

PESQUISA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM SP* EM FEZES: COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE KINYOUN MODIFICADO E DE HEINE

Vicente Amato Neto, Lúcia Maria Almeida Braz, Andréia Otaviani Di Pietro
e José Rafael Módolo

Para diagnosticar a infecção intestinal pelo Cryptosporidium sp, hoje bastante em foco pela não incomum participação no contexto da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), várias técnicas têm sido indicadas. Com o intuito de esclarecer vantagens e desvantagens, envolvendo quantificação, morfologia, durabilidade do esfregaço e tempo de preparação, comparamos os resultados obtidos mediante emprego de dois desses processos, ou seja, de Kinyoun modificado e de Heine, aplicados em amostras fecais de pacientes com AIDS. A sensibilidade foi bastante semelhante e a escolha deve depender da valorização das virtudes de cada uma das técnicas, que são: quanto à de Kinyoun modificada, a durabilidade dos esfregaços e, a propósito da de Heine, a rapidez com que se dá o preparo, aliada à superioridade quando o parâmetro é a quantidade de oocistos encontrados, mais freqüentemente verificada.

Palavras-chaves: Cryptosporidium sp. Diagnóstico. Exame de fezes. Métodos de Kinyoun modificado e de Heine. Comparação.

De distribuição cosmopolita, o *Cryptosporidium sp*, coccídeo implicado em doença intestinal, é detectado conforme freqüência de aproximadamente 10% em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) nos Estados Unidos da América e de 30 a 50% nos países em desenvolvimento⁸. Guizelini, no Brasil, por exemplo, encontrou taxa de 21,2% em doentes com tal afecção e diarreia, atendidos no Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo¹.

Esse agente zoonótico é responsável por acometimento gastrintestinal autolimitado em indivíduos imunocompetentes e por vezes severo em imunodeficientes².

Entre as técnicas de coloração mais utilizadas para a evidencição desse parasita contamos com as de Giemsa, da auramina, de Ziehl-Neelsen e suas modificações, do dimetil-sulfóxido, de Kinyoun e suas alterações, da safranina e de Heine^{6,7}. Também têm sido utilizados anticorpos monoclonais para a pesquisa dos oocistos nas fezes^{1,3,5}.

Mais comumente empregamos o método modificado de Kinyoun, que tem base na propriedade de ácido-resistência do coccídeo. Mais recentemente passamos a recorrer também à coloração negativa de Heine⁷. Para tentar contribuir quanto ao diagnóstico dessa parasitose por meio do exame de fezes, empreendemos o estudo agora relatado a fim de avaliar vantagens e desvantagens desses dois modos de proceder, envolvendo quantificação, morfologia, durabilidade de lâmina e tempo de preparação.

MATERIAL E MÉTODOS

Examinamos 53 amostras de fezes, de pacientes com AIDS, assistidos na Divisão de Clínica de Moléstias Infeciosas e Parasitárias, do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo os exames pedidos para obter ou confirmar diagnósticos e controlar tratamentos. De cada uma, analisamos 3µl de fezes em cada lâmina e para cada técnica, conforme procedimentos a seguir especificados.

Método de Kinyoun modificado: após fixação com metanol, coramos o esfregaço de 3µl por meio da fucsina carbólica, durante 15 minutos; lavamos em água corrente, descoramos com ácido-sulfúrico a 10% por aproximadamente três minutos e, novamente, lavamos em água

Laboratório de Investigação Médica-Parasitologia, do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Endereço para correspondência: Prof. Vicente Amato Neto. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500, 05403-000 São Paulo, SP. Fax: (011) 852-3622

Recebido para publicação em 05/11/95.

corrente; cobrimos a lâmina com azul de metileno a 1%, no decurso de cinco minutos; por fim, lavamos e secamos.

Método de Heine: adicionamos 3µl de fucsina carbólica de Ziehl a 3µl do esfregaço e juntamos uma gota de óleo de imersão e lamínula, após secagem.

