



**CENTRO
UNIVERSITÁRIO**

CENTRO UNIVERSITÁRIO FAG

**COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE KINYOUN E ZIEHL-NEELSEN
(MODIFICADOS) PARA PESQUISA DE *CRYPTOSPORIDIUM SP* REALIZADO EM
UM LABORATÓRIO DA REGIÃO OESTE - PR**

Cascavel

2017

ADRIANO NUNES REZENDE

**COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE KINYOUN E ZIEHL-NEELSEN
(MODIFICADOS) PARA PESQUISA DE *CRYPTOSPORIDIUM SP* REALIZADO EM
UM LABORATÓRIO DA REGIÃO OESTE - PR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Centro Universitário da Fundação Assis
Gurgacz, FAG, Curso de Farmácia.

Prof. Orientador: Maria das Graças Marciano
Hirata Takizawa.

**Cascavel
2017**

ADRIANO NUNES REZENDE

**COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE KINYOUN E ZIEHL-NEELSEN
(MODIFICADOS) PARA PESQUISA DE *CRYPTOSPORIDIUM SP* REALIZADO EM
UM LABORATÓRIO DA REGIÃO OESTE - PR**

Trabalho apresentado no Curso de Farmácia do Centro Universitário FAG,
como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, sob a
orientação do Professor Maria das Graças Marciano Hirata Takizawa.

BANCA EXAMINADORA

Maria das Graças Marciano Hirata Takizawa
Mestre

Nome do Professor Avaliador
Titulação do Professor Avaliador

Nome do 2º Professor Avaliador
Titulação do Professor Avaliador

Cascavel, 20 de Novembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico todo meu esforço, dedicação e motivação a minha esposa que me incentivou sempre a estudar e ter sempre perspectivas para o futuro melhor, em especial ao meu filho que sempre foi minha fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre comigo, me fortalecendo. Em especial a minha esposa e filho que me ajudou em cada passo dessa caminhada, fazendo parte dessa conquista.

Agradecimento aos pais e familiares que me incentivaram na busca de oportunidades melhores e sempre desejando o sucesso.

Agradecimento em especial a minha orientadora Maria das Graças Marciano Hirata Takizawa, obrigada por toda dedicação e apoio, pela paciência e por acreditar no meu potencial.

Um obrigado a todos os professores e amigos por contribuírem nessa minha jornada pelos ensinamentos, conselhos e por acreditar em nós.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	7-24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25-34
2. ARTIGO	35-52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53-55
3. NORMAS DA REVISTA	56-70

REVISÃO DE LITERATURA

1. *CRYPTOSPORIDIUM* sp

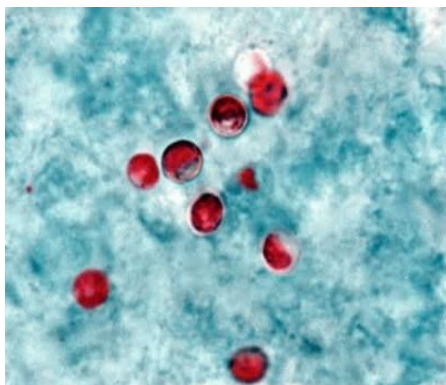
1.1. ETIOLOGIA DA CRYPTOSPORIDIOSE

O *Cryptosporidium* sp é um protozoário do filo Apicomplexa, pertencente à subclasse coccídea, descrito em 1907 por Tyzzer. Isolado das glândulas gástricas de camundongos assintomáticos. Não havia sido associado à doença em animais, até Slavin (1955) atribuir-lhe ao papel de agente causal de diarreia. O *Cryptosporidium* sp é um parasito considerado monóxeno, foi identificado em várias espécies de animais, como bovinos, suínos, ovinos, animais domésticos e silvestres (TYZZER, 1907).

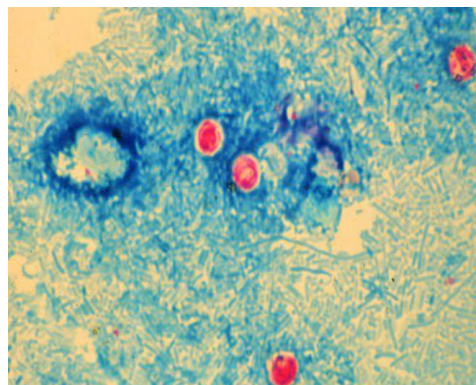
Segundo os autores (Allison *et al*, 1999) a criptosporidiose começou a ganhar importância no final do século passado com os pacientes imunocomprometidos tanto pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), quanto pelos transplantes e outras doenças que comprometem o sistema imunológico, pessoas assintomáticas também podem apresentar criptosporidiose. Sabe-se, entretanto, que sua existência é milenar, estudos realizados identificaram *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp no conteúdo intestinal de múmias com 500 a 3000 anos de idade, encontradas na área dos Andes, na América do Sul.

Cerca de dez espécies de *Cryptosporidium* já foram isolados de mamíferos, répteis, aves e peixes (Fayer *et al.*,1999), porém *Cryptosporidium parvum* é a espécie mais importante, responsável pela doença criptosporidiose, que pode causar no homem e nos animais domésticos problemas graves a nível intestinal.

Os oocistos medem de 4 a 6µm de diâmetro e são esporulados, contendo 4 esporozoítos. São eliminados nas fezes frescas e, possivelmente, por outras vias, como por meio das secreções respiratórias. Após ingestão ou possível inalação, são liberados e migram para as células epiteliais do trato gastrointestinal e trato respiratório, dentro das células, ocorre reprodução sexuada.



Fonte: <http://www3.sympatico.ca/james.smith090/Crypto.HTM>



Fonte: <http://www3.sympatico.ca/james.smith090/Crypto.HTM>

Após a fertilização dos macrogametócitos (célula feminina) pelo microgametócitos (célula masculina), é formado o zigoto, sofre esporulação dentro do hospedeiro para formar o oocisto, e liberado pelas células. Como a esporulação ocorre dentro do hospedeiro, a auto-infecção. Os oocistos são infectantes já no momento da excreção, permitindo a transmissão fecal-oral, direta e indiretamente (DUBEY *et al.*, 1990).

O *Cryptosporidium* é semelhantemente igual a outros coccídeos, para se proteger da resposta imune do hospedeiro, fica dentro da célula durante seu desenvolvimento, tendo, entretanto, acesso às reservas nutricionais do hospedeiro. Abriga-se dentro do vacúolo parasitóforo ligado a uma membrana vacuolar parasitófora que é uma ligação de transporte de nutrientes entre o parasito e o hospedeiro. O *Cryptosporidium* se difere dos outros coccídeos no aspecto de possuir uma estrutura única que é uma membrana alimentadora que separa diretamente a célula e o citoplasma do parasita.

Os parasitos do filo Apicomplexa alteram as membranas das células do hospedeiro por meio de lipídeos e proteínas encontradas dentro das organelas do parasito, isso ocorre para colaborar na invasão e na alteração da membrana vacuolar parasitófora e do vacúolo parasitóforo. O instrumento para invasão é constituído por organelas tubovasculares denominadas de roptrias, que estão no ápice do parasito (THEODOS, 1998).

O *Cryptosporidium* não fica contido dentro do citoplasma, é circundado por membranas do hospedeiro formando o vacúolo parasitóforo que se liga a membrana vacuolar parasitófora que não se fecha totalmente devido entrada de nutrientes (NIME *et al.*, 1996).

1.2. MECANISMO DE TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA

O modo de transmissão é fecal-oral, através do contato animal-humano, ou humano-humano. A infecção pode ocorrer pela ingestão de alimentos e a água contaminada com fezes de seres humanos e/ou animais infectados. Há possibilidades de infecção por meio do ar contaminado com oocistos ou mesmo durante a relação sexual (UPTON *et al.*, 2000).

Rush *et al* (1990), constataram que surtos de criptosporidiose já foram relatados entre diferentes grupos de profissionais, aqueles que trabalhavam diretamente com animais infectados, veterinários e tratadores, também se destaca os médicos, enfermeiros e laboratoristas expostos a pacientes hospitalizados ou materiais biológicos contaminados, os mesmos observaram que quem convivem em locais fechados como creches, asilos e presídios também são expostos a criptosporidiose.

De acordo com os autores Meisel *et al.*, (1976), os primeiros dois casos de criptosporidiose em humanos foram relatados em 1976. A partir de 1982, vários casos humanos foram relatados em pacientes imunocomprometidos, sendo que o número de relatos aumentou significativamente devido ao reconhecimento da sua gravidade em pacientes com AIDS. A criptosporidiose, antes considerada uma zoonose, passou a ser considerada uma antroponose. Verificou-se que *Cryptosporidium parvum* apresenta dois genótipos como agentes etiológicos de diarreia em humanos: o genótipo I, infectando somente humanos e o genótipo II infectando humanos e bovinos (PIENIAZEK e cols. 1999; SULAIMAN e cols. 1998). Devido ao *Cryptosporidium parvum* genótipo I ser uma espécie geneticamente distinta e antroponótica, foi proposta uma nova nomenclatura, passando a ser *Cryptosporidium hominis* (PIENIAZEK *et al.*, 1999; SULAIMAN *et al.*, 1998).

A prevalência global de criptosporidiose em indivíduos infectados com HIV, com ou sem diarreia, não é totalmente conhecido. Aparentemente, é menos frequente em pacientes assintomáticos. A ampla distribuição de infecção em pessoas com AIDS apareceu pela primeira vez nos EUA; Mais tarde, foi relatado que 3,6% de 19.817 desses pacientes tinham infecção com uma taxa de mortalidade de 61% (FAYER, 2004).

Nos Estados Unidos a prevalência é de 3,8% na Europa 6,6% em países do terceiro mundo, incluindo a Venezuela 60,5%. Esta variação pode ser explicada por vários fatores, tais como a falta de estudo, conhecimento e o grau de imunossupressão de pacientes com AIDS, a

sensibilidade dos métodos de diagnóstico, a área geográfica, a virulência do parasita (PARTE-PEREZ BRITO, 2004; CHACIN-BONILLA *et al.*, 1992).

Nos Estados Unidos ocorreram vários relatos de surtos de criptosporidiose. Sendo os mais importantes na Geórgia em 1987 afetando cerca de 13.000 pessoas e outro na cidade de Milwaukee, no Estado de Wisconsin, durante os meses de março e abril de 1993, resultando em uma infecção gigantesca, afetando cerca de 403.000 pessoas. No surto de Milwaukee ocorreram graves consequências, com registros de óbitos, pelo envolvimento de pessoas imunocomprometidas por diferentes patologias. A água de abastecimento público, apesar de tratada e dentro dos padrões de potabilidade, foi responsabilizada pela transmissão.

Nas duas cidades foi constatado oocistos de *Cryptosporidium* na água de abastecimento. O fato que mais chamou a atenção das autoridades foi que os oocistos são resistentes aos procedimentos de cloração e ozonização utilizados para o tratamento convencional da água. Devido ao seu reduzido tamanho, os procedimentos de filtração também ineficientes. A resistência ao tratamento convencional da água é, hoje, objeto de inúmeras pesquisas para desenvolver tecnologias para o tratamento da água e de métodos mais sensíveis para detecção de oocistos, para que se possa controlar o abastecimento público (MACKENZIE *et al.*, 1995).

Nos Estados Unidos, a criptosporidiose é generalizada geograficamente, ocorre mais comumente nos meses quentes e chuvosos e tem uma distribuição de idade bimodal, com o maior número de casos relatados ocorrendo entre crianças de 1 a 9 anos e entre adultos de 25 a 39 anos. Os fatores de risco associados à infecção esporádica incluem contato com pessoas doentes, viagens ao exterior e relações sexuais entre homossexuais. Os surtos em creches também são comuns e podem resultar na disseminação para a comunidade (YODER *et al.*, 2010). Em países em desenvolvimento as crianças são mais vulneráveis a infecção parasitária, frequentemente as mais infectadas com idade de dois anos. O aleitamento materno exclusivo durante os primeiros três meses de vida e a amamentação parcial (em comparação com a ausência de amamentação) posteriormente, parecem oferecer alguma proteção. Os picos geralmente ocorrem durante meses mais chuvosos e quentes (VANDENBERG *et al.*, 2012).

Na África, devido à grande incidência de casos de HIV, observou-se um aumento dos relatos de casos de criptosporidiose. O parasito foi identificado em mais de 60% dos pacientes com AIDS. Crianças menores de cinco anos de idade, apesar de não infectadas com o HIV,

são as maiores vítimas dessa parasitose. As consequências do *Cryptosporidium sp* no continente são agravadas pela desnutrição e associação entre outras patologias como a tuberculose, toxoplasmose, sarampo, malária e outras parasitoses. A multiplicidade de patologias faz com que *Cryptosporidium* nem sempre seja o principal agente etiológico das diarreias (FLEMING, 1990; PERCH *et al.*, 2001).

De acordo com Alcantra *et al.*, 2001 no Brasil, são poucos os registros de surtos causados por *Cryptosporidium*: um ocorrido na cidade de Encarnação de Salinas - BA e outro em São Paulo – SP, na Administração Regional de Saúde do Butantã, em uma creche, com 17 casos (INFORMENET-DTA-DDTHA/CVE/SES-SP, 2002).

Não há estudos epidemiológicos sobre a doença, existem alguns estudos realizados em grupos de pacientes com AIDS em três cidades do Estado de São Paulo, São Paulo, Santos e Ribeirão Preto, apresentaram frequências de 14,3%, 19,1% e 6,4% respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 1991).

No norte do Brasil, foram analisadas 34 amostras fecais de pacientes adultos, portadores do vírus HIV, sendo detectados oocistos de *Cryptosporidium* em 3% dos pacientes (LAINSON e cols., 1999). No Estado de São Paulo, nos anos 1997, 1998, 1999 e 2000, ocorreram respectivamente 134, 115, 70 e 31 casos, segundo dados da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo (relatório da Vigilância Epidemiológica - Programa Estadual DST/AIDS). Em crianças demonstrou-se maior incidência na faixa etária compreendida entre 1 a 4 anos de idade (LAINSON *et al.*, 1999).

Na cidade de São Paulo, estudo realizado para identificar a presença de oocistos de *Cryptosporidium*, em esgoto e água de córrego, mostrou que todas as amostras estavam contaminadas (FARIAS e cols., 2002). Em estudo semelhante realizado no rio Atibaia, no município de Campinas - SP, observou-se presença de *Giardia sp* e *Cryptosporidium sp* em todas as amostras (FARIAS *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2001).

