

a doença pode ser leve, moderada ou grave, já em imunodeficientes pode ser crônica e até fatal (FAYER, 2008).

A transmissão antroponótica e zoonótica da criptosporidiose ocorre pela rota fecal-oral, onde as fezes representam a via de eliminação do agente e a boca do hospedeiro sua porta de entrada. Os oocistos de *Cryptosporidium* podem ser encontrados frequentemente na água e em alimentos (THOMPSON et al., 2008).

A constatação deste protozoário em vegetais crus ou pobremente cozidos, frutos do mar, como ostras e mariscos, leite não pasteurizado, cidra e água mineral tem sido relatada em vários países, podendo ocorrer a contaminação dos alimentos durante sua produção, colheita, transporte e processamento (SMITH; NICHOLS, 2010).

Uma infecção maciça em humanos por *Cryptosporidium* ocorreu na cidade de Milwaukee em 1993, onde os oocistos foram disseminados pela rede de abastecimento público, provocou diarreia aquosa em 403.000 indivíduos (MAC KENZIE et al., 1994). Historicamente, surtos de criptosporidiose por veiculação hídrica foram associados, em grande parte, ao acesso de seres humanos a reservatórios de água como piscinas, lagos de recreação e parques aquáticos (SMITH; NICHOLS, 2010).

Cryptosporidium spp. ocasiona diarreia em bezerros (VARGAS JÚNIOR et al., 2014), com retardo no crescimento, mortalidade e consequentes perdas econômicas (OLSON et al., 2004; SANTÍN et al., 2008). As espécies mais comumente encontradas em bovinos são *C. parvum*, *C. bovis, Cryptosporidium ryanae* e *C. andersoni* (FAYER, 2008; FENG et al., 2007; SANTIN et al., 2008; XIAO, 2010). *C. parvum* é considerado o agente causador de diarreia neonatal em ruminantes (O'HANDLEY; OLSON, 2006), e da infecção humana (XIAO; FENG, 2008), sendo importantes agentes zoonóticos (KHAN et al., 2010).

As manifestações clínicas também podem variar conforme a idade e o estado nutricional do hospedeiro (CURRENT; GARCIA, 1991; WARREN; GUERRANT, 2008). Como exemplo, hospedeiros imunocompetentes podem apresentar quadros inconstantes, tais como: de assintomáticos até diarreia aguda ou persistente; fadiga; náusea; anorexia; vômito; dor abdominal; e perda de peso (WARREN; GUERRANT, 2008).

Atualmente são utilizados os seguintes métodos para detectar *Cryptosporidium* spp.: microscopia de esfregaços fecais Ziehl- Neelsen modificado

(HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), Kinyoun (LENNETTE et al., 1985), verde malaquita (ELLIOT et al., 1999), detecção de antígenos (Imunofluorescência, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [ELISA]) ou detecção do genoma por meio da técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); variando na sensibilidade e especificidade (AREESHI et al., 2007). Os exames de esfregaços fecais e a detecção de antígenos não discriminam a espécie envolvida (THOMAS; CHALMERS, 2003). Apenas a PCR seguida de sequenciamento poderá distinguir a espécie. Ferramentas moleculares geralmente têm sido utilizadas na identificação de isolados de *Cryptosporidium* de humanos e animais (XIAO, 2010; XIAO; RYAN, 2004).

OBJETIVO

Realizar a viabilização, desenvolvimento, avaliação e validação intralaboratorial de uma nova técnica parasitológica para a análise em microscopia óptica de oocistos de *Cryptosporidium* spp., denominada de *TF-Test Coccidia*, em amostras fecais de bezerros do município de Araçatuba, São Paulo.

REFERÊNCIAS

AJJAMPUR, S.S. et al. Effect of cryptosporidial and giardial diarrhoea on social maturity, intelligence and physical grow thin children in as emi-urbans lumins outh India. **Ann. Trop. Paediatr.,** v. 31, n. 3, p. 205–212, 2011.

AREESHI, M.; BEECHING, N.; HART, C. Cryptosporidiosis in Saudi Arabia and Neighboring Coutries. **Ann. Saudi. Med.**, v. 27, n. 5, p. 325-332, 2007.

ARONSON, S.M. Poverty, malnutrition and worms**. Med. Health. R. I.,** v. 94, n. 3, p. 59, 2011.

BARRETO, M.L. et al. Impact of a city widesanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites in fection in young children. **Environ. Health Perspect.,** v. 118, n. 11, p.1637–1642, 2010.

CARRENO, R.A.; MARTIM, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribossomal RNA gene sequence. **Parasitol. Res.**, v. 85, n.11, p. 899-904, 1999.

CARVALHO, G.L.X. et al. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitoses. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n.1 p. 80-84, 2012.

CARVALHO, J. B. et al. TF-Test modified: new diagnostic tool for human enteroparasitosis. **J. Clin. Lab. Anal.,** 2015. No prelo.

COELHO, W.M.D. et al. Comparative study of five techniques for the diagnosis of canine gastrointestinal parasites. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 24, n. 2, p. 223-226, 2015.

COELHO, W.M.D. et al. A new laboratorial method for the diagnosis of gastrointestinal parasites in dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2013.

CURRENT, W.L.; GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clin. Microbiol. Rev**., v.4, n. 3, p. 325–358, 1991.

