



## Investigação de oocistos de *Cryptosporidium* spp em amostras fecais de crianças escolares do município de Araçatuba, SP.

*Investigation of Cryptosporidium spp oocysts in fecal samples of children school from Araçatuba, SP city.*

*Investigación de oocistos de Cryptosporidium spp en muestras fecales de niños escolares del municipio de Araçatuba, SP*

### **Gabriela Torres Rebech**

Bióloga, Mestre em Ciência Animal – UNESP/FMVA  
gtr.torres@outlook.com

### **Gabriel de Lima P. Spagnuolo**

Biólogo – UniSalesiano Araçatuba/SP  
gabriel\_slima@hotmail.com

### **Luiz Gustavo Ferraz Lima**

Professor Doutor UniSalesiano Araçatuba-SP



## RESUMO

Criptosporidiose é uma doença causada por protozoários do gênero *Cryptosporidium*, coccídio do filo Apicomplexa que infecta aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo seres humanos. Em crianças tem sido frequentemente relatada devido a imaturidade do sistema imunológico. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de oocisto de *Cryptosporidium* spp., por meio de exame coproparasitológico, em amostras fecais de crianças de 6 a 12 anos de idade. As lâminas foram preparadas com esfregaços diretos das amostras e coradas de acordo com os métodos de Zihel e Neelsen modificado e em seguida, foram examinadas ao microscópio óptico (400x), por dois examinadores. Nas duas análises todas as amostras foram consideradas negativas para a presença de oocisto de *Cryptosporidium* sp. Embora no exame parasitológico o resultado negativo foi absoluto (100%), sugere-se a realização de outros exames que promovam o enriquecimento das amostras, usando-os concomitante com os métodos parasitológicos para proporcionar maior especificidade e resultados fidedignos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Protozoário, oocisto, fezes, infância

## ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a disease caused by protozoa of the genus *Cryptosporidium*, coccidia of the phylum Apicomplexa that infects birds, reptiles, amphibians, fish and mammals, including humans. Cryptosporidiosis in children has been reported due to immaturity of the immune system. In this way, the objective of this work was to investigate the presence of *Cryptosporidium* spp. oocyst by coproparasitological examination in fecal samples of children from 6 to 12 years old. The slides were prepared with direct swabs of the samples, stained according to the modified Zihel and Neelsen methods, and then examined under optical microscopy (400 x) by two examiners. In the two analyzes all the samples were considered negative for the presence of oocyst of *Cryptosporidium* sp. Although in the parasitological examination the negative result was absolute (100%), it is suggested to perform other tests to promote the enrichment of the samples, using them together with parasitological methods to provide greater specificity and reliable results.

**KEYWORDS:** Protozoan, oocyst, feces, childhood

## RESUMEN

La criptosporidiosis es una enfermedad causada por protozoarios del género *Cryptosporidium*, un coccidio del filo Apicomplexa que infecta a aves, reptiles, anfíbios, peces y mamíferos, incluyendo seres humanos. Criptosporidiosis en niños ha sido frecuentemente reportada debido a la inmadurez del sistema inmunológico. De esta forma, el objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de oocisto de *Cryptosporidium* spp., por medio de examen coproparasitológico, en muestras fecales de niños de 6 a 12 años de edad. Las láminas fueron preparadas con frotis directas de las muestras y coloreadas de acuerdo con los métodos de Zihel y Neelsen modificado y luego fueron examinadas al microscopio óptico (400x), por dos examinadores. En los dos análisis todas las muestras se consideraron negativas para la presencia de oocisto de *Cryptosporidium* sp. Aunque en el examen parasitológico el resultado negativo fue absoluto (100%), se sugiere la realización de otros exámenes que promuevan el enriquecimiento de las muestras, usándolos conjuntamente con métodos parasitológicos para proporcionar mayor especificidad y resultados fidedignos.

**PALABRAS CLAVE:** Protozoario, oocisto, heces, infancia



## 1. INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma doença causada por protozoários do gênero *Cryptosporidium*, um coccídeo do filo Apicomplexa que infecta aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo seres humanos (FAYER, 2004; LEITCH; HE, 2011). Medindo de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, o parasito se desenvolve no epitélio da mucosa intestinal ou gástrica do hospedeiro e são liberados nas fezes contaminando solo, água e demais animais em contato (BORGES; ALVES; FAUSTINO, 2007). Em 2010, uma estimativa global de casos de diarreia em pacientes com cinco anos ou mais, no período de 1980 a 2008, apontou o *Cryptosporidium* como o responsável por 6,9% dos casos notificados, e destes, 1,3% necessitaram de internação (MADRID; BASTOS; JAYME, 2015; WALKER; SACK; BLACK, 2010).