Segundo os autores Xia & Fayer (2008), estes trabalhos indicam a disseminação do parasito nas reservas hídricas e nas comunidades, elevando o risco de infecção, correlacionam a *Giardia sp* com o *Cryptosporidium sp*, por serem protozoários entéricos que infectam os humanos e animais silvestres em todo mundo.

Nos países em desenvolvimento, *Giardia* e *Cryptosporidium*, juntamente com as bactérias e vírus, constituem parte de um complexo grupo de doenças diarreicas que causam grande falta no trabalho e podem representar uma das causas que impedem o desenvolvimento socioeconômico desses países, a *Giardia* e *Cryptosporidium* estão incluídos na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (World Health Organisation Neglected Diseases Initiative) por causa de sua estreita relação ou ligação com a pobreza, com a falta de saneamento básico que é um dos principais fatores e principalmente com a qualidade da água (SAVIOLI *et al.*, 2006).

No histórico das espécies de *Cryptosporidium* que contaminam em várias partes do mundo, cinco espécies são responsáveis pela maioria das infecções, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto imunocomprometidos são *C. hominis*, *C. parvum*, *C. melagridis*, *C. felis* e *C. canis*. Ocasionalmente, outras poucas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* são encontrados em humanos, como *C. muris*, *C. suis*, *C. andersoni* e *Cryptosporidium* genótipos do cervo e do macaco (XIAO & FENG, 2008).

Estudos realizados de epidemiologia molecular em países em desenvolvimento revelam que a complexidade na transmissão de *C. hominis* depende do país. Nos países, geralmente há uma alta endemicidade de *Cryptosporidium* e baixa ocorrência de surtos, sendo as crianças e os indivíduos imunocomprometidos os mais afetados e vulneráveis. É importante ressaltar que a baixa prevalência de infecção mistas reportadas em crianças se deve ao fato de ser detectado apenas o genótipo dominante. Os estudos de subtipagem de *C. hominis* (alelos Ia, Ib, Id, Ie) revelam a diversidade da transmissão em área endêmicas e enfatizam a necessidade de extensivos estudos de epidemiologia de criptosporidiose (CAMA *et al.*, 2008; CHALMERS *et al.*, 2008).

Foi realizado um breve estudo sobre os avanços nas pesquisas de *Cryptosporidium*, dos 300 gêneros do filo Apicomplexa, já registrado em 106 países. Os estudos dos genótipos têm acrescentado informações sobre morfologia e ajudado para identificar novas espécies.

Exemplo disso é que, durante um evento em maio de 2007, pesquisadores reconheceram como válidas apenas 16 espécies e atualmente já reconhecem mais três novas espécies, *C. fayeri* e *C. macropodum* em cangurus (RYAN *et al.*, 2008) e *C. ryanae* em gado (FAYER *et al.*, 2008). As espécies nomeadas são: *C. parvum* (genótipo bovino) em humanos e mamíferos ungulados, *C. hominis* em humanos, *C. melagridis* em aves e humanos, *C. bovis* em bovino e ovino, *C. suis* em porcos, *C. wrairi* em porquinhos da Índia, *C. felis* em gato, *C. canis* em cães, *C. saurophilum* em lagartos, *C. serpentis* em cobras, *C. andersoni* em bovino, *C. galli* e *C. baileyi* em aves, *C. molnari* e *C. scopthalmi* em peixes. Além dessas espécies, existem, aproximadamente, outros 40 criptosporídios sem nome, denominados genótipos, que são distintos e, em sua maioria pertencem provavelmente a outras espécies (SMITH *et al.*, 2007).

Após toda descoberta das espécies foi ainda citado 10 genótipos de aves, referem-se à hipótese de que *C. meleagridis* seja originalmente parasito de mamíferos e que *C. galli* seja patogênico para pássaros (Wang *et al.*, 2008).

1.3. PATOGENIA

Parte dos conhecimentos que se têm sobre a patologia da criptosporidiose, bem como da resposta imunológica e mesmo do diagnóstico ocorreu na medicina veterinária. A dose infectante do parasita é baixa. Realizou-se estudos em voluntários sadios demonstrando que a dose média infectante é de 50 oocistos, sendo que 50% dos indivíduos apresentaram infecção. Em pacientes imunocomprometidos, é previsível que as doses infectantes possam ser bem menores (FAYER *et al.*, 2000).

As manifestações clínicas da criptosporidiose dependem da espécie isolada, da idade e do estado imunológico do hospedeiro, a intensidade de infecção pode variar desde uma forma subclínica a uma mais acentuada (DUBEY *et al.*, 1990). A diarreia é causada por alterações da mucosa intestinal provocada pela diminuição da superfície absorptiva decorrente da atrofia e fusão de vilosidades (ABREU, 2001).

Pacientes portadores do HIV também desenvolvem uma forma mais grave de infecção intestinal podendo ocorrer como uma complicação intestinal cistoide pneumatose, caracterizado pela presença de cistos nas paredes finas cheias de gás, que quando quebrado pode causar neumoretroperitônio e Pneumomediastino. Além disso, podem experimentar

infecções atípicas que afetam os tecidos intestinais, raramente afetados em pacientes imunocompetentes. Os parasitas migram para outros sistemas de órgãos, tais como a faringe, esôfago, estômago, apêndice, fígado, trato biliar, pâncreas, trato respiratório e do ouvido médio, causando uma infecção disseminada (NAVIN E JURANEK, 1984; FORBES et al., 1993).

O trato biliar é o local mais comum e clinicamente relevante para infecção extra-intestinal, pacientes com HIV afetados pela epidemia da criptosporidiose conhecido em Milwaukee, EUA, moradores nesta cidade apresentaram um maior risco de envolvimento do trato biliar com desfecho fatal dentro de um ano. A Colangite esclerosante especialmente, é uma complicação de relevância em doentes com HIV. Em 20 destes pacientes com colangite, 13 (65%) com criptosporidiose (FORBES et al., 1993) e 43 com diarreia crônica devido ao parasita, 8 (18,6%) infecção do trato biliar (Lopez-Velez et al., 1995).

Além disso, estudos de corte demonstraram que um único episódio durante a infância, mesmo assintomático, pode levar ao crescimento e persistir por vários meses. O seguimento em longo prazo também sugere uma associação com má condição física, uma vez que as crianças com criptosporidiose durante os dois primeiros anos de vida apresentaram pontuações de aptidão no Teste de Passo de Harvard 10% mais baixas do que as crianças que não o fizeram, quando medidas 4-7 anos mais tarde (GUERRANT *et al.*, 1999).

Dada à magnitude desse efeito, mesmo em um pequeno estudo, esses resultados justificam maior exploração. A criptosporidiose é também um fator de risco independente de mortalidade infantil (AMADI *et al.*, 2001).

Em pessoas com HIV / AIDS, não é até que a contagem de CD4 desça abaixo de 100 células por mm³ que o risco aumenta para doença grave e implacável acompanhada de má absorção, perda de peso e alta letalidade, embora assintomática ou uma infecção leve possa ocorrer mesmo neste grupo (CABADA *et al.*, 2010).

Em uma série de casos de nove pacientes infectados com HIV da Itália, os quatro pacientes com a doença mais grave, todos os que tinham uma contagem de linfócitos T CD4 + <50 células por mm³, abrigavam subtipos de *C. parvum* dentro da família IIC. Apesar dos anti-retrovirais possuir um papel importante, diminuindo o percentual de mortes relacionadas

ao HIV e às doenças oportunistas, a criptosporidiose ainda persiste nos estágios avançados da AIDS (DEL CHIERICO *et al.*, 2011).

Vários estudos relatam que o *C. hominis* causa doença mais grave do que *C. parvum*, a evidência de uma possível correlação entre subtipo e manifestações clínicas está se acumulando. Em um grupo de crianças que nasceram em Lima, Peru a família Ib do subtipo de *C. hominis* foi associada com náuseas, vômitos e mal-estar. Fatores de risco como práticas de higiene, presença de animais e variáveis econômicas não foram associados a genótipos e subtipos específicos (CAMA *et al.*, 2008).

Os sintomas podem ser melhorados e as taxas de mortalidade diminuídas com a reconstituição da imunidade após terapia anti-retroviral. Nos países em desenvolvimento, onde a maioria das pessoas infectadas pelo HIV não têm acesso à terapia anti-retroviral, o grau da criptosporidiose se agrava mais ainda permanece mais elevado (YODER, *et al.*, 2010; Nações Unidas, 2011).

São observadas manifestações extra-intestinais da infecção por *Cryptosporidium*, a doença das vias biliares, incluindo a colecistite e pancreatite com formação de estenoses, são complicações bem documentadas em pacientes imunocomprometidos e de mal prognóstico.

A Criptosporidiose respiratória tem sido descrita, na maioria das vezes em crianças, as infecções são frequentemente assintomáticas, mais podem manifestar-se como infiltrado pulmonar apresentando dificuldade respiratória (MOR *et al.*, 2010).

Com invasão e colonização de células epiteliais pelo parasita provocam atrofia das vilosidades com hiperplasia das criptas, perda de produção do epitélio, absorção intestinal e enzimas digestivas ligadas à membrana, o transporte de nutrientes e eletrólitos são alterados, causando a diminuição da absorção de glicose e aumento da secreção de cloreto (ARGENZIO *et al.*, 1990).

O *Cryptosporidium* quebra as junções de células epiteliais, o que pode levar a um aumento da permeabilidade epitelial, mediadores pró-inflamatórios, IL8. As prostaglandinas alteram o transporte de cloreto e sódio, principalmente através da estimulação do sistema nervoso entérico (FAYER, 2004).

O envolvimento do intestino delgado proximal geralmente provoca diarreia aguada e grave enquanto infecção íleo distal e intestino grosso é normalmente assintomática, todos estes fatores indicam que criptosporidiose é associado com má absorção e diarreia secretora. Devido à diarreia profusa experimentada por alguns doentes, foi proposto que o parasita

produz uma enterotoxina que leva à secreção de cloreto, resultando neste tipo de diarreia (THOMPSON *et al.*, 2005).

De acordo com gravidade da diarreia tem aumento de secreção de cloreto e má absorção de glicose, o mecanismo tem como os seus níveis elevados nas infecções (HERNADEZ *et al.*, 2007).

Em doentes com HIV a diminuição das células imunes, quimiocina CXCL10 pode contribuir para a imunopatogênese através do recrutamento de células inflamatórias (WANG *et al.*, 2007).

Não se sabe por que a criptosporidiose biliar e colangiopatia principalmente associada pode afetar pacientes com HIV. Um estudo recente mostrou que a proteína é de transcrição associada ao HIV-1, essencial para a replicação do genoma viral, aumenta a apoptose induzida cholangiocytes *C. parvum*; este mecanismo contribui para o desenvolvimento destes colangiopatia e sugere que o HIV-1 e *C. parvum* pode ter efeitos sinérgicos sobre o trato biliar (O'HARA *et al.*, 2007).

1.4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico para criptosporidiose realizado por biópsia do intestino delgado, é invasivo, necessita de uma grande quantidade de material, para identificar os organismos na borda das microvilosidades do segmento intestinal comprometido pelo parasita (GARCIA *et al.*, 1983).

Com os novos métodos, o diagnóstico foi facilitado através de análise parasitológica das fezes, pela demonstração dos oocistos de *Cryptosporidium sp*, utilizando métodos de concentração, baseados em princípios de flutuação, sedimentação espontânea e centrífugo-sedimentação. Para visualização dos oocistos, foram empregadas diferentes técnicas de coloração baseadas nas propriedades de álcool-ácido resistência dos oocistos, com corantes derivados da fucsina carbólica como as colorações de Ziehl Neelsen modificadas, Kinyoun modificado, e coloração fluorescente como a Auramina e outros (HEALY *et al.*, 1995).

Outros métodos foram desenvolvidos, mais comumente ainda se utiliza o microscópio na pesquisa dos *Cryptosporidium sp* nas fezes, com preferência preservadas em formalina 10% e concentradas para detectar este coccídeo (4-6µm). Contudo a microscopia requer um técnico especializado e treinado para realizar a leitura das lâminas, a identificação é melhor usando a coloração rápida de ácidos modificados, o limite de detecção é de 50.000 a 500.000 cistos por gramas de fezes, mais a sensibilidade da microscopia é ainda melhorada com o uso de manchas fluorescentes ou imunofluorescentes (WEBER, *et al.*,1991).

Entre os laboratórios, estima-se que 70% usam como rotina as colorações com Auramina, Ziehl – Neelsen modificado, Kinyoun modificado, esses métodos embora sejam menos sensíveis, são os de menor custo para o laboratório. Atualmente os testes (ELISA) imunoenzimáticos vêm sendo introduzidos gradualmente no diagnóstico de rotina nos laboratórios que processam grande número de amostras, entretanto se eleva muito custo, os laboratórios permanecem com as colorações. Métodos de PCR extremamente sensíveis estão disponíveis em laboratórios de referência em grandes centros, podem revelar-se úteis para o diagnóstico de infecção por *Cryptosporidium sp* no futuro. Nas colorações de Ziehl – Neelsen o propósito da coloração é destacar os *Cryptosporidium sp* em tons de rosa claro/vermelhos, os componentes da coloração é Fucsina fenicada de Ziehl, Azul de metileno e Álcool – ácido descorante (CHALMERS *et al*, 2011).

Alguns métodos utilizando princípios imunológicos e moleculares, foram desenvolvidos para análise de amostras fecais, com intuito de diagnosticar o *Cryptosporidium sp*. Os autores GARCIA *et al.*, (1987) descreveram a identificação de oocistos nas fezes por meio da técnica de imunofluorescência direta utilizando anticorpos monoclonais dirigidos contra *Cryptosporidium sp*. Após os testes os autores encontraram 100% de sensibilidade e 99% de especificidade, número que se transformou em 100% de aproveitamento.

O teste de ELISA imunoenzimático para detecção de coproantígenos solúveis nas fezes revelou-se altamente sensível e passível de uso para processamento de grande quantidade de amostras. Os kits de ELISA foram avaliados por diferentes autores e se mostraram com um custo menor que o de imunofluorescência. Outras técnicas de aglutinação em látex e imunocromatográfica foram utilizadas para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, não foram divulgados os resultados. (LORENTE *et al.*,2002).

Para os autores LAXER *et al.*, (1991), a importância da utilização das técnicas de biologia molecular não só para estudos taxonômicos, também para o diagnóstico laboratorial da criptosporidiose, a realização da reação da polimerase em cadeia (PCR) em material fecal é um processo demorado e complicado, pois durante o processo se deve garantir uma obtenção do DNA dos oocistos, caso não ocorra essa obtenção o teste pode se tornar inválido.