ELLIOT, A.; MORGAN, U.; THOMPSON, R.C. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **J. Gen. Appl. Microbiol.,** v. 45, n. 3, p.139-142, 1999.

FAYER, R. General biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. (Ed.) ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis.** 2. ed. Boca Raton: FL: CRC Press, 2008. p. 1–42.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Exp. Parasitol.**,v.124, n. 1, p. 90–97, 2010.

FENG, Y. et al. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. **Vet. Parasitol.**, v. 144, n. 1/2, p. 1-9, 2007.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP). **Unicamp cria nova tecnologia para exame parasitológico.** 2008a. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/26424/unicamp-cria-nova-tecnologia>. Acesso em: 17 dez. 2015.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP). **Nova tecnologia da Unicamp aprimora exame de laboratório.** 2008b. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/26823/nova-tecnologia-unicamp>. Acesso em: 17 dez. 2015.

GOMES, J.F. et al. Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. **J. Clin. Lab. Anal.** v. 18, n. 2, p.132–138, 2004.

GOMES, J.F.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; FALCÃO, A. X. Recentes avanços tecnológicos no exame parasitológico de amostras de fezes. **Rev. BioFarma**, v. 3, n. 6, p. 44-53, 2008.

HARHAY, M.O.; HORTON, J.; OLLIARO, P.L. Epidemiology and control gastrointestinal parasites in childen. **Expert. Rev. Infect. Ther.**, v. 8, n. 2, p. 219-234, 2010.

HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.L. Staining of Cryptosporidia by a Modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Vet. Scand.**, v. 22, n. 3-4, p. 594-596,1981.

JIRKŮ, M. et al. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitol.**, v. 55,n. 2, p.81–94, 2008.

KHAN, S.M. et al. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. **Vet. Parasitol.** v. 171, n. 1/2, p. 41– 47, 2010.

LENNETTE, E.H. et al. **Manual of clinical microbiology.** 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985. 1149p.

LUMINA, G. et al. Avaliação do kit “TF-Test” para o diagnóstico das infecções por parasitas gastrintestinais em ovinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 43 n. 4, p. 496-501, 2006.

MAC KENZIE, W.R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, n. 3, p.161–167, 1994.

MEISEL, J.L. et al. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology.**, v. 70, n.6, p. 1156–1160, 1976.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; QUEIROZ, E.F. Relationship between protein energy mal nutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasilia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 35, n. 2, p. 133–141, 2002.

NIME, F.A. et al. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, n. 4, p. 592–598, 1976.

O'HANDLEY, R.M., OLSON, M.E. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. **Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.,** v. 22, n. 3, p. 623-643, 2006.

OLSON, M.E. et al. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends. Parasitol.**, v. 20, n. 4, p.185-191, 2004.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. **Vet. Parasitol.,** v. 165, n. 314, p. 187–199, 2009.

ROBINSON, G. et al., Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, n. 13, p.1539–1548, 2010.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology,** v. 141, n. 13, p. 1667–1685, 2014.

RYAN, U. et al. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa:Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). **Exp. Parasitol.,** v. 150, n. 1, p. 31–35, 2015.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Vet. Parasitol.,** v. 155, n. 1/2, p. 15-23, 2008.

SANTOS, M.S. et al. Ocorrência de enteroparasitas em crianças atendidas no programa saúde da família de uma área de abrangência do município de Vespasiano, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Eletr. Enf.,** v.8, n.1, p.25-29, 2006.

SAVIOLI, L.; SMITH H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. **Trends Parasitol**., v.22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Exp. Parasitol.**, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010.

THOMAS, A.L.; CHALMERS, R.M. Investigation of the range of *Cryptosporidium* species detected by commercially available antibody based tests. In: PROCEEDINGS OF THE HEALTH PROTECTION AGENCY INAUGURAL CONFERENCE, Malahide, 2003. **Anais…** Malahide: European Comission, 2003.

THOMPSON, R.C.A.; PALMER, C.S.; O´HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Vet. J**., v.177, n.1, p.18-25, 2008.

TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the commonmouse. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,** v. 5, n. 1, p.12-13, 1907.

VARGAS JÚNIOR, S.F. et al. Surto de criptosporidiose em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul**. Pesq. Vet. Bras.,** v. 34, n. 8, p. 749-752, 2014.

VASCONCELOS, I.A.B. et al. Prevalência de parasitoses intestinais entre crianças de 4-12 anos no Crato, Estado do Ceará: um problema recorrente de saúde pública**. Acta. Sci. Health. Sci.,** v. 33, n. 1., p. 35-41, 2011.

WARREN, C.A.; GUERRANT, R.L. Clinical disease and pathology. In: FAYER, R,; XIAO L, (Ed.) ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p. 235–253.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Exp. Parasitol.**, v. 124, n. 1, p. 80–89, 2010

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. FEMS, **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 3, p. 309-323, 2008.

XIAO, L.; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update inmolecular epidemiology. **Curr. Opin. Infect. Dis.,** v. 17, p. n. 5, p. 483–490, 2004.

CAPÍTULO 2 - VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UMA NOVA TÉCNICA PARASITOLÓGICA PARA A ANÁLISE DO PROTOZOÁRIO *Cryptosporidium* spp.