O gênero *Cryptosporidium* (C.), abrange 26 espécies diferentes e destas, 17 já foram encontrados em seres humanos (MADRID; BASTOS; JAYME, 2015), sendo o *C. hominis* e *C. parvum* as duas espécies mais ocorrentes. O *C. hominis*, é restritamente humana (antroponótica) enquanto o *C. parvum*, possui diversos hospedeiros, incluindo diferentes espécies de animais domésticos (LEITCH; HE, 2011). A ocorrência de vários surtos de criptosporidiose em seres humanos se deve ao fato dos oocistos serem resistentes às condições ambientais, como a ação do cloro utilizado no tratamento da água, a baixa dose infectante (menos de 10 oocistos) e, seu pequeno tamanho, que dificulta sua identificação e facilita sua esporulação na forma infectante pelas fezes. Essas características tornam essa parasitose uma importante causa de surtos associados a água de consumo, ou de lazer, além dos alimentos e ambientes contaminados (SANTOS et al., 2004), como também, pelo contato direto com pessoas e/ou animais contaminados (MILLARD et al., 1994).

No mundo, a criptosporidiose, é conhecida como uma das principais causadoras de diarreia em seres humanos, em diversas faixas etárias, sendo mais recorrente em criança de 1 a 9 anos de idade (MADRID; BASTOS; JAYME, 2015). Já foi registrada em 106 países em todos os continentes, exceto Antártica, porém sua incidência global não é conhecida, pois a notificação não é obrigatória e em muitos lugares não há acesso a sistemas de saúde, mas quando há, não são realizados exames e quando é feito pode haver divergência entre a escolha dos métodos diagnósticos, podendo diferir nos resultados. (MADRID; BASTOS; JAYME, 2015).

No Brasil, há relatos de criptosporidiose humana em vários estados do nordeste e do sudeste do país, acometendo principalmente crianças e pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (GATEI et al., 2003; MADRID; BASTOS; JAYME, 2015; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; BALDURSSON; KARANIS, 2011). Entre 1999 a 2000, Estudo realizado no município do Rio de Janeiro, encontrou-se oocistos de *Cryptosporidium sp.* em 16 de 485 (3,3%) amostras fecais de crianças menores de 10 anos, apresentando maior incidência em crianças de até um ano de idade que apresentaram fezes pastosas e diarreicas, não estando presentes em fezes moldadas (SILVA et al., 2003).



No município de Criciúma-SC, 95% de 94 amostras fecais diarreicas, de crianças com menos de cinco anos de idade, apresentaram algum tipo de enteroparasitose, onde, destas 85% foram positivas para *Cryptosporidium sp.* por ELISA, em um período de fevereiro a maio de 2002. Esta grande incidência, apontou falhas no sistema de saúde da cidade sugerindo maior investigação para elucidar as possíveis causas (SCHNACK et al., 2002). Em Goiânia-GO, em 64 de 445 (14%) crianças hospitalizadas com diarreia, apresentaram *C. parvum* no conteúdo fecal pelo Teste de Imunofluorescência Direta (TID), entretanto, ao utilizar o TID mais o teste de separação imunomagnética, considerado como padrão ouro, a positividade aumentou para 83 de 445 (18.7%) crianças. Neste estudo, a infecção foi predominante em crianças com menos de 2 anos e mais ocorrente no sexo masculino, além disto, a diferença de peso foi de 2% a menos pra as crianças infectadas (PEREIRA et al., 2002).

Em humanos saudáveis, a criptosporidiose pode ser autolimitante e durar apenas duas semanas, entretanto idosos, crianças e imunocomprometidos, são mais susceptíveis as doenças e por não haver medicação específica, a infecção pode se agravar resultando em gastroenterite severa com diarreia, que se prolongada e, coloca a vida destes pacientes em risco (MADRID; BASTOS; JAYME, 2015; LEAV; MACKAY; WARD, 2003).