Os métodos moleculares de (PCR) tem a sensibilidade de detectar *Cryptosporidium* em amostras fecais e são também importantes para estudos epidemiológicos. Eles permitem a caracterização genotípica das espécies de *Cryptosporidium* que são responsáveis por surtos e agravos na população, fornecendo informações privilegiadas para investigação de prováveis fontes e vias de transmissão (MORGAN *et al.*, 1998).

Para se fazer a escolha do método diagnóstico, devem ser considerados vários fatores importantes como: a finalidade do trabalho, simplicidade da execução e manipulação da técnica, facilidade de interpretação dos resultados, se há necessidade de equipamentos, quais são e sua função, os técnicos com máximo de conhecimento e experiência, quantidade de testes da demanda, rapidez da resposta, sensibilidade e especificidade da técnica adotada.

As técnicas mais utilizadas são as de coloração, os *Cryptosporidium* estão na forma de oocistos esporulados, contendo 4 esporozoítos, que quando corados pela coloração de Kinyoun modificado, apresentam cor vermelho brilhante, seguindo os mesmos princípios observados nas microbactérias, que é a capacidade de se combinar com o corante fucsina carbólica, resistindo à descoloração com o álcool-ácido. Os oocistos que são eliminados nas fezes possuem parede constituída de longas cadeias de lipídeos (50-90 carbonos), o que, possivelmente, lhe permite exibir o mesmo padrão de coloração das microbactérias. A técnica de Kinyoun tem algumas diferenças em relação à técnica de Ziehl – Neelsen, ambas com o mesmo propósito de identificação do *Cryptosporidium* sp algumas das diferenças é que a coloração de Kinyoun não precisa ser aquecida a de Ziehl - Neelsen tem que ser aquecida, tempo de coloração para Kinyoun é 30 minutos e para Ziehl - Neelsen é de 5 minutos. A composição de Kinyoun é composta por Fucsina de Kinyoun ou Carbólica, Azul de metileno e Álcool - ácido descorante (CHAPIN, 1995).

De acordo com comportamento dos oocistos frente à coloração álcool-ácido resistente e com suas características morfológicas, constituem valiosa ajuda para visualizar corado, diferenciando de fungos, artefato e de outras partículas, que se coram em azul ou rosa

pálido, a sensibilidade está associada ao número de oocistos presente na amostra (KONEMAN *et al.*, 1989).

Existe uma carência de métodos de diagnóstico clínico rápido, sensível e específico para um tratamento adequado. Quando se concentra no diagnóstico da criptosporidiose o resultado tem de ser o mais rápido possível, em pacientes com diarreia, que muitas vezes excretam grandes quantidades de oocistos, como os doentes com HIV são excretados bilhões de oocistos, e como o paciente já se encontra imunocomprometido tem que obter os resultados o quanto antes, para iniciar o tratamento. Apesar de todo o transtorno, o diagnóstico nestes pacientes é subestimado por que a detecção de parasita requer técnicas especializadas (BLACKMAN *et al.*, 1997).

Os médicos muitas vezes não consideram este diagnóstico em pacientes com diarreia e não solicitam um exame de fezes para *Cryptosporidium*, por que não é normalmente incluído nas análises de rotina, acesso limitado para o diagnóstico e de pouca importância para os médicos, por passar despercebido o parasita determina um aumento da morbidade e mortalidade. De acordo com estimativas do Banco Mundial, mais de um terço da população vive com menos de dois dólares por dia, o fato é que na maioria das vezes os pacientes não são interpretados corretamente nas consultas e com diagnóstico não condizente, o quadro do paciente se agrava cada vez mais ao passar do tempo (MACPHERSON, 2005).

1.5. IMUNIZAÇÃO

A ativação de respostas imunes contra o *Cryptosporidium* foi, no entanto, considerada como único mecanismo conhecido para a eliminação, uma vez que as drogas disponíveis eram utilizadas para o tratamento, foram de eficácia limitada ou ineficaz. Entretanto, a nitazoxanida é agora considerada a droga de escolha em pacientes imunocompetentes, O envolvimento de respostas imunes por HIV explica o quanto impacta significativamente a criptosporidiose em indivíduos infectados pelo HIV (Caccio e Pozio, 2006).

Através de estudos se sabe que a resposta imunológica à *Cryptosporidium* vem de estudos experimentais. Os ratinhos com imunodeficiências combinadas graves são

susceptíveis a criptosporidiose e são os mais procurados para se estudar as respostas imunológicas à infecção. Outros hospedeiros têm sido utilizados para testes, como os gatos, vitelos, cavalos e aves de capoeira deficientes em imunidade celular devido a infecções ou defeitos genéticos (RIGGS, 2002).

Estudos de infecção experimental mostraram que os componentes principais para a prevenção ou eliminação de criptosporidiose são linfócitos CD4 + e interferon gama (IFN- γ), outros estudos de infecção experimental mostraram que os componentes principais para a prevenção ou eliminação de criptosporidiose são linfócitos CD4 + e interferon gama (IFN- γ) (Mc.Donald *et al.*, 1998).

Os linfócitos intraepiteliais (LEL) desta população de células são críticas para a eliminação da infecção; estão intimamente associados com enterócitos parasitadas, que aumentam no intestino a produção de IFN- γ . Em indivíduos imunocompetentes, os linfócitos T auxiliares (LIE) tem aumento de CD4 mais no início da infecção os linfócitos T citotóxico também são liberados (LIE) CD8 eles agem na fase de recuperação, desta forma acredita-se que os primeiros são os mais importantes no controle do parasita sendo no início da infecção e o segundo condutor parecem desempenhar um papel nas fases posteriores (RIGGS, 2002).

Estudo realizado sobre a citocina (IL-18) poderia desempenhar um papel importante de defesa em células epiteliais durante as primeiras interações do hospedeiro-parasita, como in vitro, observou-se uma marca de inibição no desenvolvimento do parasita, na presença de IL-18 (MC. DONALD *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados apresentados, a quimiocina desempenha um papel importante na resolução da criptosporidiose, atraindo o sistema imunológico para o local de células de infecção. Os mastócitos podem desempenhar um papel na resistência inata, mas, aparentemente, o fator de necrose de tumor, IL-2 e células assassinas naturais não estão envolvidos na resistência natural contra o *Cryptosporidium*. No entanto, a função das células é pouco detalhado a respeito do envolvimento (THEODOS, 1998).

A imunidade humoral pode às vezes desempenhar um papel menos importante na recuperação da infecção. Alguns estudos realizados de resistência a infecção têm sido

associados com as respostas de anticorpos locais IgA e IgM. Os anticorpos policlonais podem reduzir os sintomas e excreção de oocistos em infecções naturais e experimentais. Os anticorpos são acionados contra o *Cryptosporidium sp* se ligam-se de forma extracelulares no parasita para parar o seu desenvolvimento intracelular (RIGGS, 2002).

A imunidade celular é o principal mecanismo de defesa para remoção da criptosporidiose, desta forma se destaca algumas células do sistema imunológicas sendo as principais para prevenção ou erradicação da infecção os linfócitos CD4 mais as citocinas IFN- γ , sendo este pelo qual o parasita não resiste (THEODOS, 1998; RIGGS, 2002).

Os pacientes com HIV, assim como a outros seres humanos ou animais com baixas contagens destes linfócitos são incapazes de eliminar o parasita. Só será possível a restauração destas células com tratamento de anti-retroviral que permitirá a recuperação clínica ou erradicação do parasita (MAGGI *et al.*, 200).

1.6. SINTOMATOLOGIA

Os pacientes com HIV são os mais susceptíveis a uma forma devastadora da criptosporidiose, por eles não terem um sistema imunológico atuante o parasita se manifesta por diarreia aquosa, volumoso e crónica, que se limita a doentes, causando um quadro mais preocupante. As células de defesa chegam a ter valores muito baixos como células T CD4 + <150 / ml). São casos relatados que pode chegar até 71 evacuações e 17 litros por dia. Os pacientes ficam debilitados e apresentam aparência clínica marcada pela perda de peso (CLARK 1999).

Embora a infecção muitas vezes se manifesta como uma diarreia grave e persistente em pacientes com AIDS, há uma variedade acentuada na apresentação clínica, principalmente, depende do estado de imunossupressão (CLARK, 1999). Num estudo de criptosporidiose em pacientes de HIV com diarreia crónica foi observada em 59,7% dos pacientes; doença fulminante com remoção de >2 litros de fezes por dia, 7,8% deles (com esferas de CD4 + <50 / ml); 28,7% das infecções transientes e 3,9% de infecções assintomáticas. As duas últimas apresentações clínicas foram mais frequentes em pacientes imunocomprometidos (BLANSHARD *et al.*, 1992).

Infectado com HIV, pacientes relataram pelo menos 19 casos de sinusite com dor, descarga, febre e arrepios e pelo menos, 69 casos de infecção no trato respiratório, das quais apenas dois eram assintomáticos. Contudo, a coexistência do parasita com outros agentes patogénicos não permitem concluir a relação de causa-efeito entre o corpo e sintomas respiratórios (DUNAND, 1997).

Observa-se um amplo campo de gravidade da doença, influenciado pela idade, estado nutricional e imunológico do hospedeiro e possivelmente pelas espécies e subtipos infectantes, muito infecções são assintomáticas ou leves e auto-limitadas e muitas vezes não são reconhecidas. O sintoma cardinal é diarreia, que é tipicamente aguada, e acompanhada de cólicas abdominais, fadiga, náuseas e anorexia. Podem ocorrer febre e náuseas.

A diarreia tende há persistir mais tempo (mediana de 5 a 10 dias) do que a observada com outras etiologias e pode recidivar. Nos países industrializados, a maioria dos casos são adultos imunocompetentes que experimentam uma doença auto-limitada. Entre as crianças nos países em desenvolvimento, a diarreia dura frequentemente 14 dias ou mais, tornando *Cryptosporidium* uma das mais importantes causas de diarreia persistente nesta população. Diversos estudos prospectivos examinaram a complexa relação bidirecional entre desnutrição e infecção asséptica e assintomática de *Cryptosporidium* em lactentes e crianças (MORRE *et al.*, 2010).

A nutrição de forma errada soma a um fator de risco para ambas as patogenias de diarreia, causada por *Cryptosporidium*, com taxas significativamente mais elevadas de infecção em crianças subnutridas controladores ou portadores do vírus HIV (MORRE *et al.*; MANDAL *et al.*, 2012).

A cryptosporidiose ainda é um parasita pouco conhecido no âmbito da medicina, poucos médicos solicitam o exame para *Cryptosporidium*, são vários sintomas apresentados pelos pacientes. A questão que pouco se entende sobre o parasita, vários estudos estão sendo realizados para tentar entender sobre o seu mecanismo de ação e de defesa contra medicamentos e outros tratamentos alternativos. A severidade e cronicidade potencial da criptosporidiose em pacientes imunocomprometidos teve maior importância a infecção como um se tratando de um problema de saúde pública a nível mundial.

Os métodos de diagnósticos estão sendo melhorados, já existem técnicas sensíveis, mais acaba tendo um alto custo para o laboratório. Desta forma as empresas investem em técnicas de menor custo, e acabam treinando e profissionalizando os colaboradores. Para que possa ser habilitado a realizar leituras minuciosas na microscopia e identificando os *Cryptosporidium sp.*

No Brasil existem estados que ainda são carentes em saneamento básico e infraestrutura como água de mau qualidade ou contamina, alimentos contaminados e assim vários outros fatores, que através destes a população acaba ficando doentes, sendo vítima das principais doenças gastrointestinais, que são causadas pelos parasitas.

A prevenção é a melhor forma de evitar a contaminação, por isso é importante sempre frisar bem, lavar bem os alimentos, utilizar água filtrada, higienização das mãos, antes e depois de ir ao banheiro. O importante é dar uma atenção especial às pessoas portadoras do HIV, como eles são mais susceptíveis ao parasita, devido ao seu sistema de defesa, ficam mais vulneráveis.

Os *Cryptosporidium*, tradicionalmente, têm sido considerado como uma coccídea e fármacos anticoccidianos são usadas para combater o parasita. Tem sido utilizado como tratamento a claritromicina, o que ajuda a prevenir infecções micobacterianas em indivíduos imunodeprimidos, tem efeito protetor contra a criptosporidiose em pacientes com HIV, além disso, existem alternativas de tratamentos, até mesmo mais eficazes que já são comprovados como o letazuril, um derivado de acetonitrilo benzeno, este medicamento produz uma melhora clínica e elimina os oocistos. Os probióticos como os lactobacillus são utilizados como agentes terapêuticos e profiláticos para criptosporidiose.

Apesar da importância do sistema imunológico e muitas tentativas realizadas para identificar os antígenos que estimulam uma resposta imunitária protetora, não existem vacinas ou imunoterapêuticos aprovados para o tratamento ou prevenção de criptosporidiose em seres humanos e animais.

Com tudo isso acontecendo à falta de conhecimento sobre a magnitude desses problemas impõe limitações para novos tratamentos e controle do parasita. Estes diagnósticos

devem ser tratados como resultados emergentes, o quanto antes ser liberado melhor para o paciente, caso seja um portador HIV ou não, merece um tratamento correto e eficaz.

REFERÊNCIAS

ALLISON, MJ.; BERGMANT, T.; GERSZTEN, E.; Further studies on fecal parasites in antiquity. **Am. J. Clin Pathol.** v. 112, p. 605-9, 1999.

ABREU, VJS.; Avaliação da eficácia do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *C. Parvum*. São Paulo: **Faculdade de Medicina**, Universidade de São Paulo; 2001.

ALCANTARA, LM.; FERREIRA, FS.; DAL' CORTIVO, AC.; PORTUGAL, AE.; MENDONÇA-LIMA, FW.; Infecção por *Cryptosporidium* em crianças de creche de uma comunidade marisqueira em Encarnação de Salinas – BA. **J. Bras. Parasitol.** v. 94, 2001. Suplemento científico [Anais -XV Congresso Latino-Americano de Parasitologia de 7 a 11 de outubro de 2001 – São Paulo – Brasil].

AMADI, B; KELLY, P.; MWIYA, M.; MULWAZI, E.; SIANONGO, S.; CHANGWE, F.; Infecção intestinal e sistêmica, HIV e mortalidade em crianças zambianas com diarreia persistente e desnutrição. **J. Pediatr Gastroenterol Nutr.** v. 32, p. 550-554, 2001.

ARGENZIO, RA.; LIACOS, JA.; LEVY, ML.; MEUTEN, DJ.; LECCE, JG.; POWELL, DW.; atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas, a infiltração celular e a glicose - absorção de sódio em criptosporidiose entérico de porcos. **Gastroenterology** v. 98, p. 1129-1140, 1990.