RESUMO - Devido ao seu importante potencial zoonótico, a criptosporidiose desperta acentuado interesse na comunidade científica, pois, inicialmente era considerada uma enfermidade oportunista e rara. O diagnóstico coproparasitológico do agente causador desta doença, o protozoário *Cryptosporidium* spp., exige a utilização de técnicas específicas de concentração parasitária e de coloração permanente, que por serem trabalhosas e onerosas, apresentam dificuldade em sua execução na rotina laboratorial. Em vista do exposto, nós realizamos a viabilização, desenvolvimento, avaliação e validação intralaboratorial de uma nova técnica parasitológica para a análise em microscopia óptica de oocistos de *Cryptosporidium* spp., denominada de *TF-Test Coccidia*, em amostras fecais de bezerros do Município de Araçatuba, São Paulo. Para a identificação e confirmação do parasito supracitado e a comprovação da eficiência diagnóstica da nova técnica, foram empregadas de maneira comparativa técnicas consagradas pela literatura científica: centrífugo-sedimentação seguida da coloração negativa de verde malaquita (*CSN-Malaquita*) e *Nested-PCR*. Nós observamos boa eficácia da técnica de *TF-Test Coccidia*, se equiparando estatisticamente a de *CSN-Malaquita* e superando em dez casos (P<0,0001) a de *Nested-PCR*. Assim, constatamos a eficácia da técnica parasitológica de *TF-Test Coccidia*, na detecção de oocistos do parasito *Cryptosporidium* spp. e observamos boa concentração e morfologia das estruturas de eliminação do mencionado parasito, com baixa quantidade de impureza em esfregaço fecal.

Palavras-chaves: parasitos, coccidioides, diagnóstico

VALIDATION OF A NEW TECHNICAL INTERLABORATORY PARASITOLOGICAL ANALYSIS FOR THE PROTOZOAN *Cryptosporidium* spp.

SUMMARY - Due to its important zoonotic potential, cryptosporidiosis arouses strong interest in the scientific community because it was initially considered a rare and opportunistic disease . The parasitological diagnosis of the causative agent of this disease, the protozoan *Cryptosporidium* spp., requires the use of specific techniques of parasite concentration and permanent staining, which are laborious and costly, have difficulty in their implementation in routine laboratory. In view of the above, we realize the feasibility, development, evaluation and within-laboratory validation of a new parasitological technique for analysis in optical microscopy *Cryptosporidium* spp., Called *TF-Test Coccidia* in fecal samples from calves of the City of Araçatuba , Sao Paulo. For the identification and confirmation of the aforementioned parasite and proof of diagnostic efficiency of the new technique were used in a comparative way honored techniques in the scientific literature: centrifugal sedimentation followed by negative staining of malachite green (*CSN-Malachite*) and *Nested-PCR*. We observed good effectiveness of *TF-Test Coccidia* technique, statistically equating the *CSN-Malachite* and surpassing in ten cases (P <0.0001) of the *Nested-PCR*. Thus, we verified the effectiveness of the technique parasitological *TF-Test Coccidia* oocysts in the detection of the parasite *Cryptosporidium*. and observe good concentration and morphology of eliminated structures from the mentioned parasite, with low amount of impurity in fecal smear.

Palavras-chaves: parasites, coccidioides, diagnostic

1 INTRODUÇÃO

Importante patógeno zoonótico, *Cryptosporidium* spp. infecta mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (FAYER, 2010; XIAO, 2010). Este parasito ocasiona diarreia em bezerros (VARGAS JÚNIOR et al., 2014), com retardo no crescimento, mortalidade e consequentes perdas econômicas (OLSON et al., 2004; SANTÍN et al., 2008), sendo que em bovinos as espécies mais frequentes são *Cryptosporidium parvum* (SANTIN et al., 2008), *Cryptosporidium ryanae* (FAYER et al., 2008), *Cryptosporidium andersoni* (XIAO, 2010) e *Cryptosporidium bovis* (FENG et al., 2007; RIEUX et al., 2013).

O diagnóstico laboratorial dos oocistos de *Cryptosporidium* pode ser realizado em fezes por meio de técnicas de concentração parasitária seguido do emprego de colorações específicas e permanentes de Ziehl-Neelsen (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), Kinyoun (LENNETTE et al., 1985), Verde malaquita (ELLIOT et al., 1999), Safranina (GARCIA, 2007, 2009) e Tricrômico (GARCIA, 2007, 2009). Outras técnicas podem ser ainda utilizadas para esta finalidade diagnóstica, como exemplo: Microscopia eletrônica por contraste de fase (TEIXEIRA et al., 2011); Teste de anticorpo fluorescente direto (CDC, 2016) e, Teste imunoenzimático (CDC, 2016).

Atualmente, o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* spp. exige em laboratório a utilização de técnicas específicas de concentração e de coloração permanente, que por serem específicas, trabalhosas e onerosas, apresentam dificuldade em sua execução na rotina de um laboratório de análises clínicas (CARVALHO et al., 2012, 2015, GARCIA, 2007; GOMES et al., 2004).

Uma técnica denominada de *TF-Test* (*Three Fecal Test*), cuja foi precursora para a efetivação do atual estudo, vem sendo utilizada com praticidade por anos para o diagnóstico parasitológico fecal em humanos, apresentando ótimos resultados (CARVALHO et al, 2012, 2015; GOMES et al., 2004). Mais recentemente, esta mesma técnica foi estendida para a pesquisa na área animal, mediante estudos conduzidos nas espécies ovina (LUMINA et al., 2006) e canina (COELHO et al., 2013, 2015). Nestes estudos, foram validados novos procedimentos diagnósticos com helmintos e protozoários gastrintestinais, não levando em consideração o gênero *Cryptosporidium*.

