

**COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA E CONTRASTE DE FASE NA DETECÇÃO DE OOCISTOS DO GÊNERO *Cryptosporidium* TYZZER, 1907 (APICOMPLEXA: CRYPTOSPORIDIIDAE) EM BOVINOS ASSINTOMÁTICOS\***

**COMPARISON BETWEEN THE MODIFIED ZIEHL-NEELSEN TECHNIQUE AND THE PHASE CONTRAST FOR DETECTION OF OOCYSTS OF THE GENUS *Cryptosporidium* TYZZER, 1907 (APICOMPLEXA: CRYPTOSPORIDIIDAE) IN ASSINTOMATIC CATTLE**

Elza de Souza Muniz Neta<sup>1</sup>, Daniel Colen Sampaio<sup>2</sup>, Gideão da Silva Galvão<sup>3</sup>  
e Alexandre Dias Munhoz<sup>4</sup>

**ABSTRACT.** Muniz Neta E. de S., Sampaio D.C., Galvão G. da S. & Munhoz A.D. [Comparison between the modified Ziehl-Neelsen technique and the phase contrast for detection of oocysts of the genus *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in asymptomatic cattle.] Comparação das técnicas de Ziehl-Neelsen modificada e contraste de fase na detecção de oocistos do gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em bovinos assintomáticos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32(4):201-204,2010. Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45650-000, Brasil. E-mail: munhoz@uesc.br

The aim of this study was to compare the modified Ziehl-Neelsen Technique (ZNM) and the centrifugal-flotation with phase contrast (CF) for detection of oocysts of *Cryptosporidium* in asymptomatic cattle. One hundred fifty-six fecal samples of asymptomatic cattle (64 calves and 92 adults) were collected and selected using not random method. For the ZNM technique was prepared three slides of each sample. To the statistical analysis was used the Cohen's *Kappa* statistics for comparison of the techniques and the chi-square test with Yates correction to evaluate the use of more than one slide in the ZNM technique. It was observed a poor agreement ( $k: 0.08$ ) between the CF, with either one or three slides in the ZNM, in which results showed that the first comparison of the simultaneous need of techniques to increase the detection of positive animals and second comparison that the sensitivity of the three slides was superior to the CF. This can be verified when just one slide was examined, showing that 41 (26.3%) of all animals would not be diagnosed with *Cryptosporidium*, accounting for 46.06% of positive ( $p < 0.001$ ), underestimating the occurrence of this coccidian. Thus the reading of three blades became more sensitive diagnosis of *Cryptosporidium* and should be recommended mainly in asymptomatic animal studies of which could minimize the number of false negatives.

**KEY WORDS.** Cryptosporidiosis, epidemiology, diagnostic, feces.

---

\*Recebido em 26 de abril de 2010.

Aceito em 22 de setembro de 2010

<sup>1</sup> Médica-veterinária, *M.Zool.* Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil.

<sup>2</sup> Médico-veterinário, UESC, Rod. Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000.

<sup>3</sup> Médico-veterinário, *M.Ci.Aní.*, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

<sup>4</sup> Médico-veterinário, *Dr.CsVs.* Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45650-000. E-mail: munhoz@uesc.br

**RESUMO.** Objetivou-se, neste estudo, comparar a técnica de Ziehl-Neelsen Modificada com confecção de três lâminas e leitura de toda a extensão do esfregaço e da centrífugo-flutuação com contraste de fase, na detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, em bovinos assintomáticos. Foram coletadas 156 amostras de fezes de bovinos (64 bezerros e 92 adultos) selecionados por conveniência, as quais foram submetidas às técnicas de Centrífugo-flutuação com contraste de fase (CF) e Centrífugo-sedimentação com coloração de Ziehl-Neelsen Modificada (ZNM), em três lâminas confeccionadas. Para análise estatística, utilizou-se a estatística de Kappa de Cohen para comparação entre as técnicas e do teste do qui-quadrado, com correção de Yates na avaliação do uso de mais de uma lâmina no ZNM. Observou-se uma concordância ruim ( $k:0,08$ ) entre o CF, tanto com uma ou três lâminas do ZNM, onde os resultados demonstram na primeira comparação, a necessidade de realização simultânea das técnicas, para maior detecção de animais positivos e, na segunda, que a sensibilidade das três lâminas foi superior ao CF, evidenciando que se apenas uma lâmina fosse examinada 41 (26,3%) do total de animais não seriam diagnosticados com *Cryptosporidium*, correspondendo a 46,06% do total de positivos ( $p<0,001$ ), subestimando a ocorrência deste coccídio. Desta forma, a leitura de três lâminas tornou mais sensível o diagnóstico de *Cryptosporidium* devendo ser preconizada principalmente em estudos com animais assintomáticos minimizando o número de falso-negativos.