RESULTADOS

Em 41 das 53 amostras de fezes estava presente o parasita. A técnica de Kinyoun permitiu o encontro de oocistos em 39 e a de Heine em 38, havendo duas negatividades ao ser aplicada a primeira e três quando empregada a outra. Sempre que um processo falhou o *Cryptosporidium* sp ficou demonstrado pelo considerado na comparação.

A respeito da quantidade de oocistos constatamos: superioridade do método de Kinyoun - 14; superioridade no método de Heine - 26; números iguais - 1 (Tabela 1).

Tabela 1- Quantidades de oocistos de *Cryptosporidium* sp encontrados nos exames efetuados por meio dos métodos de Kinyoun modificado e de Heine.

Amostra	Kinyoun modificado	Heine
1	11	48
2	26	107
3	9	0
4	57	0
5	1	81
6	41	145
7	642	345
8	43	158
9	8	252
10	58	90
11	14	62
12	345	645
13	13	124
14	69	29
15	3	178
16	0	15
17	9	27
18	118	251
19	1	3
20	12	41
21	0	2
22	2	71
23	158	551
24	5	0
25	98	197
26	20	21
27	11	27
28	2	13
29	13	81
30	33	18
31	262	69
32	3	65
33	10	6
34	21	59
35	17	8
36	23	44
37	160	20
38	198	152
39	73	38
40	149	38
41	373	182

Ulteriormente às colorações, de acordo com o que descrevemos, realizamos as pesquisas efetuando quantificação em microscópio óptico, por intermédio de objetivas para aumentos de 1000x (imersão) e 400x a propósito dos processos de Kinyoun modificado e de Heine, respectivamente.

O método de Kinyoun mostra protozoário esférico e vermelho, possibilitando diferenciá-lo de leveduras, mas restos fecais podem causar confusão com oocistos se o examinador não for suficientemente habilitado (Figuras 1 e 2); ainda mais, é viável a existência de oocistos



Figura 1 - Oocistos do *Cryptosporidium* sp corados pelo método de Kinyoun modificado (1000X).



Figura 2 - Restos fecais corados pelo método de Kinyoun modificado (1000X).

"fantasmas", não corados e a esse inconveniente somamos o tempo gasto, de aproximadamente 25 minutos, na coloração (Figura 3). Por seu turno, à técnica de Heine sucede o que se admite interpretar como coloração negativa, vendo-se oocistos acromáticos e com brilho característico, sete minutos após o início da execução (Figura 4); contudo, depois de 30 minutos a visualização da morfologia torna-se prejudicada.

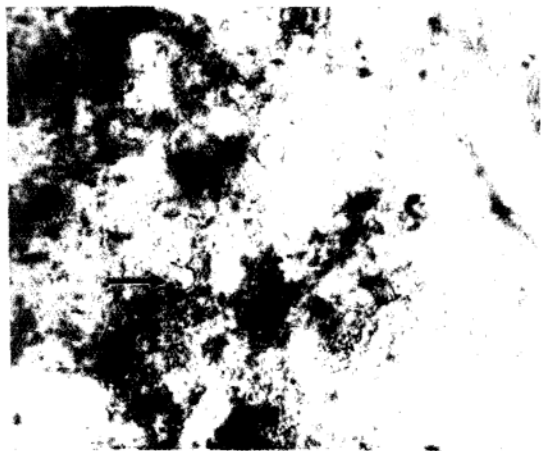


Figura 3 - Oocistos "fantasmas" do *Cryptosporidium* sp encontrados em exame efetuado pelo método de Kinyoun modificado (1000X).

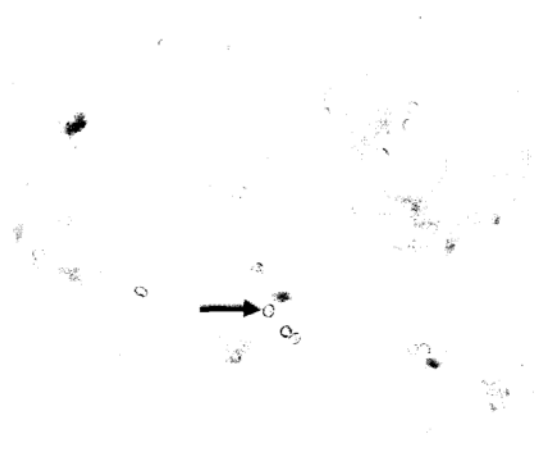


Figura 4 - Oocistos do *Cryptosporidium* sp visualizados ao exame pelo método de Heine (400X).