Em vista do exposto, e tendo em vista dar prosseguimento com ineditismo a linha de pesquisa da técnica supracitada, nós realizamos a viabilização,

desenvolvimento, avaliação e validação intralaboratorial de uma nova e prática técnica parasitológica para a análise em microscopia óptica de oocistos de *Cryptosporidium* spp., denominada de *TF-Test Coccidia*, em amostras fecais de bezerros do Município de Araçatuba, São Paulo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética Animal da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, com o número de protocolo 2013-00847.

2.1 Colheita e conservação das amostras

Levando em consideração a irregularidade de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (GARCIA, 2007, 2009; CDC, 2016), amostras fecais foram colhidas (coletadas) em três dias alternados, diretamente da ampola retal de cada animal. Este material foi dividido em três alíquotas: a primeira foi acondicionada sob refrigeração para a realização da técnica de concentração parasitária por centrífugo-sedimentação com o uso coloração negativa de verde malaquita, denominada no nosso estudo de *CSN-Malaquita*; a segunda foi mantida nos tubos coletores-usuário do *TF-Test Coccidia*; e, a terceira parte foi mantida congelada a -20°C, até o momento do processamento da Reação em Cadeira da Polimerase-Nested (*Nested-PCR*).

2.2 Processamento das amostras fecais

Para a identificação das estruturas de resistência do parasito e estudo estatístico de avaliação comparativa entre técnicas, além da nova técnica de *TF-Test Coccidia*, foram empregadas duas técnicas consagradas pela literatura científica: *CSN-Malaquita* e *Nested-PCR*.

2.3 Delineamento experimental

2.3.1 Padronização de protocolo da nova técnica:

2.4 Descrição do estudo

Este estudo foi conduzido em uma fazenda de criação de gado de leite do município de Araçatuba, São Paulo, sabiamente identificada com amostras positivas, durante o período de março de 2014.

Para esta etapa, amostras fecais (n=60) foram processadas somente por meio da técnica de *CSN-Malaquita*. Com isto, cinco amostras positivas foram obtidas para oocistos de *Cryptosporidium* spp., que posteriormente foram repartidas em 100 alíquotas para elaboração e padronização do protocolo operacional da técnica do *TF-Test Coccidia.*

Um total de 60 bezerros, 11 machos e 49 fêmeas, da raça Holandesa, com faixa etária entre seis a 480 dias, foram envolvidos no estudo.

2.4.1 Validação de nova técnica:

2.4.2 Descrição do estudo

A pesquisa foi realizada em 10 fazendas de criação de gado de leite do município de Araçatuba, São Paulo, durante o período de março de 2014 a outubro de 2015.

Para esta execução, foi necessária realizar a triagem por meio de técnica de *CSN-Malaquita* para avaliação da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. no conteúdo fecal dos bovinos, após a triagem foi aplicada a nova técnica de diagnóstico *TF-Test Coccidia* e a *Nested-PCR*. Um total de 68 bezerros das raças Holandesa e Girolanda, sendo 15 machos e 53 fêmeas, com idade entre um a 540 dias, foram examinados para avaliação da presença do parasito em questão, com obtenção de 34 amostras verdadeiras positivas e 34 verdadeiras negativas para avaliação intralaboratorial. Estes animais foram classificados conforme sua idade em dois grupos: ≤ 30 dias e ≥ 31 dias.

2.5 Técnica de centrífugo-sedimentação com coloração de verde malaquita modificado (*CSN-Malaquita*)

Para esta realização foi obtido um "*pool*" das três amostras colhidas de cada animal. Este material foi processado em laboratório de acordo com as divulgações em público de Meloni e Thompson (1996), para centrífugo-sedimentação, e Elliot et al.(1999), para o uso da coloração por verde malaquita.

2.6 Nova técnica de *TF-Test Coccidia*

Esta técnica é composta da seguinte forma, a saber:

Em uma estante apropriada acondicionar os três tubos coletores-usuário padrão *TF-Test Coccidia*, adicionando em um dos tubos 25 µL de solvente orgânico surfactante (detergente neutro incolor) e 3 mL do reagente químico acetado de etila pró-análise (Fórmula $C_4H_8O_2$); em seguida, fechar os respectivos tubos com as suas tampas e agitar vigorosamente por 30 segundos com o uso de equipamento tipo *vórtex*; após, retirar as tampas dos tubos e conectá-los a outras duas peças denominadas conjunto de filtros e tubo de centrifugação; estas peças conectadas (unificadas) são chamadas de conjunto processador; posteriormente, centrifugar este conjunto por dois minutos a 500 x *g* (*gravitational force*, em inglês); após esta centrifugação, desacoplar cuidadosamente o tubo de centrifugação do conjunto de filtros e tubos coletores-usuários; a seguir, decantar o líquido sobrenadante do tubo de centrifugação, de modo deixar cerca de 500 µL de sedimento no fundo cônico deste tubo; a este sedimento, adicionar cerca de 250 µL de água tratada e homogeneizar manualmente todo material proporcionando a formação de uma suspensão fecal; resgatar desta suspensão, com auxílio de uma pipeta automática, 150 µL e transferir a um tubo de colheita padrão *TF-Test Coccidia*; em seguida, adicionar sobre este material uma gota de detergente neutro incolor e homogeneizar manualmente toda suspensão; após, adicionar 3 mL de solução neutra de formalina a este material e homogeneizar vigorosamente por um tempo de 30 segundos no equipamento tipo *vórtex*; na sequência, adicionar sobre este material 3 mL do reagente químico acetato de etila e agitar novamente por mais 30 segundos no equipamento tipo *vórtex*; logo após, centrifugar este tubo contendo todo material homogeneizado a 333 x *g* por um minuto; após esta centrifugação, decantar o material sobrenadante com o uso de pipeta, até proporcionar uma pequena alíquota de suspensão na parte inferior demarcada do tubo, e transferir 25 µL deste material