**PALAVRAS-CHAVE.** Criptosporidiose, epidemiologia, diagnóstico, fezes.

## INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma doença cosmopolita e comumente responsável por parte dos quadros da síndrome diarreica, ocorrendo mais comumente em neonatos de animais de produção (Graaf et al. 1999). Os animais adultos são considerados como potencial fonte de infecção para o resto do rebanho e de contaminação ambiental (Fayer et al. 2000). Perdas econômicas associadas com a criptosporidiose estão relacionadas aos custos que resultam das intervenções para controle dos problemas diarreicos e em casos extremos na morte dos animais (Graaf et al. 1999, Vergara & Quílez 2004).

A eliminação dos oocistos de *Cryptosporidium* varia de acordo com a intensidade da infecção, assim como animais doentes excretam maior quantidade em relação aos assintomáticos (Souza & Lopes 1995, Ortolani & Soares 2003).

A desinfecção e a disponibilidade de drogas efetivas contra a criptosporidiose (Fayer & Xiao 2008), associadas às medidas de controle sanitário e de bom manejo

são ferramentas efetivas no combate à enfermidade (Graaf et al. 1999; Fayer et al. 2000).

A utilização de métodos laboratoriais que possuem elevada sensibilidade e especificidade, facilidade de execução e interpretação, bem como baixo custo, é de fundamental importância para a realização de um inquérito epidemiológico (Feitosa et al. 2004). O resultado destes exames pode variar em função dos métodos de detecção utilizados (Fayer et al. 1998).

No Brasil, boa parte dos estudos para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* nas espécies domésticas foi realizado pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen Modificada (Quadros & Araújo 2003), que é fácil de ser executada, rápida, tem baixo custo e boa sensibilidade (Ortolani 2000).

Uma má homogeneização da amostra pode causar resultados falso-negativos, em função de uma distribuição desigual de oocistos, assim como estes ficarem retidos na gaze durante a filtração, se romperem durante o processamento, ou pela realização de uma única amostra fecal coletada por animal (Fayer et al. 2000). Resultados falso-negativos podem também ser observados em animais assintomáticos pela pequena quantidade de oocistos eliminada e, neste íterim, um maior volume de fezes analisadas por amostra (Fayer & Xiao 2008), ou a utilização de mais de um método de detecção, associada a confecção de mais de um esfregaço corado pelo Ziehl e leitura de toda a sua extensão, pode minimizar este risco.

Desta forma, objetivou-se neste estudo comparar a técnica de Ziehl-Neelsen Modificada com confecção de três lâminas e leitura de toda a extensão do esfregaço e do Centrífugo-flutuação com contraste de fase, na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em bovinos assintomáticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado utilizando 156 amostras de fezes de bovinos assintomáticos, sendo 64 bezerros, com idade a partir dos sete dias até um ano e 92 adultos selecionados por conveniência no momento da ordenha. Com auxílio de uma luva de palpação retal as fezes foram colhidas diretamente da ampola retal, colocadas em sacos plásticos, identificadas, e acondicionadas sob refrigeração até seu processamento.

As amostras, após serem homogeneizadas, foram processadas pelas técnicas de Centrífugo-flutuação Modificada, com visualização por campo brilhante segundo Cardozo et al. (2005), e Centrífugo-sedimentação com preparação de esfregaços fecais, segundo Almeida (2006) corados pela técnica de Ziehl-Neelsen Modificada utilizando o *Kit* comercial da Newprov®, seguindo as

especificações do fabricante. As lâminas foram observadas, por um único observador, em microscópio óptico Olympus™ mod. BX-50, em aumento de 400x.

Para a técnica de Ziehl-Neelsen Modificada foram confeccionadas e analisadas três lâminas de cada amostra centrifugada, sendo a mesma considerada negativa quando não se observou oocistos de *Cryptosporidium*, após a leitura de toda a extensão das três lâminas.

Para análise estatística, utilizou-se a estatística de *Kappa* de Cohen (Laudis & Kock 1977), para comparação entre as técnicas de contraste de fase e Ziehl Neelsen Modificada e do teste do qui-quadrado, com correção de Yates (Sampaio 1998) na avaliação do uso de mais de uma lâmina no Ziehl-Neelsen modificado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A realização da técnica de Ziehl-Neelsen Modificada (com leitura de uma única lâmina e toda a sua extensão), embora tenha detectado um maior número de amostras positivas que a técnica de contraste de fase demonstrou que, 22 (14%) das amostras, seriam falso-negativas (Tabela 1), caracterizando a necessidade da utilização simultânea destas, ratificada pelo resultado do *Kappa*: 0,083, que demonstra uma concordância ruim entre as técnicas.