A ocorrência de criptosporidiose em crianças tem sido frequentemente relatada (MADRID; BASTOS; JAYME, 2015; SCHNACK et al., 2003), podendo estar relacionada com o baixo nível social e financeiro das famílias de crianças em idade escolar, frequentemente associados aos maiores índices da doença (UNICEF) e mortalidade em crianças abaixo de cinco anos de vida (Murugesan; Ganesan; Ajjampur, 2017).

Desta forma, este estudo teve como objetivo a realização de pesquisa coproparasitológica em amostras fecais de crianças de 6 a 12 anos de idade, a fim de observar se há a presença de oocisto de *Cryptosporidium spp.*, por método simples direto e caso encontrado, realizar caracterização molecular para identificação de espécie.

## 2. OBJETIVO GERAL

Investigar possível presença de oocisto de *Cryptosporidium spp* em amostras fecais de crianças de 6 a 12 anos de idade, por meio de pesquisa coproparasitológica.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Comitê de ética em pesquisa (CEP)

O presente Projeto foi encaminhado ao CEP, tendo sido aprovado sob o número CAAE 26445314.3.0000.5379, no dia 10\04\2014.

### 3.2. Obtenção das amostras fecais

Foram utilizadas 424 amostras fecais de crianças, entre 6 e 12 anos de idade, mantidas sob conservação (dicromato de potássio 2,5%), em um Laboratório de Análises Clínicas do município de Araçatuba. Essas amostras fizeram parte do programa de Controle das Parasitoses, em crianças do ensino fundamental de Araçatuba-SP, desenvolvido pela Prefeitura Municipal e



o Centro Universitário UniSALESIANO. Após essas amostras terem sido examinadas por esse laboratório para outras enteroparasitos, as mesmas foram oferecidas e utilizadas para o presente estudo na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*, no laboratório de parasitologia do UniSALESIANO, respeitando-se as normas do CEP.

### 3.3. Pesquisa parasitológica de *Cryptosporidium* spp.

Após feitos os esfregaços diretos das amostras conservadas, essas foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (ZNm) (Método de Kinyoun modificado (NETO et al., 1995), e examinadas por duas pessoas, ao microscópio óptico, (400x), levando-se em conta a morfologia, morfometria e características tintoriais do oocisto. O primeiro examinador avaliou todas as lâminas em busca de oocistos e outras estruturas semelhantes no tamanho, na forma e na cor. O segundo examinador, avaliou todas as lâminas selecionadas pelo primeiro examinador, bem como lâminas consideradas negativas, escolhidas ao acaso, para o controle das amostras consideradas negativas.

## 4. RESULTADO

Após dupla análise microscópica dos esfregaços, não foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp., em nenhuma das 424 (100%) amostras de fezes examinadas.

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As crianças apresentam dois aspectos peculiares à idade. O primeiro é o biológico relacionado com a imaturidade do sistema imunológico. O segundo está associado ao comportamento de maior contato com o ambiente, a despreocupação e ausência de hábitos higiênicos, ainda em formação favorecendo a provável ocorrência das infecções (SILVA et al., 2003; MASCARINI; DONALÍSIO, 2006). Além disto, a contaminação pode ser favorecida por várias fontes de infecção, como esgoto, rios, lagos, água para consumo e recreação (HUNTER; NICHOLS, 2002, (SANTOS et al., 2004)) como também, por fezes de animais, bovinos e silvestres contaminados.

Como não há na pesquisa científica uma padronização de métodos para o diagnóstico laboratorial de *Cryptosporidium* spp., muitos utilizam métodos microscópicos, imunológicos ou moleculares empregados para esse fim (OSTERHOLM et al., 1992). Há autores que optam apenas pelo exame parasitológico (OSHIRO et al., 2000) ou dois métodos, sendo um o imunológico e outro o parasitológico (ANDRADE et al., 2008), ou o molecular e o parasitológico (LALLO; BONDAN, 2006). Os vários graus de sensibilidade na detecção do parasita proporcionados pelos diversos métodos, explicam a provável diferença de resultados na ocorrência de criptosporidiose encontrados na literatura.