para uma lâmina de microscopia; após, acrescentar sobre a alíquota da lâmina 25 µL da composição corante desenvolvida e padronizada no estudo (25µL de solução de iodo D'Antony modificado para 50µL do corante Tricrômico modificado); por último, fazer um esfregaço fecal deste material e sobrepor uma lamínula para a leitura em microscopia óptica.

2.6.1 Coloração e Microscopia

O protocolo operacional da nova técnica permitiu empregar, mesmo com as amostras fixadas em solução neutra de formalina, uma forma única de preparação de esfregaço fecal com o uso de uma composição formada por coloração temporária mediante a unificação da solução de iodo D'Antony modificado e corante Tricrômico modificado. Este novo corante propiciou a leitura de lâmina de microscopia com ampliações de 60 e 100 vezes a seco em microscópio óptico convencional, sem a necessidade de óleo de imersão.

2.7 Reação de *Nested-PCR* para Amplificação de fragmento da subunidade 18s do Gene do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp.

2.7.1 Extração de DNA fecal

O DNA foi extraído de 68 amostras fecais, em alíquotas de fezes "in natura", e armazenado em -20°C e descongeladas para fazer a extração de DNA utilizando o kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen®), e ao DNA foi eluído em 50µ de AE buffer e estocado a -20 °C. Nested-PCR foi realizada para a amplificação de um fragmento do gene de rRNA 18S (XIAO et al., 2000).

2.7.2 Reação de *Nested-PCR*

A *Nested-PCR* foi realizada para a amplificação de um fragmento do gene 18S de rRNA ribossômico (XIAO et al., 2000). DNA de *Cryptosporidium parvum* foi utilizado como controle positivo e água ultra pura foi incluída como controle negativo, seguida de eletroforese a partir do gel de agarose a 1,5%.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis (sexo, raça e idade) foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher's, para associação.

O Kappa foi utilizado para teste de concordância estatística entre as técnicas mencionadas.

Com o emprego do programa SAS (SAS INSTITUTE, 2015), com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Na avaliação do estudo intralaboratorial por meio da nova técnica de *TF-Test Coccidia,* nós observamos boa nitidez, morfologia e concentração dos oocistos do protozoário *Cryptosporidium* spp. (FIGURA 1, A e B). O mesmo não pôde ser demonstrado em grande parte das lâminas processadas pela técnica de *CSN-Malaquita*, em conformidade com relatos da literatura (COELHO et al., 2015).

Além disso, a nova técnica apresentou limpidez nos esfregaços fecais de suas lâminas, com boa concentração parasitária (FIGURA 1, A) e demonstrou de maneira única a preparação destes esfregaços com o emprego de uma nova coloração temporária. Diferentemente das colorações convencionais, a coloração da nova técnica permitiu realçar os esporozoítas dos oocistos com tonalidade lilás (FIGURA 1, B) e o restante das impurezas fecais na cor verde. Com isto, foi possível fazer a leitura em microscopia mediante lentes objetivas a seco com 60 e 100 vezes de ampliação e sem a necessidade de óleo de imersão.

O ajuste de concentração entre a solução de iodo e tricrômico permitiu esta nova composição corante funcionar com exatidão mesmo em amostras fecais colhidas em solução neutra de formalina, diferentemente das indicações da literatura (GARCIA, 2007, 2009).

Dos 68 bezerros examinados (TABELA 1), observamos positividade diagnóstica em 34 amostras, tanto por meio da técnica de *CSN-Malaquita*, como pelo *TF-Test Coccidia,* havendo total concordância estatística entre estes resultados (Kappa=1,000). No entanto, para *Nested-PCR*, foram detectadas 24 amostras

verdadeiras positivas, com boa concordância (kappa=0,705) (TABELA 2) e 10 amostras falsas negativas. Para as amostras verdadeiras positivas (n=24), foi verificada diferença estatística significativa (P<0,0001) das técnicas parasitológicas de *CSN-Malaquita* e *TF-Test Coccidia* em relação à técnica de *Nested-PCR*.