A técnica de Ziehl-Neelsen apresentou maior facilidade na identificação dos oocistos mesmo nos animais com baixa carga parasitária, onde o contraste de cores permitiu a fácil visualização não sendo verificada a interferência dos detritos fecais no diagnóstico, como mencionado por Huber et al. (2003). O grande número de falso-negativos 52 (33,3%) na técnica de contraste

Tabela 1. Comparação entre as técnicas de Contraste de Fase e Ziehl-Neelsen Modificada, com leitura de uma lâmina, na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras de fezes de bovinos leiteiros.

Técnica	Ziehl-Neelsen		Total (%)
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Contraste de Fase			
Positivos	37(23,7)	22(14,1)	59 (37,8)
Negativos	52 (33,3)	45(28,8)	97 (62,2)
Total	89 (57,1)	67 (42,9)	156 (100)

*Kappa*: 0,083

Tabela 2. Resultados obtidos na observação de oocistos do gênero *Cryptosporidium* corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificado utilizando três lâminas para cada amostra.

Lâmina	Ziehl-Neelsen	
	Positivos (%)	Negativos (%)
1ª	89 (57,1)	67(42,9)
1ª e 2ª	117 (75)	39(25)
1ª, 2ª e 3ª	130 (83,3)	26 (16,7)

p<0,0001

de fase provavelmente deveu-se a baixa carga parasitária, onde 88% dos animais positivos para esta técnica apresentaram um OoPG (Oocistos por grama de fezes) inferior a 40, logo OoPGs muito baixos, têm influência direta na sensibilidade da técnica e, por conseguinte, na identificação de animais positivos (Fayer & Xiao 2008).

Ao utilizar a técnica de Ziehl-Neelsen Modificada com a confecção e leitura de três lâminas para cada amostra observou-se que, se apenas a primeira lâmina fosse examinada 41(26,3%) do total de animais, não seriam diagnosticados com *Cryptosporidium*, o que corresponderia a 46,06% do total de positivos, subestimando a ocorrência deste protozoário (p<0,0001) (Tabela 2), onde apenas 06 (3,8%) animais não seriam detectados como positivos para *Cryptosporidium* com a leitura das três lâminas (Tabela 3), este resultados são novamente ratificados pelo teste do *kappa* (0,085) em função do dobro de detecção de animais positivos em relação ao contraste de fase.

Desta forma, leituras de lâminas realizadas apenas por um período de 5 minutos (Paz & Silva 2006), encerrada após a visualização de 50 (Ortolani & Soares 2003) ou 100 campos (Garcia & Lima 2004) e sem coloração de Ziehl-Neelsen (Huber et al. 2003) não deve ser encorajada em animais assintomáticos, vista a baixa eliminação de oocistos em quantidades nem sempre encontradas (Maddox-Hyttel et al. 2006), onde nossos resultados recomendam que a leitura de um número maior de lâminas e de toda a sua extensão, minimiza o número de falso-negativos por aumentar a quantidade de fezes a ser analisada pela técnica (Fayer & Xiao 2008).

Os resultados evidenciam que, apenas a utilização da técnica de Ziehl-Neelsen com leitura de uma lâmina, pode subestimar o resultado em animais assintomáticos (Tabelas 1 e 2), comprometendo o diagnóstico e, por conseguinte, o inquérito epidemiológico, necessitando de uma prova complementar como o contraste de fase para diminuir a chance de falso-negativo, contudo a técnica com contraste de fase apresenta inconvenientes como a necessidade de microscópio apropriado, leitura imediata após a montagem da lâmina e experiência do observador na visualização dos oocistos. Além disso, os estudos epidemiológicos realizados com o auxílio do diagnóstico molecular, seja para

Tabela 3. Comparação entre as técnicas de Contraste de Fase e Ziehl-Neelsen Modificada otimizada com três lâminas para cada amostra.

Técnica	Ziehl-Neelsen		Total (%)
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Contraste de Fase			
Positivos	53 (34,0)	06(3,8)	59(37,8)
Negativos	77 (49,4)	20(12,8)	97(62,2)
Total	130 (83,3)	26(16,7)	(100)

*Kappa*: 0,085

caracterização da espécie, genotipagem ou potencial zoonótico, normalmente é comparado com os resultados obtidos pela coloração de uma só lâmina e, por conseguinte, embora mais sensíveis, são superestimados.