BLANSHARD, C.; JACKSON, AM.; SHANSON, DC.; FRANCIS, N.; GAZZARD, BG.; Criptosporidiose em pacientes soro positivos para HIV. **Quart. J. Med.** v.85, p. 813-823, 1992.

BLACKMAN, E.; BINDER, S.; GAULTIER, C.; BENVENISTE, R.; CECILIO, M.; criptosporidiose em pacientes HIV - pacientes infectados: sensibilidade de diagnóstico do

exame das fezes, com base no número de amostras apresentadas. **Am. J. Gastroenterol.** v. 92, 451-453, 1997.

CABADA, MM.; WHITE, AC, JR.; Tratamento da criptosporidiose: sabemos o que pensamos que sabemos? **Curr Opin. Infect. Dis.** v. 23, p. 494-499, 2010.

CACCIO, SM.; POZIO E.; Advances in a Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento de Criptosporidiose. **Especialista Rev. Anti. Infec.** v. 4, p. 429-443, 2006.

CAMA, VA.; BERNE, C.; ROBERTS, J.; CABRERA, L.; STERLING, CR.; ORTEGA, Y.; *Cryptosporidium* espécies e subtipos e manifestações clínicas em crianças, **Peru. Emerg Infect Dis.** v. 14, p. 1567-1574, 2008.

CLARK, DP.; New Insights Criptosporidiose Humana. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 12, p. 554-563, 1999.

CHACIN, L-BONILLA.; ESTEVEZ, J.; F, MONSALVE.; QUIJADA, G.; Infecções diarreicas *Cyclospora cayetanensis* entre os pacientes da Venezuela. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** n. 65, p. 351-354, 2001.

CHALMERS, RM.; CAMPBELL, BM.; CROUCH, N.; CHARLETT, A.; DAVIES, AP.; Comparação da sensibilidade, diagnóstica e especificidade de ensaios, ELISA, Imunofluorescência e PCR de *Cryptosporidium* utilizados no Reino Unido. **J. Med Microbiol.** v. 60, n2 p. 1598-1604, 2011.

CHAPIN, K.; CLINICAL, MICROSCOPY.; IN: MURRAY, PR.; BARON, EJ.; TENOVER, FC.; YOLKEN, RH.; **Manual of clinical microbiology.** 6 ed. Washington (DC): ASM Press; p. 44-46, 1995.

DEL CHIERICO, F.; ONORI, M.; DI BELLA, S.; BORDI, E.; PETROSILLO, N.; MENICHELLA, D.; Casos de co-infecção por criptosporidiose em pacientes com AIDS: uma

correlação entre a apresentação clínica e linhagens de subgênero GP60 de amostras de fezes fixadas com formalina. **Ann. Trop Med Parasitol.** v. 105, p. 339-349, 2011.

DUBEY, JP.; SPEER CA.; FAYER, R.; Cryptosporidiosis of man and animals. **Boston: CRC Press;** p. 199. 1990.

DUNDG, A.; Sinusite parasitária e otite COM EM pacientes infectados ou vírus da imunodeficiência humana: relato de cinco casos ($p < 0,05$) E Revisão. **Clin. Infect. Dis.** v. 25, p. 267-272, 1997.

Disponível 02 maio de 2016 < <http://catalogohospitalar.com.br/laboratorio-alvaro-ltda-1.html> >. Acesso em 03 Maio 2017.

Disponível 24 março de 2014 em: < <http://www.jornalavozdoparana.com.br/laboratorio-alvaro-completa-46-anos-de-fundacao/> >. Acesso em 02 Maio 2017.

FARIAS EWC, GAMBA RC, PELLIZARI, VH.; Detection of Cryptosporidium spp oocysts in raw sewage creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Braz J. Microbiol.** v. 33, p. 41-3, 2002.

FAYER, R.; UNGAR, BLP.; Cryptosporidium spp. Criptosporidiose **Microbiol. Rev.** v. 50, p. 458-483, 1986.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, SJ.; Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.** v.30, p. 1305-22, 2000.

FRANCO, RMB.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO, NETO, R.; Occurrence of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo. v. 43, p. 109-11, 2001.

FAYER, R.; Cryptosporidium: Parasita Zoonótica Transmitida Pela Água. **Vet. Parasitol.** v. 126, p. 37-56, 2004.

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

FORBES, BLANSHARD, C.; GAZZARD, B.; Natural History de SIDA esclerosante relacionada colangite: **Estudo casos 20 um. Gut.** v. 34, p.116-121, 1993.

FLEMING AF. Opportunistic infections in AIDS in developed and developing countries. Trans R Soc Trop Med Hyg. n.84, p.1-6, 1990.

GARCIA, LS.; BRUCKNER, DA.; BREWER, TC.; SHIMIZU, RY.; Techniques for the recovery and identification of Cryptosporidium o from stool specimes. **J. Clin. Microbiol.** v. 18 n.5, p. 185-90, 1983.

GARCIA, LS.; BREWER, TC.; BRUCKNER, DA.; Fluorescence detection of Cryptosporidium oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. **J. Clin. Microbiol.** v. 25, p. 119-21, 1987.

GUERRANT, DI.; MOORE,SR; LIMA, AA.; PATRICK, PD.; SCHORLING, JB.; GUERRANT, RL.; Associação de diarreia infantil e criptosporidiose com deficiência de aptidão física e função cognitiva quatro sete anos mais tarde em uma comunidade urbana pobre no Nordeste do Brasil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 61 n.12, p. 707-713, 1999.

HERNANDEZ, J.; LACKNER, A.; SIM, P.; K, MUKHERJEE.; TWEARDY, DJ.; MASTRANGELO, MA.; WEINSTOCK, J.; GRIFFITHS, J.; D'SOUZA, H.; DIXIT, S.; P, ROBINSON.; A substância responsável por alterações fisiológicas tais como cloreto. Aumento a secreção de ions e má absorção de glicose em criptosporidiose. **Infect. Immun.** v. 75, p. 1137-1143, 2007.

HEALY, GR.; GARCIA, LS.; Intestinal and urogenital protozoa. In: Murray PR; Baron EJ, Tenover FC, Tenover RH. **Manual of clinical microbiology**. 6 ed. Washington (DC): ASM Press; p. 1204-28, 1995.

HUNTER, PR; NICHOL, G.; Epidemiologia e Características Clínicas da Infecção por *Cryptosporidium* em pacientes imunocomprometidos. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 15, p. 145-154, 2002.

INFORMENET- DTA. Surtos de doenças transmitidas por alimentos (tabela de 1995 a 2002). Dados Estatísticos São Paulo; 2002. DDTHA/CVE-SES/SP. Updated: set.2003
Disponível em: URL: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.

JANOFF, EM.; RELLER, LB.; Espécies *Cryptosporidium*, and Protozoário. **J. Clin.** 1987.

LAINSON, R.; SILVA, BAM.; Intestinal parasites of some diarrhoeic HIV-seropositive individuals in North Brazil, with particular reference to *Isospora belli* wenyon, 1923 and *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell, 1918. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** n. 94, p. 611-3, 1999.

LAXER, MA.; TIMBLIN, BK.; PATEL, RJ.; DNA Sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.45, p. 688-94, 1991.

LORENTE, MT.; CLAVEL, A.; VAREA, M.; OLIVEIRA, S.; CASTILHO, F.; SAHAGUM, J.; RUBIO, MC.; GOMES-LUZ, R.; Evaluation of an immunochromatographic dip-strip test for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. **J. Clin. Microbio Infect. Dis.** v. 21, p. 624-5, 2002.

LOPEZ-VELEZ, R.; R, TARAZONA.; GARCÍA, CAMACHO.; A, GOMEZ-MAMPASO.; E, GUERRERO.; A, MOREIRA.; V, VILLANUEVA, R.; Intestinal e criptosporidiose extra-intestinal em doentes com SIDA. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.14, p. 677-681, 1995.

MACKENZIE, WR.; SCHELL, WL.; BLAIR, KA.; ADDIS, DG.; PETERSON, DE.; HOXIE, NJ.; KAZMIERCZAK, JJ.; DAVIS, JP.; Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. **Clin Infect Dis.**v. 21, p. 57-62, 1995.

MAGGI, P.; LAROCCA, AM.; QUARTO, H.; SERIO,L.; BRANDONISIO, O.; ANGARANO, L.; PASTORE, L.; Efeito da terapia anti-retroviral em criptosporidiose e microsporidiose em pacientes com imunodeficiência humana infectada vírus tipo 1. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.19, p. 213-217, 2000.

MONDAL, D.; MINAK, J.; ALAM, M.; LIU, Y.; DAI J, KORPE P.; et al, Contribuição da infecção entérica, alteração da função da barreira intestinal e desnutrição materna à desnutrição infantil em Bangladesh. **Clin Infect Dis.** n. 15, p. 185-192, 2012. Os autores seguidos prospectivamente uma coorte de nascimentos de crianças nascidas em uma favela urbana em Bangladesh, a fim de examinar melhor a complexa relação entre desnutrição e infecções entéricas. Os protozoários entéricos foram encontrados para ser importantes causas de diarreia em crianças, sendo a 5 criptosporidiose patógeno mais comum isolado de fezes diarreicas.

MOORE, SR.; LIMA, NL.; SOARES, AM.; ORIA, RB.; PINKERTON, RC.; BARRETT, LJ.; Episódios prolongados de diarreia aguda reduzem o crescimento e aumentam o risco de diarreia persistente em crianças. **Gastroenterologia.** v. 139, p. 1156-1164, 2010.

MOR, SM.; TUMWINE, JK.; NDEEZI, G.; SRINIVASAN, MG.; KADDU-MULINDWA DH, TZIPORI, S.; Criptosporidiose respiratória em crianças HIV-soronegativas em Uganda: potencial para transmissão respiratória. **Clin. Infect. Dis.** v. 50 n.10, p. 1366-1372, 2010.

MORGAN, UM.; CONSTANTINE, CC.; FORBES, DA.; THOMPSON, RCA.; Differentiation between human isolates of *Cryptosporidium parvum* using r DNA sequencing and direct PCR analysis. **J. Parasitol.** v. 83, p. 825-30, 1997.

MCDONALD, V.; BANCROFT GJ.; Controle imunológico da infecção por *Cryptosporidium*. **Chem. Immunol.** v.70, p. 103-123, 1998.

MCDONALD, V.; RC, POLLOK.; DHALIWAL, W.; S, NAIK.; FARTHING, MJ.; Um papel potencial para a interleucina-18 no desenvolvimento de inibição de *Cryptosporidium parvum* Bajaj-Elliott M. **Clin. Exp. Immunol.** v.145, p. 555-562, 2006.

NAÇÕES U. NOVA IORQUE: NAÇÕES UNIDAS; 2011. [citado 2011 17 de maio].

Disponível:[http://unstats.un.org/unsd/mdg/Resources/Static/Products/Progress2011/11-31339%20\(E\) % 20MDG %20Report % 202011_Book % 20LR.pdf](http://unstats.un.org/unsd/mdg/Resources/Static/Products/Progress2011/11-31339%20(E)%20MDG%20Report%202011_Book%20LR.pdf).

NAVIN, TR.; JURANEK, DD.; Criptosporidiose: Clínica, epidemiológico, e avaliação parasitológica. **Rev. Infect. Dis.** v.6, p. 313-327, 1984.

NIME, FA.; BUREK, JD.; PAGE, DL.; HOLSCHEER, MA.; YARDLEY, JH.; Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**. v.70, p. 8-592, 1996.

O'HARA, SP.; PEQUENO, AJ.; NELSON, JB.; BADLEY, AD.; CHEN, XM.; GORES, GJ.; LARUSSO, NF.; A imunodeficiência humana do tipo 1 do vírus da proteína tat Melhora *Cryptosporidium parvum* apoptose induzida pôr em cholangiocytes via mecanismo dependente do ligando Fas . **Infect. Immun.** n. 75, p. 684-696, 2007.

PARTE-PÉREZ, M.; BRITO, A.; Frequência de pacientes com adultos *Cryptosporidium* em ou Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e síndrome de diarreia. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.** v.24, p. 4-9, 2004.

PIENIAZEK, NJ.; BORNAY-LLINARES, FJ.; SLEMENDA, SB, Da Silva.; AJ, MOURA.; INS, ARROWOOD.; MJ, DITRICH.; O, ADDISS, DG.; New *Cryptosporidium* genotypes in HIV- infected persons. **Emerg. Infect. Dis.** n. 5, p. 444-9, 1999.

PERCH, M.; SODERMANN, M.; JAKOBSEN, MS.; VALENTINER-BRANTH, P.; STEINSLAND, H.; FISCHER, TK.; LOPES, DD.; AABY, P.; MOLBAK, K.; seven years' experience with *Cryptosporidium parvum* in Guinea-Bissau, West Africa. **Ann. Trop. Pediatra.** n. 21, p. 313-8, 2001.

KONEMAN, EW.; ALLEN, SD.; DOWELL, VR, JR.; SOMMERS, HM.; Diagnostico microbiológico texto e atlas colorido. **Médica Panamericana.** 2a ed. São Paulo: p. 13, 1989.

KHUYSEN, PC.; CHAPPELL, CL.; Determinantes de Virulência *Cryptosporidium* - **Int. J. Parasitol.** v. 32, p. 517-525, 2002.

RODRIGUES, JL.; LESER, P.; SILVA, TM.; SANTOS, MI.; DALBONI, MA.; ACCETURI, CA.; CASTELO-FILHO, A.; Prevalência de criptosporidiose na Síndrome diarreica do paciente HIV positivo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** n. 37, p. 79-84, 1991.

RUSH, BA.; CHAPMAN, PA.; INESON, RW.; A probable waterborne outbreak of cryptosporidiosis in the Sheffield area. **J. Med. Microbiol.** v. 32, p. 239-42, 1990.

RYAN, UM.; POWER, M.; XIAO, L.; *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **J. Eukaryot. Microbiol.** v.55, p. 22- 26, 2008.

RIGGS, MW.; Os recentes avanços na criptosporidiose: a resposta imune. **Micróbios Infect.** v.4, p. 1067-1080, 2002.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A.; Giardia and *Cryptosporidium* join the Neglected Diseases Initiative. **Trends Parasitol.** n. 22, p. 203-208, 2006.

SULAIMAN, IM.; XIAO, L.; YANG, C.; ESCALANTE, L.; MOORE, A.; BEARD, CB.; ARROWOOD, MJ.; LAL, AA.; Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerg Infect. Dis.** n. 4, p. 681-5, 1998.

SMITH, H.V., CACCIÓ, S.M., COOK, N, NICHOLS, R.A.B., TAIT A.; *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Vet .Parasitol**, v.149, p. 29-40, 2007.