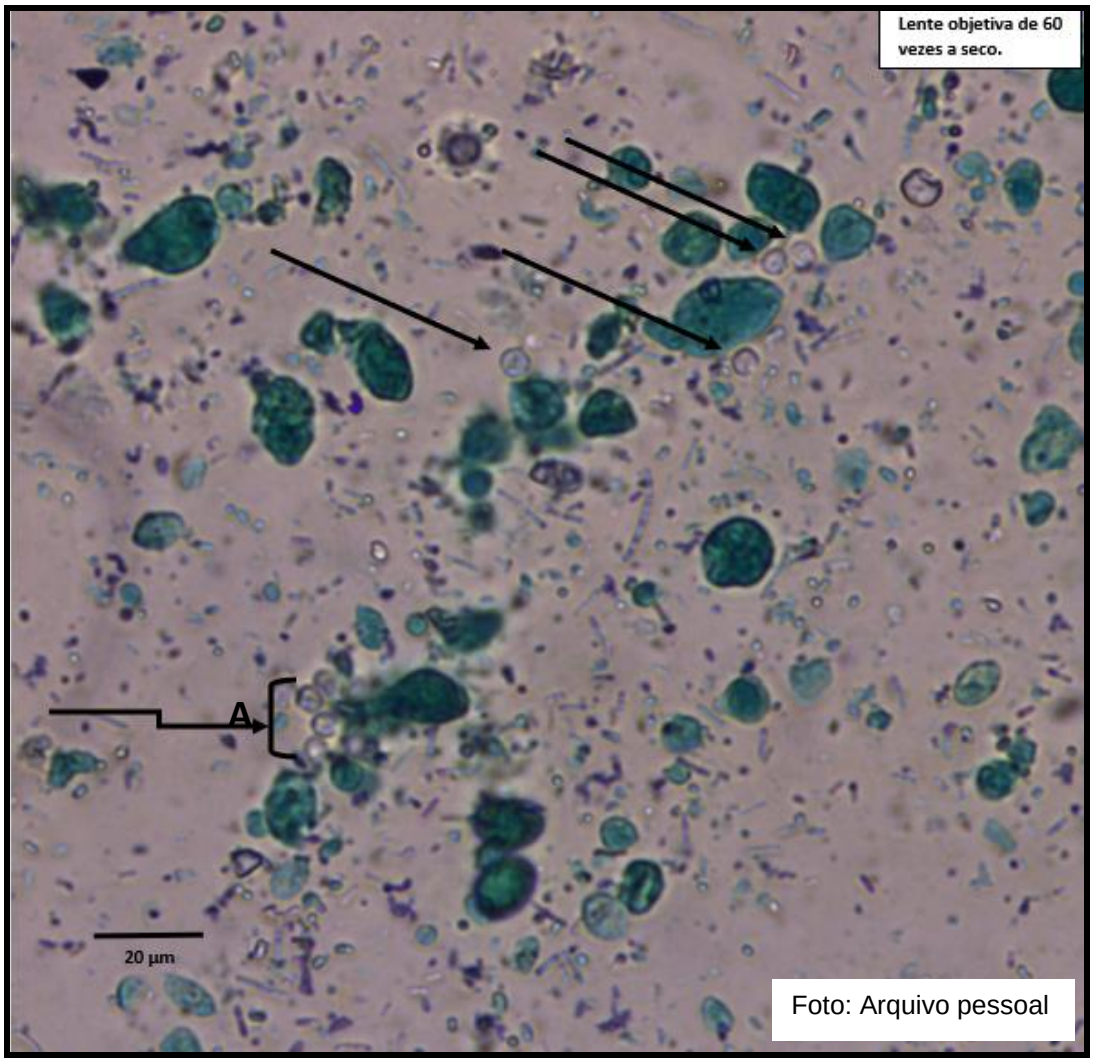
Em relação às amostras verdadeiras negativas (n=34), houve concordância estatística entre as técnicas de *CSN-Malaquita*, *TF-Test Coccidia* e *Nested-PCR*.

Em bezerros mais jovens foi observada maior ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em relação a outra faixas etária (P<0,0001) e quanto às variáveis sexo e raça, não houve diferença significativa no quadro de infecção parasitária (P>0,05).

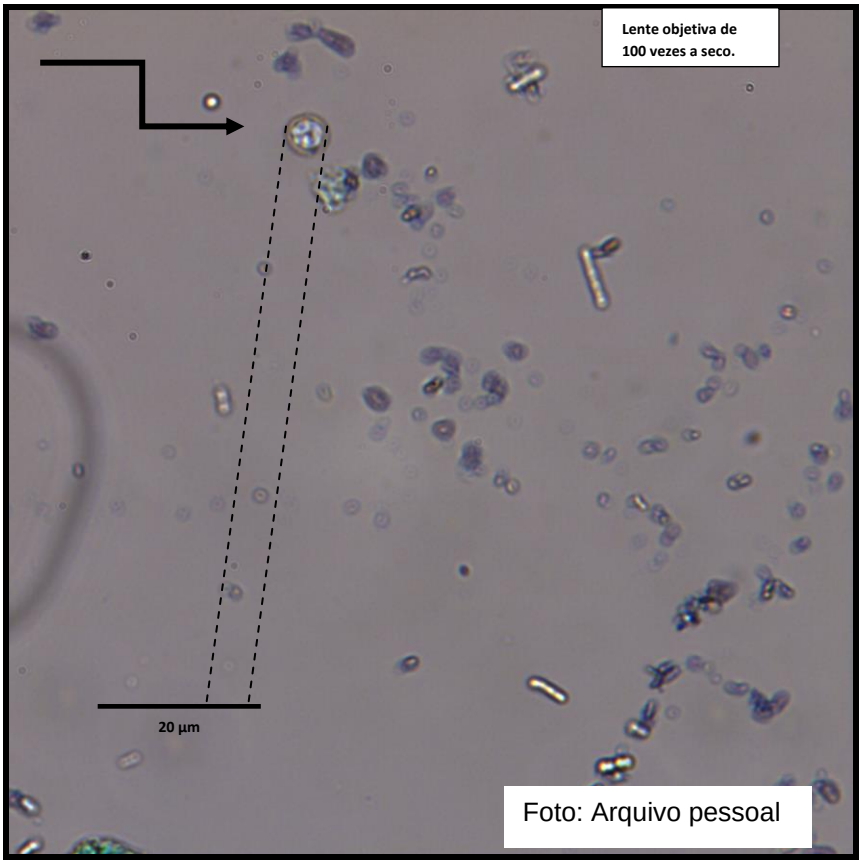
Tabela 1: Ocorrência da infecção por *Crytosporidium* spp. por meio da *Nested-PCR* , *TF-Test Coccidia* e *CSN-Malaquita* nas variáveis, sexo raça e idade.