Assim, a proposição de leitura de pelo menos três lâminas em toda a sua extensão aumentou consideravelmente a sensibilidade da técnica (Tabelas 2 e 3), de forma simples e sem custo adicional, minimizando situações comuns mencionadas por Fayer et al. (2000), que levam a resultados falso-negativos tais como: oocistos se distribuírem em áreas não selecionadas para serem examinadas; a realização de uma única amostra coletada por animal e uma quantidade pequena de oocistos eliminados. Soma-se ao fato que para a adoção de medidas de controle e profilaxia é imprescindível a detecção dos animais positivos, principalmente os assintomáticos. Visto que, um bovino adulto aparentemente negativo que excreta 20 kg de fezes diariamente poderão estar eliminado juntamente 20 milhões de oocistos (Fayer et al. 1998).

## CONCLUSÃO

A utilização de mais de uma lâmina para da técnica de Ziehl-Neelsen Modificada foi mais eficiente na identificação dos oocistos em esfregaços fecais em comparação com as técnicas como o Contraste de Fase e Ziehl-Neelsen Modificada, com leitura de uma só lâmina, devendo ser encorajada para estudos epidemiológicos principalmente em rebanhos assintomáticos.

**Agradecimentos:** A Universidade Estadual de Santa Cruz; a Gerência de Laboratórios (GERLAB) da UESC e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida A.J.D.S. *Diagnóstico e fatores de risco da criptosporidiose bovina na microrregião de Campos dos Goytacazes-RJ, e identificação de Cryptosporidium parvum através da reação em cadeia da polimerase (PCR)*. Tese de Doutorado em Produção Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2006. 67p. (Capturado em: <servicos.capes.gov.br/arquivos/.../2006\_023\_31033016008P7\_Teses.pdf>)

Cardozo S.V., Teixeira Filho W.L. & Lopes C.W.G. Transmissão experimental de *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) isolado de frango de corte à codorna japonesa (*Conturnix japonica*). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 14:119-124, 2005.

Fayer R., Gasbarre L., Pasquali P., Canals A., Almeria S. & Zarlenga D. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int. J. Parasitol.*, 28:49-56, 1998.

Fayer R., Trout J.M., Graczyk T.K. & Lewis E.J. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Vet. Parasitol.*, 93:103-112, 2000.

Fayer R. & Xiao L. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, 2<sup>nd</sup> Ed., 2008, Edited by Ronald Fayer and Lihua Xiao. CRC Press, Taylor and Francis group, 560 p.

Feitosa F.L.F., Shimamura G.M., Roberto T., Meireles, M.V., Nunes C.M., Ciarlini P. C. & Borges A.S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. *Cien. Rural*, 34:189-193, 2004.

Garcia A.M. & Lima J.D. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com práticas de manejo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 3:23-28, 1994.

Graaf D.C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L.M., Abbassi H. & Peeters J.E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.*, 29:1269-1287, 1999.

Huber F., Bomfim T.C.B. do & Gomes, R.S. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-eter e da técnica de centrifugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais de bezerros. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 2:135-137, 2003.

Landis J.R & Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33:159-174, 1977.

Maddox-Hyttel C., Langkjaer R.B., Enemark H.L. & Vigre, H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of danish cattle and pigs-Occurrence and management associated risk factors. *Vet. Parasitol.*, 141:48-59, 2006.

Ortolani E.L. Standardization of the modified Ziehl-Neelsen Technique to Stain Oocysts of *Cryptosporidium* sp. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 9:29-31. 2000.

Ortolani E.L. & Soares P.C. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis em becerros de rebaño lecheros. *Parasitol. Latinoam.*, 58:122-127, 2003.

Paz e Silva F.M. *Diagnóstico e caracterização molecular de Giardia duodenalis e Cryptosporidium spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2007. 158p. (Capturado em: <www.fmvz.unesp.br/.../pg\_mv\_clinica\_m.php>)

Quadros R.M. & Araujo F.A.P. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp Tyzzer, 1907 detectada pelo método de imunofluorescência através da técnica de coloração da auramina em bovinos em propriedades rurais do município de Lages (SC), do Brasil. *Rev. Cien. Agrovet.*, 2:68-73, 2003.

Sampaio I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 1998. 221p.

Souza J.C.P. & Lopes C.W.G. Criptosporidiose em bezerros de rebanhos da bacia leiteira Sul-Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 4:33-36, 1995.

Venturini L., Bacigalupe D., Basso W., Unzaga J. M., Venturini M.C. & Moré G. *Cryptosporidium parvum* em animales domésticos y em monos de um zoológico. *Parasitol. Latinoam.*, 61:90-93, 2006.

Vergara C. & Quílez J. Criptosporidiosis: una zoonosis parasitaria. *MVZ-Córdoba*, 9(1):363-372, 2004.