TYZZER, EE. A.; Sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 5, p. 12-3, 1907.

THOMPSON, RC.; ME, OLSON.; ZHU, L.; ENOMOTO, S.; ABRAHAMSEN, MS.; HIJJAWI, NS.; Criptosporidiose *Cryptosporidium* e. **Adv. Parasitol.** n. 59, p. 77-158, 2005.

THEODOS, CM.; Inata e celulares - respostas imunes mediadas para o *Cryptosporidium parvum*. **Adv. Parasitol.** v. 40, p. 121-149, 1998.

UPTON, SJ.; FAYER, R.; MORGAN, U.; Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.** v. 30, p. 1305-22, 2000.

VANDENBERG, O.; ROBBERECHT, F.; DAUBY, N.; MOENS, C. TALABANI, H.; DUPONT, E.; Gestão de um surto de *Cryptosporidium hominis* numa creche. **Pediatr Infect Dis J.** v.1 p. 10-15, 2012.

XIAO, L.; MORGAN UM, LIMOR J.; ESCALANTE, A, ARROWOOD, M.; SHULAW, W, THOMPSON, RCA.; FAYER, R.; LAL, AA.; Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Appl Environ Microbiol.** v. 65, p. 3386-91, 1999.

XIAO, L.; R FAYER.; RYAN, U.; UPTON, SJ.; Cryptosporidium taxonomia: Avanços recentes e implicações para a saúde pública. **Clin. Microbiol. Apocalypse** v. 17, p. 72-97, 2004.

XIAO, L.; FAYER, R.; Molecular characterization of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. **Int. J. Parasitol** v. 38, p. 1239-1255, 2008.

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

WANG, R.; ZHANG, L.; FENG, Y.; NING, C.; JIAN, F.; XIAO, L.; ZHAO, J.; WANG, Y.; Molecular characterization of a new genotype of Cryptosporidium from American minks (Mustela vison) in China. **Vet. Parasitol**, v. 154, p. 162-166, 2008.

WEBER, R.; BRYAN, RT.; BISPO, HS.; WAHLQUIST, SP.; SULLIVAN, JJ.; JURANEK DD.; Limiar de detecção de oocistos de Cryptosporidium em amostras de fezes humanas: evidência de baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos atuais. **J. Clin. Microbiol.** v.29 n.10, p. 1323-1327, 1991.

YODER, JS.; HARRAL, C.; PRAIA, MJ. Vigilância da criptosporidiose - Estados Unidos, 2006-2008. **MMWR Surveill Summ.** v. 6, p.1-14, 2010.

Comparação entre os Métodos de Kinyoun e Ziehl-Neelsen (Modificado) para Pesquisa de *Cryptosporidium sp* em um Laboratório da Região Oeste do Estado do Paraná

Adriano Nunes Rezende¹, Maria das Graças Marciano Hirata Takizawa² & Luciano Gustavo Savitzki de Carvalho³

- 1- Discente do Curso de Farmácia, Centro Universitário da Faculdade Assis Gurgacz – FAG; e-mail: rezendeadrianonunesrezende@gmail.com
- 2- Docente do Curso de Farmácia, Centro Universitário da Faculdade Assis Gurgacz – FAG; e-mail: mgtakizawa@fag.edu.br
- 3- Farmacêutico formado pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste e responsável técnico de um laboratório da Região Oeste do Estado do Paraná; e-mail: lgse1972@yahoo.com.br

RESUMO

O *Cryptosporidium sp* pertence ao grupo Apicomplexa e à subclasse Coccidiasina, sendo um agente causador de diarreia (SUNNOTEL *et al.*, 2006; LEITCH; HE, 2012). Para o diagnóstico de *Cryptosporidium sp*, utilizam-se diferentes técnicas de coloração, Ziehl-Neelsen modificado, Kinyoun, e outros (HEALY *et al.*, 1995). Objetivo: O objetivo do trabalho foi comparar as técnicas entre as colorações de Kinyoun e Ziehl-Neelsen modificados em amostras obtidas de um laboratório da Região Oeste do Estado do Paraná. Materiais e Métodos: Foram utilizados para a pesquisa (n=250) amostras de diversos Estados do Brasil. No preparo das amostras, utilizou o método de Ritchie. Com o sedimento formado, confeccionaram-se as lâminas e realizaram-se as colorações de Kinyoun e Ziehl-Neelsen modificados. Resultados/Discussão: Os resultados apresentados foram que as colorações são potencialmente iguais. Identificou-se *Microsporidium sp* na coloração de Kinyoun. Discussão: Comparou-se o presente trabalho com outras pesquisas realizadas e com outros métodos, como o de Elisa, Imunoflorescência Direta, PCR e coloração de Kinyoun. Ao final, pode-se avaliar que a coloração de Kinyoun foi equivalente ao método imunoenzimático de Elisa. Quanto aos outros métodos, pode-se dizer que falta aprimoramento e mais estudos para o diagnóstico de criptosporidiose. Conclusão: Conclui-se que as colorações de Kinyoun e Ziehl-Neelsen modificados são iguais, no entanto, a coloração de Kinyoun se mostrou mais específica para *Cryptosporidium sp*.

Palavras-chave: Técnicas Laboratoriais, Coccídeos, *Cryptosporidium sp*

Comparison between the Kinyoun Method and the Ziehl-Neelsen (Modified) Method for *Cryptosporidium sp* Research in a Laboratory of the Western Region of the State of Paraná

ABSTRACT

Cryptosporidium sp belongs to the Apicomplexa group and to the subclass Coccidiasina, thus being a causative agent of diarrhea (SUNNOTEL et al., 2006; LEITCH; HE, 2012). For the diagnosis of *Cryptosporidium sp*, different stain techniques, Ziehl-Neelsen modified, Kinyoun, and others (HEALY et al, 1995) are used. Objective: The objective of this study was to compare the techniques between Kinyoun and Ziehl-Neelsen modified stains in samples obtained from a laboratory in the Western Region of the State of Paraná. Materials and Methods: Samples from several Brazilian States were used for the research (n = 250). In the preparation of the samples, the Ritchie method was used. With the sediment formed, the slides were prepared and Kinyoun and Ziehl-Neelsen modified stains were made. Results/Discussion: The results presented were that both stains are potentially the same. *Microsporidium sp* was identified in Kinyoun stain. Discussion: The present study was compared with other carried out studies and with other methods, such as Elisa, Direct Immunofluorescence, PCR and Kinyoun stain. At the end, it can be evaluated that Kinyoun stain was equivalent to enzyme immunoassay method Elisa. As for the other methods, it can be said that there is a lack of enhancement and more studies are needed for the diagnosis of cryptosporidiosis. Conclusion: It is concluded that the Kinyoun and Ziehl-Neelsen modified stains are the same, however, the Kinyoun stain has shown to be more specific for *Cryptosporidium sp*.

Keywords: Laboratory Techniques, Coccidia, *Cryptosporidium sp*

INTRODUÇÃO

O *Cryptosporidium* sp é um protozoário parasito intracelular obrigatório, extracitoplasmático, que se desenvolve preferencialmente nas microvilosidades de células epiteliais do trato gastrointestinal. Pertence ao grupo Apicomplexa e à subclasse Coccidiasina. Isolado das glândulas gástricas de camundongos assintomáticos, tem papel de agente causal de diarreia. É um parasito considerado monóxeno, identificado em várias espécies de animais, como bovinos, suínos, ovinos, animais domésticos e silvestres (SUNNOTEL et al., 2006; LEITCH & HE, 2012).

Os primeiros dois casos de criptosporidiose em humanos foram relatados em 1976. A partir de 1982, vários casos humanos foram relatados em pacientes imunocomprometidos, sendo que o número de relatos aumentou significativamente devido ao reconhecimento da sua gravidade em pacientes com AIDS. A criptosporidiose, antes considerada uma zoonose, passou a ser considerada uma antroponose.

A prevalência global das criptosporidiose em indivíduos infectados com HIV, com ou sem diarreia, não é totalmente conhecida. Aparentemente, é menos frequente em pacientes assintomáticos. A ampla distribuição de infecção em pessoas com AIDS apareceu pela primeira vez nos Estados Unidos. Mais tarde, foi relatado que 3,6% dos 19.817 pacientes tinham infecção com uma taxa de mortalidade de 61% (FAYER, 2004).

No histórico das espécies de *Cryptosporidium* que contaminam várias partes do mundo, cinco espécies são responsáveis pela maioria das infecções, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto imunocomprometidos. São elas: *C. hominis*; *C. parvum*; *C. melagridis*; *C. felis*; e *C. canis*. Ocasionalmente, outras poucas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* são encontrados em humanos, como *C. muris*, *C. suis*, e *C. andersoni* (XIAO & FENG, 2008).

Os oocistos medem de 4 a 6µm de diâmetro e são esporulados, contendo 4 esporozoítos. São eliminados nas fezes frescas e, possivelmente, por outras vias, como por meio das secreções respiratórias. Após ingestão ou possível inalação, os esporozoítos são liberados e migram para as células epiteliais do trato gastrointestinal e trato respiratório. Os esporozoítos sofrem reprodução sexuada dentro das células.

O modo de transmissão é fecal-oral, por meio do contato animal-humano, ou humano-humano. A infecção pode ocorrer pela ingestão de alimentos e água contaminada com fezes de seres humanos e/ou animais infectados com esporozoítos, podendo se desenvolver e amadurecer em um período médio de 12 a 14 horas. Há inclusive a possibilidade de infecção por meio do ar contaminado com oocistos ou mesmo durante a relação sexual (UPTON, FAYER & MORGAN, 2000; BORAD & WARD, 2010).

O diagnóstico para criptosporidiose era realizado por biópsia do intestino delgado, mas atualmente esse procedimento não é mais realizado, pois, além de ser invasivo, necessita de uma grande quantidade de material para identificar os organismos na borda das microvilosidades do segmento intestinal comprometido pelo parasita (GARCIA et al., 1983).

Com os novos métodos, o diagnóstico foi facilitado com a análise parasitológica das fezes, pela demonstração dos oocistos de *Cryptosporidium sp*, utilizando-se métodos de concentração, baseados em princípios de flutuação, sedimentação espontânea e centrífugo-sedimentação. Para visualização dos oocistos, foram empregadas diferentes técnicas de coloração baseadas nas propriedades de álcool-ácido resistência dos oocistos, com corantes derivados da fucsina carbólica, como as colorações de Ziehl-Neelsen modificadas, Kinyoun modificado, e coloração fluorescente, como a Auramina e outros (HEALY & GARCIA, 1995). Nas colorações de Ziehl-Neelsen e Kinyoun, o propósito da coloração é destacar os *Cryptosporidium sp* em tons de rosa claro/vermelho (CHALMERS et al., 2011).

Como existem varias técnicas diferentes para a pesquisa de *Cryptosporidium sp* em fezes humanas, ainda não se sabe dizer qual é a melhor técnica. Isso ocorre pelo fato de existirem vários interferentes durante as análises laboratoriais. Portanto, pretende-se comparar a utilização da coloração de Kinyoun modificado e Zihel-Neelsen modificado para pesquisa de *Cryptosporidium sp* em um laboratório da cidade de Cascavel, na Região Oeste do Estado do Paraná.

Após comparar a melhor técnica a ser adotada, será possível obter laudos fidedignos e com maior segurança para que os pacientes iniciem o tratamento, principalmente para os pacientes que são HIV positivos, visto que, para eles, o tratamento é mais complexo e quanto antes receberem o tratamento, melhor para sua saúde.

As amostras de fezes foram selecionadas aleatoriamente de um laboratório da Região Oeste do Paraná, no período de junho a setembro do ano de 2017, sendo de gêneros diferentes e provenientes de diversos Estados do Brasil.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi comparar as técnicas entre as colorações de Kinyoun e Ziehl-Neelsen modificadas, em amostras obtidas de um laboratório da Região Oeste do estado do Paraná.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética, por se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos ou material biológico deles proveniente. Após aprovação do Comitê, pelo protocolo 067304/2017 e CAAE 69984017.0.0000.5219, com a data de aprovação em 30/06/2017m iniciaram-se as pesquisas.

O método aplicado para o estudo foi o descritivo transversal qualitativo da prevalência de *Cryptosporidium sp* nas amostras recebidas pelo laboratório. O estudo foi

realizado utilizando-se (n=250) amostras fecais, provenientes de laboratórios parceiros de diversos Estados do Brasil, os quais enviaram as amostras para pesquisa de *Cryptosporidium* sp a um laboratório da Região Oeste do Estado do Paraná, localizado na cidade Cascavel. As amostras foram preparadas por método de concentração Ritchie (centrífugo-sedimentação) e, na sequência, foram realizadas as colorações de Ziehl-Neelsen e Kinyoun modificados.

Método Parasitológico

As amostras foram transportadas em caixas de isopor com temperatura entre 2°C a 8°C em potes identificados, com nome do paciente, idade e gênero. Depois da conferência da temperatura, gerou-se um mapa de trabalho para manter uma ordem das amostras e não haver problemas de troca de material.

De acordo com Vallada (1988), o método de Ritchie consiste em retirar entre 1g e 2g de material fecal, colocar em copos descartáveis com o auxílio de palito de madeira, fazer uma suspensão com 8mL de formaldeído 6%, homogeneizar e, logo em seguida, adicionar 4mL de éter etílico e centrifugar por 1minuto a 1500rpm. Então, deve-se descartar o sobrenadante, restando o sedimento para análise. Com um auxílio de uma pipeta Pasteur, aspirou-se um volume de 0,5mL do sedimento e fez-se um esfregaço em quatro lâminas, sendo duas lâminas para cada coloração, de modo que as análises foram realizadas em duplicatas. Assim que as lâminas secaram em temperatura ambiente, elas foram submetidas às colorações.

Método de Coloração de Ziehl-Neelsen Modificado

Na coloração de Ziehl-Neelsen, foi utilizado o kit comercial da Newprov® para realizar as pesquisas de *Cryptosporidium* sp. Esse método de coloração consiste em cobrir a

lâmina com fucsina Ziehl, aquecer durante cinco minutos, mantendo a emissão de vapores, sem deixar ferver, lavar com água corrente, descorar com álcool ácido por 1 minuto, lavar com água corrente, cobrir o esfregaço com azul de metileno por um minuto e, por último, lavar com água corrente seguindo as especificações do fabricante, conforme o protocolo. Seguem as composições de cada solução da coloração Ziehl-Neelsen: a) fucsina básica de 10g/L; fenol fundido 50ml/L e álcool etílico 100ml/L; b) para produção do álcool ácido é utilizado o ácido clorídrico 30ml/L com álcool etílico 970ml/L; c) azul de metileno utiliza metileno 3g/L com fenol fundido 50 ml/L e álcool etílico 100ml/L. Destaca-se que todas as composições são de acordo com o fabricante.