		Número de amostras positivas			
Variáveis	**Número de amostras**	***TF test***	***CSN-Malaquita***	***PCR***	P^a
RAÇA					
Holandês	49	28	28	22	
Girolanda	19	6	6	2	
SEXO					P>0,05
Fêmea	53	24	24	16	
Macho	15	10	10	8	
IDADE					
≤ 30 dias	32	30	30	22	P<0,0001
≥ 31 dias	36	4	4	2	

P^a = teste χ^2


Lente objetiva de 60 vezes a seco.
A
20 µm
Foto: Arquivo pessoal

(A)



(B)

FIGURA 1: Fotomicrografias representativas de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros, com os empregos de lentes objetivas a seco aprocromáticas de 60 (A) e 100 (B) vezes de ampliação.

Tabela 2: Detecção da infecção por *Crytosporidium* spp. por meio da *Nested-PCR* e índice de concordância entre os métodos *TF-Test Coccidia* e *CSN-Malaquita*

Métodos Diagnósticos	Números de Amostras	Números de positivos (%)	K[a]
TF-Test Coccidia	34	34 (100,0)	
CSN-Malaquita	34	34 (100,0)	0,705
Nested-PCR	34	24 (35,3)	

K[a]= Kappa

5 DISCUSSÃO

Por meio dos dados evidenciados neste estudo, observamos boa eficácia à detecção de oocistos do protozoário *Cryptosporidium* spp. mediante a realização do

protocolo do *TF-Test Coccidia*, o que otimiza o uso desta nova técnica com praticidade em rotina laboratorial.

Para a realização desta pesquisa, demos preferência em colher amostras de bezerros neonatos (FAYER; SANTÍN, 2009; SILVERLÅS et al., 2010), pois, sabidamente estes apresentam maior ocorrência da infecção criptosporídica, o que foi comprovado por meio dos nossos resultados que mostrou diferença significativa em relação a esta faixa etária quando comparada com animais de demais idades.

Como fatores determinantes, a nova técnica mostrou claramente esfregaços fecais com boa concentração parasitária e livres, em grande parte, de impurezas (FIGURA 1, A e B). Muitas lâminas foram capazes de concentrar mais de sete oocistos por campo com ampliação de lente objetiva em 60 vezes (FIGURA 1, A). Isto, por certo, deverá favorecer o encontro de oocistos deste parasito na leitura de microscopia praticada em rotina laboratorial, reduzindo o cansaço e o erro de interpretação diagnóstica praticados por humanos.

O uso da nova composição corante preservou a integridade morfológica dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., corando sempre os esporozoítas na cor lilás (FIGURA 1, B) e quase que a totalidade das impurezas em verde. Esta condição deverá favorecer também a leitura em microscopia, abreviando consideravelmente o erro de interpretação diagnóstica praticado por humanos, que efetivamente está classificado entre falso resultado positivo e falso resultado negativo.

Diferentemente da recomendação da literatura (GARCIA, 2007, 2009), a técnica de *TF-Test Coccidia* propiciou preparações de lâminas com coloração padrão temporária e leitura em microscopia por meio de lentes objetivas a seco. Isto eliminou as limitações proporcionadas por técnicas específicas com emprego de colorações permanentes, como exemplo, as derivadas de fucsina fenicada, que apesar de demonstrarem excelentes desempenhos diagnósticos são pouco operantes em rotinas laboratoriais por serem trabalhosas e onerosas.

Para as técnicas de *CSN-Malaquita* e de *TF-Test Coccidia*, os resultados foram concordantes à presença do protozoário *Cryptosporidium* spp., ou seja, os mesmos animais apresentaram amostras verdadeiras positivas (n=34) e negativas (n=34).

Já pela *Nested-PCR* foram verificados resultados verdadeiros positivos em apenas 24 amostras (n=24). A eficiência de detecção deste teste molecular pode ter sofrido interferência a eventual presença de inibidores no material em questão

(WARD; WANG, 2001), ou a ingestão de vegetais por estes animais hospedeiros (MONTEIRO et al., 2001). Além do mais, outros aspectos inerentes do parasito a infecção, como exemplo, parasitemia e localização parasitária, devem ser também levados em consideração, considerando que podem resultar resultados falsos negativos a *Nested-PCR*, discordantes de outras técnicas (GARCIA, 2007, 2009).

Apesar dos comentários acima, o uso da *Nested-PCR* neste estudo foi de fundamental importância, especialmente por caracterizar com especificidade o gênero de parasito *Cryptosporidium* spp.