Nesse estudo, a realização do diagnóstico parasitológico apenas por esfregaços diretos, sem um processo de concentração, pode ter sido uma das possíveis causas da ausência de oocistos (100% de negatividade) nas amostras examinadas. Por outro lado, o baixo número de oocistos que o paciente pode eliminar, também influencia no resultado dos exames (MILLARD



et al., 1994). Igualmente foi observado em estudo para investigar a contaminação do esgoto tratado do município de Campinas, onde detectaram maior número de cistos de *Giardia* (54,5%) comparativamente aos oocistos de *Cryptosporidium* (10,5%) encontrados (SANTOS et al., 2004). Mesmo considerando que água é o meio veiculador mais eficaz de patógenos é preciso considerar que a população estudada conta com a água tratada para o consumo, podendo também, incluir como uma das possíveis contribuições para o resultado encontrado.

A idade das crianças deve ser outro aspecto considerado no presente estudo, pois a frequência da criptosporidiose é maior em crianças abaixo de 5 anos de idade, diferindo da faixa etária de 6 a 12 anos de idade considerada nessa avaliação (PEREIRA et al., 2002; SCHNACK et al., 2002) como já anteriormente documentado, principalmente nas mais novas (até 1 ano) e com baixos índices de oocistos (SILVA et al., 2003).

Dessa forma, uma reflexão sobre a utilização de metodologia padronizada para a pesquisa de *Cryptosporidium* deveria ser considerada pela comunidade científica, envolvida nessa linha de pesquisa, contribuindo para obtenção de resultados mais aproximados, sobre tudo quanto aos aspectos epidemiológicos dessa protozoose.

Ao observar a ausência de oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras analisadas por meio de exame parasitológico direto, pode-se concluir que é necessário a utilização concomitante de outros exames para o enriquecimento das amostras, afim de proporcionar resultados fidedignos e específicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Andrade F, et al. Parasitoses intestinais em um centro de educação infantil público do município de Blumenau (SC), Brasil, com ênfase em *Cryptosporidium spp* e outros protozoários. **Revista de Patologia Tropical**. 2008; 37: 332-340.

Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004-2010. **Water Research**. 2011; 45: 6603-6614.

Borges JCG, Alves LC, Faustino MAG. Criptosporidiose: uma revisão sobre a sua implicação na conservação dos mamíferos aquáticos. **Biota Neotropica**. 2007; 7:91-96.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**. 2000; 30:1305-1322.

Fayer R. *Cryptosporidium*: a waterborne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**. 2004; 126:37-56.

Gatei W, et al. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**. 2003; 41:1458-62.

Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**. 2002; 15:145-154.

Lallo MA, Bondan EF. Prevalência de *Cryptosporidium sp.* em cães de instituições da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**. 2006; 40:120-125.



Leav BA, Mackay M, Ward HD. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. **Clinical Infectious Diseases**. 2003; 36:906-913.

Leitch GJ, He Q. Cryptosporidiosis- an overview. **Journal of Biomedical Research**. 2011; 25:1-16.

Madrid DMC, Bastos TSA, Jayme VS. Emergência da criptosporidiose e impactos na saúde humana e animal. **Enciclopédia Biosfera**. 2015; 11:150-171.

Mascarini LM, Donalísio MR. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2006; 39:655-579.

Millard PS, et al. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**. 1994; 272:1592-1596

Murugesan M, Ganesan SK, Ajjampur SS. Cryptosporidiosis in children in the Indian subcontinent. **Tropical Parasitology**. 2017; 7:18-28 .

Neto VA, et al. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp em fezes: comparação entre os métodos de Kinyoun modificado e de Heine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 1996; 29:575-578.

Oshiro ET, et al. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2000; 33:277-280.

Osterholm MT, et al. Infectious disease and child day care. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. 1992; 11:32-41.

Pereira MD, et al. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 2002; 66:787-93.

Santos LU, et al. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2004; 46:309-313.

Schnack FJ, et al. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants (< 5 years old) in a population sample in Greater Metropolitan Criciúma, Santa Catarina State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. 2003; 19:1205-8.

Silva S, et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais de crianças, menores de 10 anos de idade, com indicação clínica de Rotavírus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2003a; 36:421-423.

UNICEF. Countdown to 2015: maternal, newborn and child survival. Tracking progress in maternal, neonatal and child survival: the 2008 report. New York, NY: **UNICEF**; 2008.

Walker FCL, Sack D, Black RE. Etiology of Diarrhea in Older Children, Adolescents and Adults: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Disease**. 2010; 4:1-8.