As colorações foram realizadas em todas as amostras, sendo duas lâminas coradas por paciente. Depois do término da coloração, as lâminas foram observadas em microscópicos da marca Nikon Eclipse 2000, utilizando objetiva de 100x com aumento de 1000x, e utilizando óleo de imersão para melhorar a visualização.

Método de Coloração de Kinyoun Modificado

Para a coloração de Kinyoun, utilizou-se kit produzido no próprio laboratório, seguindo Procedimento Operacional Padronizado (POP) da área de produção de reagentes. O método de coloração de Kinyoun consiste em cobrir o esfregaço com fucsina de Kinyoun por 30 minutos, lavar em água corrente, gotejar com solução de álcool ácido sobre o esfregaço, até que o álcool saia incolor (5 a 10 segundos), lavar em água corrente, cobrir o esfregaço com azul de metileno por 1 minuto, lavar em água corrente e esperar secar. O processo foi realizado seguindo-se as especificações da área de produção de reagentes do laboratório.

A composição da coloração segue o protocolo descrito a seguir: a) fucsina carbólica de Kinyoun, constituída de 4g/L de fucsina básica, 8g/L de cristais de fenol,

20mL/L de álcool etílico a 95% e 100mL/L de água destilada; b) solução de álcool ácido sulfúrico 5%; c) solução aquosa de azul de metileno 1%. Ressalta-se que todas as composições estão de acordo com área de produção de reagentes.

As colorações foram realizadas em todas as amostras, sendo duas lâminas coradas por paciente. Depois do término da coloração, as lâminas foram observadas em microscópios da marca Nikon Eclipse 2000, utilizando objetiva de 100x com aumento de 1000x, e utilizando óleo de imersão para melhorar a visualização.

Método Estatístico

Para comparação das técnicas de coloração e de gênero, utilizou-se o teste não paramétrico (binomial para duas proporções), com nível de significância de 5% (Programa Bioestat – versão 5.3).

RESULTADOS

Na Tabela 1, abaixo, são demonstrados resultados potencialmente iguais. Foram analisadas 250 amostras parasitológicas. O resultado apresentado foi: 19 amostras positivas para Kinyoun e 11 amostras positivas para Ziehl-Neelsen. Estatisticamente, o P(valor) ficou acima de 0,05, ou seja, $p < 0,05$. Utilizou-se o programa Bioestat - versão 5.3.

Tabela 1 – Frequência de gêneros positivos para *Cryptosporidium sp* dependente das comparações entre as técnicas de coloração Kinyoun e Ziehl-Neelsen modificados, atendidas pelo laboratório de Cascavel-PR no período de julho a setembro de 2017.

Técnicas	Pacientes (n)	Positivo	%	P (valor)
Kinyoun	250	19	7,60	0,0660
Ziehl-Neelsen	250	11	4,46	
Total	500	30	6,00	

Estatisticamente significativo $p < 0,05$

Na Tabela 2, a seguir, os resultados demonstrados referem-se às amostras negativas para *Cryptosporidium sp* e positivas para *Microsporidium sp*, nas diferentes técnicas utilizadas na pesquisa. Foi identificado um total de 11 amostras positivas para *Microsporidium sp*, sendo 8 amostras pelo método de coloração de Kinyoun modificado e 3 amostras pelo método de Ziehl-Neelsen modificado.

Tabela 2 – Frequência de gêneros positivos para *Microsporidium sp* quantos às comparações entre as técnicas de coloração Kinyoun e Ziehl-Neelsen modificadas, atendidos pelo laboratório de Cascavel-PR no período de julho a setembro de 2017.

Técnicas	Pacientes (n)	Positivo	%	P (valor)
Kinyoun modificado	250	8	7,60	0,0637
Ziehl-Neelsen	250	3	4,46	
Total	500	11	2,20	

Estatisticamente significativo $p < 0.05$

Na Tabela 3, adiante, os resultados mostrados são de quantidades de amostras que foram negativas e positivas para diferentes gêneros. O resultado do P(valor) ficou acima do significativo do $p < 0,05$. Esta proporção significa que é potencialmente igual, não havendo diferenças entre os gêneros.

Tabela 3 – Frequência de gêneros positivos para *Cryptosporidium sp* independentes em relação às técnicas de coloração Kinyoun e Ziehl-Neelsen modificados, atendidos pelo laboratório de Cascavel-PR no período de julho a setembro de 2017.

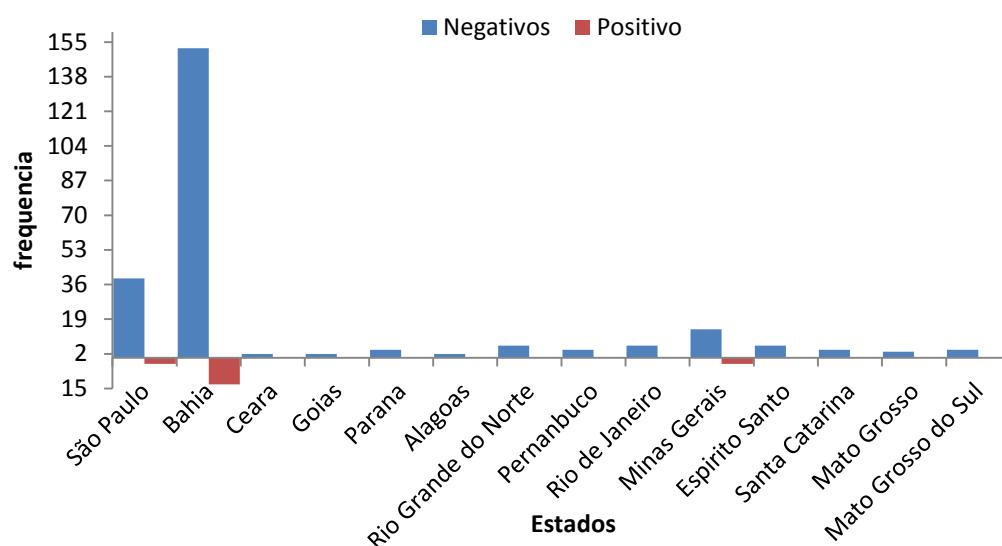
Gêneros	Pacientes (n)	Positivo	%	P (valor)
Masculino	139	13	9,35	0,1210
Feminino	111	6	5,40	
Total	250	19	7.60	

Estatisticamente significativo $p < 0.05$

O Gráfico 1, abaixo, demonstra a distribuição entre os diversos Estados brasileiros com pacientes positivos e negativos para *Cryptosporidium sp*. Os Estados com maiores

índices de positividade de *Cryptosporidium sp* foram: Bahia (BA), com 13 casos, sendo 9 masculinos e 4 femininos; Minas Gerais (MG), com 3 casos, sendo 2 masculinos e 1 feminino; e São Paulo (SP), também com 3 casos, sendo 1 masculino e 2 femininos.

Gráfico 1 – Frequência de pacientes positivos e negativos para *Cryptosporidium sp* em diversos Estados do Brasil.



DISCUSSÃO

Ainda existem muitos laboratórios que realizam o diagnóstico da criptosporidiose por método de identificação morfológica, utilizando diferentes técnicas, algumas delas confirmatórias para o parasito. Neste trabalho, foram utilizadas duas metodologias diferentes de coloração para identificar *Cryptosporidium sp*, sendo a coloração de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen modificados. Utilizou-se o sedimento das amostras que foram preparadas pelo método de Ritchie (sedimentação por centrifugação). Depois de confeccionar as lâminas, elas foram submetidas às colorações e fez-se a leitura com microscopia, utilizando-se o microscópio Nikon Eclipse 2000, com objetiva de 100X.

Para um mesmo paciente, foram coradas lâminas utilizando-se a coloração de Ziehl-Neelsen modificado, e as mesmas lâminas foram coradas com a coloração de Kinyoun modificado. Alguns pacientes apresentaram resultados positivos para a coloração Kinyoun modificado e negativos para a Ziehl-Neelsen modificado.

De acordo com os autores Martinez, Belda & Neto (2001), estudos realizados com a coloração de Kinyoun mostram que o método é adequado para detectar oocistos de *Cryptosporidium sp* em amostras fecais, apresenta relativa facilidade no preparo dos reagentes e corantes, e na realização da técnica de concentração pelo formol éter, além de exigir apenas equipamentos já existentes na maioria dos laboratórios que realizam o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. A metodologia de coloração de Kinyoun foi comparada com a coloração de Auramina, que é um método de detecção de oocistos por fluorescência, de modo que, quando observado no microscópico fluorescente, o oocisto apresenta coloração verde. Esta técnica permite rastrear os oocistos na objetiva de 40x.

Os autores ainda relatam que a técnica de Auramina é utilizada como um método de triagem, sendo que o método confirmatório para identificar *Cryptosporidium sp* ainda continua sendo a técnica de Kinyoun. Na técnica de Auramina, as leveduras e outras partículas podem também apresentar fluorescência, assim, confundido-se com *Cryptosporidium sp*.

Os métodos de coloração Auramina, Kinyoun modificado e Ziehl-Neelsen modificado podem ter baixa sensibilidade em amostras contaminadas com grande quantidade de leveduras ou baixa concentração de oocistos nas fezes. Isso torna necessária a presença de um profissional experiente e treinado, para a identificação dos parasitas. Essas observações são apontadas por autores como DOING et al. (1999) e Fayer, Morgan & Upton (2000).

Segundo os autores Martinez, Belda & Neto (2001), frente às dificuldades no procedimento de coloração de Kinyoun, que desfavorecia a identificação dos

Cryptosporidium sp, tornando-a uma técnica menos utilizada, após estudos e modificações e alterações, foi aperfeiçoada a técnica de coloração de Kinyoun para se ter um maior contraste vibrante na visualização dos oocistos, tornando-os mais perceptíveis à microscopia.

De acordo com a Tabela 1, apresentada acima, observou-se, após a avaliação estatística, que as colorações são potencialmente iguais, não ocorrendo diferenças entre elas.

Neste trabalho, outros métodos utilizados para identificar *Cryptosporidium sp*, tais como o método de Elisa, Imunofluorescência Direta (IFD) e PCR, foram comparados com a coloração de Kinyoun.

Comparando-se o método de Elisa com o método de Kinyoun, foram identificadas 15 amostras positivas de pacientes imunocomprometidos (AIDS) utilizando-se o método Kinyoun modificado, as mesmas amostras foram repetidas no método de Elisa. O método de Elisa tem sensibilidade de 86,7% e foi considerado referência em estudos de avaliação de novos métodos de diagnósticos. Os resultados apresentados pelo método de Elisa foram 13 amostras positivas e 2 amostras negativas para *Cryptosporidium sp*. Os autores Ignatius et al. (1997) relatam que esta discordância poderia sugerir resultados falsos negativos no teste imunoenzimático, advindos, talvez, de alguns fatores de interferência, como a presença de inibidores, a baixa concentração de oocistos, a variação antigênica entre espécies e outros.

Analisando-se a comparação entre os métodos, a coloração de Kinyoun pelo método morfológico teve ótimo desempenho quando comparado com o método de Elisa, apesar de que o método de Elisa para fins de diagnóstico de *Cryptosporidium sp* ainda é pouco utilizado em laboratórios. Isso é decorrente do alto custo desta técnica, o que acaba encarecendo o exame e, por isso, vários laboratórios adotam métodos mais em conta. Na comparação entre os métodos, ainda pode-se dizer que o método de Kinyoun pode ser utilizado no diagnóstico de criptosporidiose.

Os trabalhos com Imunofluorescência Direta (IFD) utilizam anticorpos monoclonais específicos para o *Cryptosporidium parvum*. Quando avaliada por diferentes pesquisadores, apresenta resultados mais sensíveis e específicos em relação aos métodos já citados (GARCIA & SHIMIZU, 1997). Ainda, as técnicas de Imunofluorescência Direta (IFD) utilizam anticorpo específico para identificar a espécie. No presente trabalho, as amostras utilizadas foram para pesquisa de *Cryptosporidium sp*, não se identificando a espécie.

De acordo com os autores Garcia & Shimizu (1997), o método de Imunofluorescência Direta (IFD) apresenta problemas na identificação de oocistos, pois quando estes se desintegram há redução do número de parasitas. Isso pode afetar negativamente a sensibilidade do teste, podendo apresentar resultado falso negativo. Contudo, os autores ainda destacam a rapidez com que o teste é efetuado, o que o torna extremamente útil nos casos graves de diarreia em pacientes com AIDS.

As mesmas amostras positivas utilizadas no método de Elisa foram utilizadas no método de Imunofluorescência Direta (IFD). A comparação foi feita entre as técnicas de Imunofluorescência Direta (IFD) e Kinyoun. As 15 amostras positivas de pacientes imunocomprometidos (AIDS) foram identificadas pelo método de coloração de Kinyoun, e as mesmas amostras foram repetidas pelo método de Imunofluorescência Direta (IFD). O resultado apresentado pelo método de Imunofluorescência Direta (IFD) foi de 3 amostras reagentes para *Cryptosporidium parvum*, e as demais amostras foram não reagentes.

Relacionando-se os resultados de outros trabalhos realizados, citados nos parágrafos acima, e obtendo-se a comparação entre os métodos, pode-se dizer que o método de Kinyoun se sobressaiu entre os métodos comparados. No presente trabalho, a Tabela 2 demonstrou que o método de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen modificado identificaram tanto *Cryptosporidium sp* quanto *Microsporidium sp*, que pertencem à família dos coccídeos.

Ainda, o método de Kinyoun identificou 8 amostras positivas para *Microsporidium sp*, enquanto que a coloração de Ziehl-Neelsen modificada identificou apenas 3 amostras. De certa forma o método de Kinyoun modificado é para identificar *Cryptosporidium sp* o resultado foi negativo, porém conseguiu identificar *Microsporidium sp* com esse resultado é possível que seja descrito no laudo. Isso porque os sintomas que o *Cryptosporidium sp* apresenta no paciente são os mesmo sintomas apresentados pelo *Microsporidium sp*. Assim, com o resultado em mãos, o médico pode iniciar o tratamento o quanto antes, já que os tratamentos são iguais. Portanto, pode-se dizer que os métodos de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen modificado são potencialmente iguais para identificar os coccídeos.