TF-Test Coccidia foi considerado uma técnica eficiente e pode ser aplicada na área de Medicina Veterinária para o diagnóstico em fezes de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Os resultados preliminares proporcionados por este estudo permitirão avançar a atual pesquisa para uma outra modalidade de pesquisa: validação interlaboratorial da técnica *TF-Test Coccidia*. Para isto, nos utilizaremos de uma associação inédita para o diagnóstico nas fezes de oocistos de *Cryptosporidium* spp., mais exatamente entre a nova técnica parasitológica e o uso de computador por análise de imagens, que deverá tornar oportuno a validação do diagnóstico automatizado deste parasito intestinal, o que, certamente, deverá repercutir em avanços a esta modalidade de diagnose em rotinas de laboratórios públicos e privados, e bem como também, em programas governamentais.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, constatamos a eficácia da técnica parasitológica de *TF-Test Coccidia*, na detecção de oocistos do parasito *Cryptosporidium* spp. e observamos boa concentração e morfologia das estruturas de eliminação do mencionado parasito, com baixa quantidade de impureza em esfregaço fecal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Agência de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de Bolsa de Doutorado, e a ImmunoCamp Ciência e Tecnologia pelo apoio a pesquisa, por meio de investimentos em recursos humanos e material de consumo.

REFERÊNCIAS

CARVALHO, G.L.X. et al. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitoses. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n.1 p. 80-84, 2012.

CARVALHO, J.B. et al. *TF-Test modified*: new diagnostic tool for human enteroparasitosis**. J. Clin. Lab. Anal.,** 2015. No prelo.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). ***Cryptosporidium*:** diagnosis & detection. 2015. Disponível em: < http://www.cdc.gov/parasites/crypto/diagnosis.html>. Acesso em 8 jan. 2016.

COELHO, W.M.D. et al. A new laboratorial method for the diagnosis of gastrointestinal parasites in dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2013.

COELHO, W.M.D. et al. Comparative study of five techniques for the diagnosis of canine gastrointestinal parasites. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.,** v. 24, n. 2, p. 223-226, 2015.

ELLIOT, A.; MORGAN, U.; THOMPSON, R.C. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **J. Gen. Appl. Microbiol.,** v. 45, n. 3, p.139-142, 1999.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Exp. Parasitol.,** v. 124, n.1, p. 90–97, 2010.

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Vet. Parasitol.,** v. 164, v. 2-4, p.192–200, 2009.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (Bos taurus). **Vet. Parasitol.** v. 156 n. 3-4, p. 191–198, 2008.

FENG, Y. et al. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. **Vet. Parasitol.**, v. 144, n. 1-2, p. 1–9, 2007.

GARCIA, L.C. **Diagnosis medical parasitology.** 5. ed. Washington: A.S.M. Press, 2007.

GARCIA, L.C. **Practical Guide to diagnostic parasitology.** 2. ed. Washington: A.S.M. Press, 2009, p 288-289.

GOMES, J.F. et al. Evaluation of a Novel Kit *(TF-Test*) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. **J. Clin. Lab. Anal.,** v.18, n. 2, p. 132-138, 2004.

HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Vet. Scand.**, v. 22, n. 3-4, p. 594-596,1981.

LENNETTE, E.H. et al. **Manual of clinical microbiology.** 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985. 1149 p.

LUMINA, G. et. al. Avaliação do kit “TF-Test” para o diagnóstico das infecções por parasitas gastrintestinais em ovinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.,** v. 43 n. 4, p. 496-501, 2006.

MELONI, B.P.; THOMPSON, R.C.A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. **J. Parasitol.,** v. 82, n. 5, p. 757-762, 1996.

MONTEIRO, L. et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. **J. Microbiol. Methods**, v. 45, n. 2, p. 89–94, 2001.

OLSON M.E. et al. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends Parasitol.,** v. 20, n. 4, p. 185-191, 2004.

RIEUX, A. et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from high-excreting Young dairy calves in dairy cattle herds in Western France. **Vet. Parasitol.,** v.112, n. 10, p. 3423-3431, 2013.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Vet. Parasitol.,** v.155, n.1/2, p.15-23, 2008.

SAS INSTITUTE INC. **The SAS System, release** 9.3. SAS Institute Inc., Cary: NC, 2015.

SILVERLÅS, C. et al. *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. **Parasitol. Res.,** v. 107, n. 6, p. 1435–1444, 2010.

TEIXEIRA, W.F.P. et al. Diagnóstico de criptosporidiose em amostras fecais de bezerros por imunofluorescência direta e microscopia de contraste de fase. **Cienc. Rural**, v.41, n.6, p. 1057-1062, 2011.

VARGAS JÚNIOR, S.F. et al. Surto de criptosporidiose em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.***,* v. 34, n. 8, p.749-752. 2014.

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**., v. 41, n. 1-2, p. 37-42, 2001.

XIAO L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Exp. Parasitol.**, v. 124, n. 1, p. 80– 89, 2010.

XIAO, L. et al. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 66, n. 12, p. 5492-5498, 2000.

APÊNDICE

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Desenvolvimento e validação de um sistema de análise automatizada para o protozoário *Cryptosporidium spp.*"**, Processo FOA nº 2013-00847, sob responsabilidade de Katia Denise Saraiva Bresciani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 12 de março de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Agosto de 2016.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Setembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Development and validation of a system for automated analysis protozoan *Cryptosporidium spp.*"**, Protocol FOA nº 2013-00847, under the supervision of Katia Denise Saraiva Bresciani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 12, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 01, 2016.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 01, 2016.

Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br