DISCUSSÃO

O grande e crescente número de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência

humana (HIV), que motiva o desencadeamento da AIDS, faz com que a criptosporidíase seja atualmente parasitose merecedora de cogitação em múltiplas oportunidades, pois o *Cryptosporidium* sp muitas vezes compõe a síndrome em apreço. Em geral o diagnóstico dessa protozoose depende do exame das fezes, executado por intermédio de procedimentos em geral simples. O uso de anticorpos monoclonais sem dúvida concede maiores sensibilidade e especificidade, não podendo porém ter aplicação ampla, como decorrência do elevado custo, quase sempre proibitivo em países do terceiro mundo.

Nos últimos anos o interesse pela pesquisa do parasita nas fezes aumentou bastante e as qualidades de diferentes técnicas passaram a ser objetos de especulações e, nesse âmbito, procuramos contribuir, comparando os resultados obtidos quando empregados os métodos de Kinyoun modificado e de Heine. Notamos que aquele revelou uma positividade a mais, de molde a evidenciar superioridade, não marcante; todavia, em maior porção de ocasiões mostrou números menores de oocistos e para tanto é possível que influam o procedimento de descoloração, além da posterior lavagem em água, favorecendo a soltura de parte do esfregaço. No que tange ao outro processo, as virtudes destacáveis são a rapidez com que se dá o preparo e a superioridade quando o parâmetro é a cifra de oocistos encontrados, mais freqüentemente verificada.

A durabilidade do esfregaço é atributo do processo de Kinyoun modificado, capaz de favorecer a natureza de tarefas específicas e possibilitar exame de diversas lâminas, aumentando assim a sensibilidade.

Expostas essas averiguações, cremos que se torna correto afirmar que a escolha terá vínculo com a valorização das melhores qualidades de cada um dos métodos, na dependência das circunstâncias em que tarefas diagnósticas deverão ocorrer.

SUMMARY

The diagnosis of intestinal infection by Cryptosporidium sp is crucial today; with the progression of the AIDS epidemic, many cases of cryptosporidiosis have appeared in this setting and in other immunodeficiency diseases. We compared the advantages and disadvantages of Heine's

method and modified Kinyoun's method in the following parameters: morphology of the parasite, quantitation of cysts, stability of the staining characteristics timewise on the slides and time spend at staining. All positive fecal smears were obtained from patients with AIDS. The sensitivity of these two techniques was the same. The choice should be made by the best aspects of each method. Heine's was better for quantitation of the cysts and was faster. Kinyoun's was better for conserving the stained smear.

Key-words: *Cryptosporidium* sp. *Diagnosis of cryptosporidiasis. Stool tests for protozoa. Comparison of Heine's and Kinyoun's methods.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arrowood MJ, Sterling CR. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *Journal of Clinical Microbiology* 27:1490-1495, 1989.
2. Campbell PN, Current WL. Demonstration of serum antibodies to *Cryptosporidium* sp in normal and immunodeficient humans with confirmed infections. *Journal of Clinical Microbiology* 18:165-169, 1983.
3. Garcia LS, Brewer TC, Bruckner DA. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 25:119-121, 1987.
4. Guizelini E. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp nas fezes de pacientes com diarreia, mediante emprego de três técnicas de coloração. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.
5. Loose JH, Sedergran DJ, Cooper HS. Identification of *Cryptosporidium* in paraffin-embedded tissue sections with the use of a monoclonal antibody. *American Journal of Clinical Pathology* 91:206-209, 1989.
6. MacPherson DW, McQueen R. Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology* 31:198-202, 1993.
7. Modolo JR, Gonçalves RC, Kuchembuck MRG, Gottschalk AF. Ocorrência de criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu - SP. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 10:9-10, 1988.
8. Petersen C. Cellular biology of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Today* 9:87-91, 1993.