O trabalho em discussão teve o interesse de comparar as técnicas, e não de identificar as espécies de coccídeos. Observou-se que método de Imunofluorescência Direta (IFD) se torna mais caro para laboratório, ficando inviável utilizá-lo para diagnóstico de *Cryptosporidium sp*, já que o importante é dizer se o resultado é positivo ou negativo para cryptosporidiose.

No mesmo trabalho em que foram comparados os métodos Imunoenzimático de Elisa, Imunofluorescência Direta (IFD) e coloração de Kinyoun, também aplicou um último método, no qual foi Reação em Polimerase por Cadeia (PCR), o qual utiliza diferentes protocolos para detectar oocistos de *Cryptosporidium sp* em amostras fecais.

Apesar do método molecular – Reação em Polimerase por Cadeia (PCR) – apresentar alta sensibilidade e especificidade, sua eficiência diagnóstica depende das técnicas de extração do DNA e dos oligonucleotídeos a serem utilizados como *primers*, para amplificação de fragmentos de DNA selecionados como alvo nos diferentes protocolos de PCR (ORLANDI & LAMPEL, 2000).

Algumas variações da técnica, como Nested-PCR, foram capazes de detectar cerca de 500 oocistos de *Cryptosporidium parvum* por grama de fezes, representando uma

sensibilidade 100 vezes maior em relação às técnicas de Imunofluorescência Direta, Elisa e Kinyoun (BALATBAT et al., 1996; PEDRAZA-DIAS et al., 2001).

O método adotado para identificar os *Cryptosporidium parvum* foi o PCR-FAST-DNA e o par de *primes* CRY-9/CRY-15, o que permitiu maior sensibilidade e reprodutibilidade de resultados do método molecular aplicado ao diagnóstico da criptosporidiose (PEDRAZA-DIAS et al., 2001).

Na técnica de PCR foram utilizadas 15 amostras positivas de *Cryptosporidium sp*, que foram as mesmas utilizadas nos outros métodos já citados. Utilizaram-se 14 amostras negativas, que foram realizadas no método imunoenzimático (Elisa) e no método de coloração de Kinyoun. A técnica de PCR possibilitou o encontro de cinco amostras positivas, restando 9 amostras negativas pelos métodos de Kinyoun e Elisa. Entretanto, 4 amostras positivas pelos métodos de Kinyoun, Elisa e IFD apresentaram resultados negativos por PCR-FAST-DAN, assim, obtendo-se 11 amostras positivas no total.

Outros autores observaram que resultados negativos obtidos por método molecular, em amostras positivas no método morfológico, podem ter diferentes fatores de interferência durante análise, dentre eles, a baixa concentração de oocistos, a condição inadequada de armazenagem e a conservação das amostras podem gerar grande quantidade de substâncias inibidoras de PCR em material fecal, assim provocando falhas na extração (SILVA et al., 1999; ORLANDI & LAMPEL, 2000; PEDRAZA-DIAS et al., 2001).

Neste trabalho, não se utilizou o método molecular devido ao seu custo elevado e por não haver local adequado para realizar as análises. De acordo com o trabalho citado acima, na comparação entre os métodos, ainda se utilizam os métodos mais simples, quais sejam, as colorações de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen modificadas, pela facilidade de trabalhar e agilidade na entrega dos resultados.

O método molecular, sem dúvidas, é ótimo, pois tem alta sensibilidade e especificidade. Mas também possui grandes desvantagens, visto que, durante o seu processo de análise, como citado pelos autores, há interferentes e problemas na extração do DNA. Logo, o método molecular ainda precisa ser mais estudado, aperfeiçoado e testado para fins de diagnóstico de criptosporidiose.

No Gráfico 1, apresentado, mostra-se o número de casos positivos para *Cryptosporidium sp*, observando-se maior prevalência no Estado da Bahia, com 13 casos positivos. Destaca-se que foi realizada pesquisa para identificar a prevalência de *Cryptosporidium sp* e *Giardia lamblia* no Estado Bahia, no município de Itabuna, no ano de 2013, com 468 crianças de gêneros diferentes, na faixa etária de 0-6 anos, que estudavam em creches/pré-escolas da zona urbana do município. Na ocasião, foram realizados exames parasitológicos com consentimento dos pais ou responsáveis pelas crianças. O método utilizado foi o de Ziehl-Neelsen modificado para identificar os *Cryptosporidium sp*, e para identificar a *Giardia lamblia* utilizaram-se os métodos de Ritchie (sedimentação por centrifugação) e lugol 2%. No resultado final da pesquisa, mostrou-se que não existe diferença entre gêneros, já que houve o mesmo percentual de positivos, de modo que os dados corroboram os apresentados na Tabela 3 deste trabalho, a qual também demonstrou não existir diferença significativa entre os gêneros.

No resultado parasitológico, foram identificadas 321 crianças com parasitas, correspondendo a 80,8% das crianças estudadas, sendo 183 positivas para *Cryptosporidium sp* e 138 positivas para *Giardia lamblia*. Alguns estudos precedentes afirmam que há influência significativa da condição social na saúde dos filhos, como, por exemplo, renda familiar, falta de saneamento básico, localidade de moradia, qualidade da água, creches e escolas lotadas, entre outros fatores (CARVALHO-ALMEIDA et al., 2006).

O trabalho teve como foco principal realizar as comparações entre as metodologias e verificar qual seria a melhor delas. Mas, no decorrer da pesquisa, identificaram-se outras pesquisas que poderiam ser feitas. Vale ressaltar que o interessante foi o trabalho de comparação e identificação. Com relação à importância do *Cryptosporidium sp* como um dos possíveis agentes patogênicos a serem pesquisados em situações de diarreia, observa-se que ainda existe resistência por parte dos clínicos e demais profissionais da saúde, os quais deixam sem investigação casos de criptosporidiose e mesmo surtos de diarreia por este patógeno.

Por isso, é necessário investigar mais casos de diarreia em crianças menores de 5 anos de idade. O diagnóstico laboratorial, além de auxiliar o clínico em uma conduta terapêutica correta, pode, também, quando confirmada a presença de *Cryptosporidium sp*, fornecer subsídios para estudos epidemiológicos e, nesses casos, os métodos estão disponíveis nos laboratórios, alguns com a utilização de metodologias de alto custo e outros de baixo custo. O importante é a presença de um profissional qualificado e treinado para fazer o diagnóstico final.

CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados na pesquisa, pode-se concluir a comparação entre as metodologias de Kinyoun e Ziehl-Neelsen modificadas na identificação do *Cryptosporidium sp* teve resultados potencialmente iguais, não sendo apresentadas diferenças estatísticas significativas entre os métodos, mesmo que o método de coloração Kinyoun tenha identificado mais *Cryptosporidium sp*.

Na conclusão final, pode-se afirmar que o método de coloração de Kinyoun demonstrou ser o melhor método para ser utilizado na rotina de diagnóstico laboratorial da

criptosporidiose, pois apresenta boa sensibilidade, não precisa utilizar fogo para aquecimento das lâminas, é um método mais simples, apresenta uma cor mais vibrante na identificação dos parasitas e tem custo acessível, apesar de ter limitações quanto ao tempo de execução da microscopia quando realizado em grande escala.

REFERÊNCIAS

- BALATBAT AB, JORDAN GW, TANG YJ, SILVA J JR. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by Nested PCR. **J Clin Microbiol.** v. 34, p. 1769-72, 1996.
- BORAD, A.; WARD, H. Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiology.* vol. 5, p. 507-519, 2010.
- CARVALHO-ALMEIDA, T.T.; PINTO, P.L.S.; QUADROS, C.M.S.; TORRES, M.A.G.V.; KANAMURA, H.Y.; CASIMIRO, A.M. Detection of *Cryptosporidium* sp. In non – diarrheal faeces from children in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v43, n.3, p. 147-153, 2007.
- CHALMERS, RM.; CAMPBELL, BM.; CROUCH, N.; CHARLETT, A.; DAVIES, AP.; Comparação da sensibilidade, diagnóstica e especificidade de ensaios, ELISA, Imunofluorescência e PCR de *Cryptosporidium* utilizados no Reino Unido. **J. Med Microbiol.** v. 60, n2 p. 1598-1604, 2011.
- DA, SILVA, AJ.; BORNAY-LINARES, FJ.; MOURA, INS.; SLEMENDA, SB.; TUTTLE, TL.; PIENIAZEK, NJ.; Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimes. **Mol Diagn.** v. 4, p. 57-64, 1999.
- DOING, KM.; HAMM, JL.; JELLISON, JA.; MARQUIS, JA.; KINGSBURY, C.; False positive results obtained with the Alexon ProSpect *Cryptosporidium* Enzyme Immunoassay. **J Clin Microbiol.** v. 37, p. 1582-3, 1999.
- FAYER, R.; *Cryptosporidium*: Parasita Zoonótica Transmitida pela Água. **Vet. Parasitol.** v. 126, p. 37-56, 2004.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, SJ.; Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int J Parasitol.** v. 30, p. 22-1305, 2000.

GARCIA, LS.; BRUCKNER, DA.; BREWER, TC.; SHIMIZU, RY.; Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* o from stool especimes. **J. Clin. Microbiol.** v. 18 n.5, p. 185-90, 1983.

GARCIA, LS.; SHIMIZU, RY.; Evaluation of nine immunoassay Kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **J Clin Microbiol.** v. 35, p. 1526-9. 1997.

HEALY, GR.; GARCIA, LS.; Intestinal and urogenital protozoa. In: Murray PR; Baron EJ, Tenover FC, Yolken RH. **Manual of clinical microbiology.** 6 ed. Washington (DC): ASM Press; p. 1204-28, 1995.

IGNATIUS, R.; EISENBLATTER, M.; REGNATH, T.; MANSMANN, U.; FUTH, U.,; HAHN, H.; WAGNER, J.; Efficacy of different methods for detection of low *Cryptosporidium parvum* oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimens- **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v.16, p.6-732, 1997.

LEITCH, G.L.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. **Journal of Biomedical Reserarch,** v. 25, p.1-16, 2012.

MARTINEZ, I.; BELDA, NETO, FM.; Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis. **Rev Inst Med Trop.** São Paulo. v. 43, p. 79-82, 2001.

ORLANDI, PA.; LAMPEL, KA.; Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic Protozoa. **J Clin Microbiol.** v.38, p.7-2271, 2000.

PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; NICHOLS, GL.; MCLAUCHLIN, J.; Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocysts wal protein gene. **Emerg Infect Dis.** v. 7, p.49-56, 2001.

SUNNOTEL, O.; LOWERY, CJ.; JE.; DOOLEY, J.S.G; XIAO, L.; MILLAR, B.C. *Cryptosporidium*. **Letters in Applied Microbiology,** v.43, p. 7-16, 2006.

UPTON, SJ.; FAYER, R.; MORGAN, U.; Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.** v. 30, p. 1305-22, 2000.

VALLADA, E, P.; **Manual de Exames de Fezes** Ed.1º p. 10-20, 1988.

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

NORMAS DA REVISTA

REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA

BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACY

Guia para Autores

INSTRUÇÕES GERAIS

Todos os manuscritos devem ser originais e não publicados anteriormente. Cabe salientar que submissão simultânea implicará em sua recusa nesse periódico. As publicações em inglês e espanhol devem ser revisadas por um profissional de edição de língua estrangeira e não garantem o aceite do artigo. O custo da revisão do texto em inglês ou espanhol é de responsabilidade dos autores que são encorajados a buscar profissionais ou empresas qualificados.

A RBF reserva os direitos de submeter todos os manuscritos para revisores ad hoc, cujos nomes serão confidenciais e com autoridade para decidir a aceitação ou declínio da submissão. Nos casos de conflito de avaliações entre os pares, não se compromete a seguir com uma terceira avaliação, a decisão contará com avaliação dos pareceres pelo Conselho Editorial.

FORMA E APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS

A RBF aceita artigos para as seguintes seções:

Artigos originais ou de revisão(até 7.000 palavras, incluindo notas e referências, e exclui o Resumo/Abstract. Máximo de 5 figuras, quadro/gráfico ou tabela): textos inéditos provenientes de pesquisa ou análise/revisão bibliográfica. A publicação é decidida pelo Conselho Editorial, com base em pareceres - respeitando-se o anonimato tanto do autor quanto do parecerista (double-blind peer review) - e conforme disponibilidade de espaço.

Artigos originais por convite (até 8.000 palavras, incluindo notas e referências, e exclui o Resumo/abstract. Máximo de 5 figuras, quadro/gráfico ou tabela): textos inéditos de temas previamente solicitados pelo editor (a) Chefe ou Conselho Editorial a autores/pesquisadores de reconhecida experiência no campo das Ciências Farmacêuticas, que poderão resultar em artigos resultado de pesquisa ou de revisão. Os artigos originais serão publicados com base em pareceres (double-blind peer review). Apenas artigos que, devido a seu caráter autoral, não podem ser submetidos anonimamente a um parecerista, serão analisados, com ciência do autor, com base em pareceres em que só o parecerista é anônimo (single-blind peer review).

Resumo de Tese de Doutorado ou Dissertações de Mestrado (até 1500 palavras, incluindo notas e referencias. Máximo de 3 figuras, tabela ou quadro/gráfico): Trata-se de um Resumo ampliado de estudos acadêmicos que tenham relevância no campo das Ciências farmacêuticas. Serão aceitos os Resumos de pesquisas que tenham sido defendidas até dois anos antes da publicação da RBF. O número de Resumos não poderá ultrapassar 15% do total de artigos apresentados por edição, e deverá contemplar as seções Introdução, Metodologia, Resultados e Discussão e Conclusão de forma resumida.

ALGUMAS CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS

Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.

As equações necessárias a compreensão do texto deverão ser editadas utilizando software compatível com o editor de texto. As variáveis deverão ser identificadas após a equação.

Recomenda-se que os autores realizem a análise de regressão ou outro teste estatístico aplicável para fatores quantitativos, mas que a utilização de programas específicos para o tratamento dos dados estatísticos deve constar da seção de Metodologia.

ATENÇÃO: QUADROS/ TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS devem ter largura de no máximo 18,25 cm, com alta resolução e enviados em arquivo separado. Nesse caso, sua posição deve ser identificada no texto. CASO CONTRÁRIO, O MANUSCRITO SERÁ DEVOLVIDO AOS AUTORES, que acarretará em nova submissão.

A RBF recomenda a utilização de Referencias Bibliográficas atualizada, salvo aquelas consagradas em trabalhos de autores seminais de cada área específica, ou ainda em textos que necessitam de informações históricas relevantes na compreensão da argumentação apresentada. Consideraremos atualizadas aquelas com data de publicação em periódicos indexados a pelo menos 5 anos da data de envio do manuscrito.

TODAS as correções sugeridas durante o processo de submissão deverão ser destacadas em **VERMELHO**, e devolvida a comissão editorial pelo endereço: revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br.

FORMATAÇÃO DO TEXTO

Os manuscritos deverão utilizar aplicativos compatíveis com o Microsoft Word. Devem ser escritos em página formato A4 com margens de 2 cm, espaçamento duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12, justificado. As linhas e páginas devem ser numeradas a partir do Título até a página final.

Deve-se adotar no texto apenas as **abreviações padronizadas**. Por exemplo: Kg (quilograma)

A primeira citação da abreviatura entre parênteses deve ser precedida da expressão correspondente por extenso. Por exemplo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

O **recurso de itálico** deverá ser adotado apenas para realmente destacar partes importantes do texto, como por exemplo, citações *ipsis literis* de autores consultados, partes de depoimentos, entrevistas transcritas, nomes científicos de organismos vivos e termos estrangeiros.

As ilustrações, figuras, esquemas, tabelas e gráficos deverão ser identificadas no texto, conforme apresentação desejada pelo autor, e **apresentadas em arquivo separado**.

Os manuscritos deverão seguir a seguinte estrutura:

Título: deverá ser conciso e não ultrapassar 30 palavras, informativo, digitado em negrito com letras minúsculas utilizando a fonte Times New Roman (tamanho 14), com exceção da primeira letra, dos nomes próprios e/ou científicos.

Autores: deverão ser adicionados a um espaço abaixo do título, centralizados, separados por vírgula. O símbolo "&" deve ser adicionado antes do último autor (Ex.: Paulo da Paz, João de Deus & Pedro Bondoso). Inserir os nomes completos dos autores, por extenso, com letras minúsculas com exceção da primeira letra de cada nome.

Afiliação do autor: cada nome de autor deverá receber um número arábico sobrescrito indicando a instituição na qual ele é afiliado. A lista de instituições deverá aparecer imediatamente abaixo da lista de autores. O nome do autor correspondente deverá ser identificado com um asterisco sobrescrito. O e-mail institucional, endereço completo, CEP, telefone e fax do autor correspondente deverão ser escritos no final da primeira página.

Resumo (Abstract): deverá ser escrito na segunda página do manuscrito, não deverá exceder 200 palavras, deverá conter informações sucintas que descrevam objetivo da pesquisa, metodologia, discussão/resultados e a conclusão. Os manuscritos escritos em português ou em espanhol devem ter um Resumo traduzido para o inglês (Abstract). O Abstract deve ser digitado na terceira página do manuscrito e deve ser revisado por um profissional de edição de língua inglesa. Os manuscritos em inglês deverão apresentar um Resumo em português.

Palavras-chave (Keywords): são fundamentais para a classificação da temática abordada no manuscrito em bancos de dados nacionais e internacionais. Serão aceitas entre 3 e 5 palavras-chave. Após a seleção, sua existência em português e inglês deve ser confirmada pelo(s) autor (es) do manuscrito no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br> (Descritores em Ciências da Saúde - Bireme). As palavras-chave (Keywords) deverão ser separadas por vírgula e a primeira letra de cada palavra-chave deverá maiúscula.

Introdução: Situa o leitor quanto ao tema que será abordado e apresenta o problema de estudo, destaca sua importância e lacunas de conhecimento (justificativa da investigação), e inclui ainda os objetivos (geral e específico) a que se destina discutir.

Metodologia ou Percurso Metodológico: Nessa seção o autor (es) deve (m) apresentar o percurso metodológico utilizado que apresente o tipo de estudo (se qualitativo ou quantitativo), de base empírica, experimental ou de revisão de forma que identifique a natureza/tipo do estudo. São fundamentais os dados sobre o local onde foi realizada a pesquisa; população/sujeitos do estudo e seus critérios de seleção (inclusão e exclusão) e cálculo amostral. Nos casos de pesquisa experimental cabe a identificação do material, métodos, equipamentos, procedimentos técnicos e métodos adotados para a coleta de dados. Na apresentação do tratamento estatístico/categorização dos dados cabe informar a técnica ou programa utilizado no tratamento e análise. Nos casos de investigação com humanos ou animais cabe informar a data e o número do protocolo da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Quanto ao estudo de espécies vegetais deve ter a indicação do seu local de coleta (dados de GPS), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e o depósito da exsicata.

Resultados e Discussão: devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica, utilizando ilustrações (figuras, quadros e tabelas) quando necessário. Deve-se comparar com informações da literatura sobre o tema ressaltando-se aspectos novos e/ou fundamentais, as limitações do estudo e a indicação de novas pesquisas. Nessa seção cabe a análise e discussão crítica da pesquisa.

Conclusões: apresentar considerações significativas fundamentadas nos resultados encontrados e vinculadas aos objetivos do estudo.

Agradecimentos: opcional e deverá aparecer antes das referências.

Figuras, Quadro/Tabelas ou Gráficos: Todas as ilustrações devem apresentar um título breve na parte superior e numerada consecutivamente com algarismos arábicos, conforme a ordem em que forem citadas no manuscrito e a legenda com fonte em Times New Roman, tamanho 12, justificado e com largura máxima de 18,25 cm.

As Tabelas devem apresentar dados numéricos como informação central, e não utilizar traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé da tabela, com os seus respectivos símbolos. **Se houver ilustração extraída de outra fonte, publicada ou não, a fonte original deve ser mencionada abaixo da tabela.** Não é permitida a utilização de Figura, gráfico, quadro/tabela publicada em outro periódico **sem antes pedir autorização prévia dos autores e/ou da revista.**

Qualquer uma dessas ilustrações com baixa resolução poderá ser excluída durante o processo de diagramação da RBF, ou ainda comprometer o aceite do manuscrito.

As fotos deverão garantir o anonimato de qualquer indivíduo que nela constar. Caso os autores queiram apresentar fotos com identificação pessoal, deverão apresentar permissão específica e escrita para a publicação das mesmas.

Referências:

As citações bibliográficas deverão ser adotadas de acordo com as exigências da RBF. Citação no texto, usar o sobrenome e ano: Lopes (2005) ou (Lopes, 2005); para dois autores (Souza & Scapim, 2005); três autores (Lima, Pereira & Silva, 2008), para mais do que quatro autores, utilizar o primeiro autor seguido por et al. (Wayner et al., 2007), porém na lista de referências deverão aparecer ordenadas alfabeticamente pelo **sobrenome do primeiro autor**. A citação de mais que uma referência por parágrafo requer a ordenação em ordem decrescente cronológica e cada grupo de autores separados por "ponto e vírgula". Por exemplo: (Gomes & Souza, 2012; Mendez, 2010; Lima, Pereira & Silva, 2008).

A veracidade das referências é de responsabilidade dos autores. Os exemplos de referências citados abaixo foram adaptados, em sua maioria, do documento original da ABNT (NBR 6023, agosto de 2002).

a) Artigos de periódicos:

A abreviatura do periódico deverá ser utilizada, em itálico, definida no Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) ou na Base de dados PubMed, da US National Library of Medicine (<http://www.pubmed.gov>), selecionando Journals Database. Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizada, deve-se citar o título completo.

Autor (es)*. Título do periódico em itálico, volume (a indicação do fascículo é entre parênteses): páginas inicial - final do artigo, ano de publicação.

Galato D & Angeloni L. A farmácia como estabelecimento de saúde sob o ponto de vista do usuário de medicamentos. Rev. Bras. Farm. 90(1): 14 – 18, 2009.

Fonseca VM, Longobuco P, Guimarães EF, Moreira DL, Kaplan MAC. Um teste do formato de nome. Rev. Bras. Farm. 90(1): 14 – 18, 2009.

b) Livros:

Com 1 autor

Autor. Título. Edição (a partir da 2ª). Cidade: Editora, ano de publicação. Número total de páginas.

Casciato DA. Manual de oncologia clínica. São Paulo: Tecmed, 2008. 1136 p.

Com 2 autores

Lakatos EM & Marconi MA. Metodologia científica. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1991. 231 p.

Com autoria corporativa

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. I Fórum Nacional de Educação Farmacêutica: O farmacêutico de que o Brasil necessita (Relatório Final). Brasília, DF, 2008. 68p.

Capítulos de livros (o autor do capítulo citado é também autor da obra):

Autor (es) da obra. Título do capítulo. In: _____. Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada.

Rang HP, Dale MM & Ritter JM. In: Quimioterapia do câncer. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 50, p. 789-809.

Capítulos de livros (o autor do capítulo citado não é o autor da obra):

Autor (es) do capítulo. Título da parte referenciada. In: Autor (es) da obra (ou editor) Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada.

Schenkel EP, Gosmann G & Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões CMO. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap. 15, p. 371-400.

Citação indireta

Utiliza-se apud (citado por) nas citações que foram transcritas de uma obra de um determinado autor, mas que na verdade pertence a outro autor.

Helper CD & Strant LM. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. Am. J. Hosp. Pharm. 47: 533-543, 1990. Apud Bisson MP. Farmácia Clínica & Atenção Farmacêutica. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 3-9.

c) Teses, Dissertações e demais trabalhos acadêmicos:

Autor. Título (inclui subtítulo se houver). Ano. Cidade. Total de páginas. Tipo (Grau), Instituição (Faculdade e Universidade) onde foi defendida.

Sampaio IR. Etnofarmacologia e toxicologia de espécies das famílias Araceae e Euphorbiaceae. 2008. Rio de Janeiro. 45 p. Monografia (Especialização em Farmacologia), Associação Brasileira de Farmacêuticos. Rio de Janeiro.

d) Eventos científicos (Congressos, Seminários, Simpósios e outros):

Autor (es). Título do trabalho. Nome do evento, nº do evento. Página. Cidade. País. Ano.

Marchioretto CT, Junqueira MER & Almeida ACP. Eficácia anestésica da neocaína (cloridrato de bupivacaína associada a epinefrina) na duração e intensidade da anestesia local em dorso de cobaio. Reunião anual da SBPC, 54, Goiânia, Brasil, 2002.

e) Patentes: Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado.

Ichikawa M, Ogura M & Lijima T. 1986. Antiallergic flavone glycoside from Kalanchoe pinnatum. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396, apud Chemical Abstracts 105: 178423q.

f) Leis, Resoluções e demais documentos

Conforme o modelo:

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 44, de 17 de agosto de 2009.

g) Banco/Base de Dados

Conforme o modelo

BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Lilacs - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde. Acesso em:

<<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&base=LILACS&lang=p>>. Acesso em: 27 ago. 2009.

h) Homepage/Website

Conforme o modelo:

WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses. 91 p. Acesso em:

<http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf>. Acesso em agosto de 2009.

SUBMISSÃO

Todos os manuscritos deverão ser submetidos exclusivamente por e-mail: revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br e deverá enviar o texto em programa compatível com word, e com todos os apêndices preenchidos.

Os autores deverão informar a área de concentração (Apêndice 1), a categoria do manuscrito (Artigo Original, Artigo de Revisão ou Resumo de Tese/ Dissertação); apresentar carta de encaminhamento ao Editor (a) Chefe (Apêndice 2) e declaração de originalidade e cessão de direitos autorais (Apêndice 3). É responsabilidade dos autores reconhecerem e informar ao Conselho Editorial da existência de conflitos de interesse que possam exercer qualquer influência em seu manuscrito. Desta forma, as relações financeiras ou de qualquer outra ordem deverão ser comunicadas por cada um dos autores em declarações individuais (Apêndice 4).

Quanto a Confirmação da submissão: O autor receberá por e-mail um documento com o número do protocolo, confirmando o recebimento do artigo pela RBF. Caso não receba este e-mail de confirmação dentro de 48 horas, entre em contato com o Conselho Editorial da RBF (e-mail: revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br).

A Revista Brasileira de Farmácia submeterá os manuscritos recebidos à análise por dois consultores ad hoc, acompanhado de um formulário para a avaliação e que terão a autoridade para decidir sobre a pertinência de sua aceitação, podendo inclusive, rerepresentá-los ao(s) autor (es) com sugestões, para que sejam feitas alterações necessárias e/ou para que os mesmos sejam adequados às normas editoriais da revista. Solicita-se aos autores que, na eventualidade de rerepresentação do texto, o façam evidenciando as mudanças através da cor vermelha como forma de identificação rápida e facilitação do processo de avaliação. Caso necessário poderá o autor dispor de argumentação teórica em carta anexa sumarizando as alterações realizadas ou não, que poderão ser aceitas ou não pelos revisores.

Os nomes dos autores e dos avaliadores dos manuscritos permanecerão em sigilo.

O trabalho aceito para publicação só poderá seguir para diagramação caso TODOS os autores tenham assinado o termo de publicação (Apêndice 3). Qualquer tipo de solicitação ou informação quanto ao andamento ou publicação do artigo poderá ser solicitado através do e-mail: revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br baseado no número do protocolo recebido pelo autor correspondente.

O Conselho Editorial da RBF reserva-se o direito de solicitar informações adicionais sobre os procedimentos éticos executados na pesquisa. O Conselho Editorial da Revista tem plena autoridade de decisão sobre a publicação de manuscritos, quando os mesmos apresentem os requisitos adotados para a avaliação de seu mérito científico, considerando-se sua originalidade, ineditismo, qualidade e clareza. Toda ideia e conclusão apresentadas nos

trabalhos publicados são de total responsabilidade do(s) autor (es) e não reflete, necessariamente, a opinião do Editor Chefe ou dos membros do Conselho Editorial da RBF.

ITENS DE VERIFICAÇÃO PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores deverão verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores. Somente receberão número de protocolo os artigos que estiverem em conformidade com as Normas para Publicação na RBF:

O manuscrito encontra-se no escopo da Revista Brasileira de Farmácia.

A contribuição é original, inédita e não está sendo avaliada por outra revista.

Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word ou equivalente.

O e-mail para envio do manuscrito está disponível.

O texto está em espaçamento duplo; fonte tamanho 12, estilo Times New Roman; com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos em Critérios para preparação dos manuscritos (Atenção às citações no texto e referências bibliográficas).

Todos os apêndices estão preenchidos (Atenção especial ao preenchimento dos apêndices).

Ao submeter um manuscrito, os autores aceitam que o copyright de seu artigo seja transferido para a Revista Brasileira de Farmácia, se e quando o artigo for aceito para publicação. Artigos e ilustrações aceitos tornam-se propriedade da Revista Brasileira de Farmácia.

APÊNDICE 1 - Áreas temáticas

APÊNDICE 2 - Modelo de carta de responsabilidade

APÊNDICE 3 - Declaração de originalidade e cessão de direitos

APÊNDICE 4 - Modelo de declaração de conflitos de interesse

ANEXO - LEI Nº 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998 - Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências.