

Detecção de *Cryptosporidium* em amostras fecais por técnica de Nested-PCR e comparação com métodos imunológico e parasitológico

Detection of *Cryptosporidium* in fecal samples tested by Nested-PCR and comparison between immunologic and parasitologic methods.

RIALA6/1006

Aparecida Helena de Souza GOMES^{1*}; Hermínia Yohko KANAMURA²; Marcos Eduardo de ALMEIDA²; Ana Julia Urias dos Santos ARAUJO²

* Endereço para correspondência: Rua Júlio Hanser, 49 – Sorocaba-SP, CEP 18031-490 – e-mail: asgomes.sor@terra.com.br

¹ Divisão de Laboratórios Regionais - Instituto Adolfo Lutz – Laboratório 1 de Sorocaba – SP – Brasil

² Departamento de Biologia da Universidade de Taubaté – UNITAU -Taubaté – SP

RESUMO

A criptosporidiose é causada por protozoários do gênero *Cryptosporidium*. A doença se caracteriza por diarreia aguda no homem e em outros animais. O diagnóstico laboratorial é feito pela detecção do parasito por métodos parasitológicos, imunológicos ou moleculares. Amostras fecais de 29 pacientes portadores de HIV e com AIDS analisadas pelos métodos parasitológico (Kinyoun) e imunológico (ELISA) foram submetidas ao método molecular (Nested-PCR). Destas, 15 amostras foram positivas para *Cryptosporidium sp* no exame parasitológico e 14 negativos para *Cryptosporidium*, mas positivos para outras espécies parasitárias ou bacilos álcool-acido-resistentes. Pela Nested-PCR foram encontradas 16 amostras positivas, e destas, 11 apresentaram resultados concordantes com o exame parasitológico e cinco não. Essas cinco amostras discordantes foram também negativas pelo ELISA. Das 15 amostras positivas pelo exame parasitológico, duas foram negativas pelo Nested-PCR e por ELISA. Os métodos moleculares podem-se constituir em importante ferramenta diagnóstica nos casos com suspeita clínica de criptosporidiose nos estudos epidemiológicos, permitindo a caracterização genotípica do parasito e auxiliando na investigação das rotas de transmissão. As discordâncias observadas entre os diferentes métodos precisam ser mais bem investigadas.

Palavras-Chave. *Cryptosporidium*, diagnóstico por métodos molecular, imunológico, parasitológico

ABSTRACT

Cryptosporidium is a coccidian protozoan that causes diarrhea in human beings, domestic animals, and other vertebrates. Although cryptosporidiosis is self-limited disease in healthy individuals, patients with AIDS usually go through a prolonged life-threatening diarrhea. Cryptosporidiosis laboratory diagnosis has been performed by means of parasite detection using parasitological, immunological, or molecular methods. In the present study 29 samples were selected, being 15 positive and 14 negative for *Cryptosporidium* on Kinyoun staining. All of 29 fecal samples were tested on Nested PCR (N-PCR), and 16 out of 29 samples were N-PCR positive. Among these 16 N-PCR positive samples, 11 were positive on EIA and Kinyoun staining, and five were negative on both techniques. Kinyoun staining detected four positive samples though two of them were negative on N-PCR and EIA. The use of molecular method may improve the diagnosis as the reported sensitivity and specificity rates have been higher the conventional techniques as morphology-based methods. Besides, molecular methods have lately been used to characterize the different genotype of *C. parvum*. Based on the data observed in the present study concerning the considerable discrepancies of results among three laboratory techniques, further investigations have to be performed.

Key Words. *Cryptosporidium*, diagnosis methods, molecular, immunological and parasitological.

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium sp., protozoário da sub classe *Coccidia*, é agente causador de diarreia aguda no homem e outros animais. A gravidade da criptosporidiose está ligada às condições imunológicas do hospedeiro, podendo-se apresentar de forma branda e autolimitada²³ ou como doença grave e crônica, como ocorre nos pacientes imuno-comprometidos, principalmente com AIDS¹⁸.

A criptosporidiose humana pode ser causada por diferentes espécies de *Cryptosporidium*, sendo reconhecidos dois ciclos de transmissão: o antroponótico, no qual o agente envolvido seria *Cryptosporidium hominis* (anteriormente denominado *Cryptosporidium parvum* genótipo I), e zoonótico, no qual estariam envolvidas diferentes espécies, principalmente *Cryptosporidium parvum*^{10,25}. A transmissão do parasito ocorre principalmente por via fecal-oral, com a ingestão de alimentos e água contaminados com fezes de humanos ou animais infectados^{8,12}.

O diagnóstico laboratorial normalmente é feito pela demonstração de oocistos de *Cryptosporidium sp* nas fezes, utilizando-se para concentração, mais comumente, o método de sedimentação em formalina-acetato de etila⁵ e para visualização dos oocistos, diferentes técnicas de coloração, como Ziehl-Neelsen modificado, Kinyoun, Safranina, Auramina e outras¹³. Este método parasitológico apresenta relativa facilidade no preparo dos corantes e reagentes, exige equipamentos já existentes na maioria dos laboratórios que realizam o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. Entretanto, o preparo do esfregaço e a coloração requerem muitas etapas, a microscopia exige a observação em todos os campos, acarretando demora, dificultando assim sua utilização em larga escala^{14,17}.

Novos testes, baseados em princípios imunológicos foram desenvolvidos para análise em amostras fecais. O teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de coproantígenos nas fezes e a reação de imunofluorescência direta (IFD), empregando-se anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* marcados com isotiocianato de fluoresceína. Estes testes quando avaliados demonstraram alta sensibilidade e passível de uso para processamento em grande quantidade de amostras. Embora alguns autores revelassem que os custos do *Kit* de ELISA se apresentaram mais baratos que o de imunofluorescência ou mesmo o exame parasitológico, é necessário o emprego de alguns equipamentos como leitor de ELISA e microscópio para imunofluorescência^{9,14,17}. No Brasil estes *Kits* não estão disponíveis no mercado e não se tem relato de experiências ou uso dos mesmos na rotina laboratorial para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais.

Diferentes técnicas da biologia molecular para detectar *Cryptosporidium* em amostras ambientais e fecais, como a PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), foram desenvolvidas não só com o objetivo de detectar oocistos, como também para estudos epidemiológicos. Estas técnicas têm a vantagem de

permitir a caracterização genotípica das espécies de *Cryptosporidium* responsáveis por surtos e agravos, fornecendo subsídios para investigação de prováveis fontes e vias de transmissão, por outro lado o custo é elevado^{3,10,11,16,22}.

No Estado de São Paulo, nem todos os laboratórios clínicos realizam exames parasitológico para pesquisa de parasitos oportunistas, no caso específico para criptosporidiose¹⁵ demonstrando a não inclusão de métodos específicos na rotina de exame parasitológico de fezes. Este fato contribui para o não conhecimento da prevalência real da criptosporidiose em nosso meio.

O objetivo do presente estudo foi comparar e avaliar os resultados obtidos pelo método molecular (Nested-PCR), com aqueles obtidos pelos métodos parasitológico (Kinyoun) e imunológico (ELISA) na detecção de *Cryptosporidium sp* em amostras fecais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras fecais

Foram utilizadas 29 amostras fecais, provenientes de pacientes portadores de HIV e com AIDS, atendidos no ambulatório e clínica do Conjunto Hospitalar de Sorocaba-SP. Estas foram divididas em 3 partes: a primeira parte foi utilizada para realizar os métodos parasitológicos, a segunda parte congelada para posterior realização do método imunológico e a terceira parte para análise do método molecular.

Método parasitológico

Todas as amostras já haviam sido processadas anteriormente pelos métodos parasitológicos como: Hoffmann, Kato-Katz, Rugai e pelo método de concentração utilizando formol-éter. Após o método de concentração onde foram retiradas impurezas e gorduras o sedimento obtido foi utilizado para preparar esfregaços fecais de cada amostra, os quais foram corados por duas diferentes técnicas: primeiro por auramina, utilizada como triagem; sendo os esfregaços examinados em microscópio de fluorescência com objetiva de 40X e, em segundo, utilizando-se a mesma lâmina de cada amostra, pela coloração de Kinyoun¹³, sendo as lâminas examinadas ao microscópio comum em objetiva de imersão (100X), onde os oocistos antes fluorescentes pela auramina, passaram a apresentar cor vermelho brilhante após a coloração de Kinyoun.

Método imunológico

As amostras fecais foram descongeladas e submetidas ao teste imunoenzimático de ELISA para pesquisa de coproantígenos. Utilizou-se o *kit* comercial, ProSpecT Ensaio Imunoenzimático - *Cryptosporidium* em microplaca (Alexon inc. Biobrás Diagnósticos). As amostras fecais foram diluídas em tampão para diluição de amostra (TDA) conforme instruções do fabricante e colocadas nos orifícios da placa sensibilizada com o anticorpo anti-CSA (*Cryptosporidium* soluble antigen). Após incubação e lavagem com solução salina tamponada

contendo timerosal a 0,1%, foi adicionado o segundo anticorpo, constituído por gamaglobulina total de coelho anti-CSA marcado com a enzima peroxidase. Após nova incubação e lavagem, foi acrescentada a mistura cromógena tetrametilbenzidina + H₂O₂ (TMB). A placa foi coberta e mantida a temperatura ambiente (28°C) durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida, adicionando-se solução de ácido sulfúrico (2%). Utilizaram-se controles positivo e negativo fornecidos no *Kit*. Os testes foram lidos visualmente e em leitor de ELISA (Labsystems), em comprimento de onda de 450 nm. A ausência de cor indicou resultado negativo, ou seja, não ocorrência de complexo anticorpo-antígeno-anticorpo.

Método molecular

Para a realização da Nested-PCR foi efetuada a extração de DNA das amostras fecais conforme protocolo modificado descrito por Da Silva³, utilizando-se o sistema comercial Fast DNA *kit* (BIO 101, Inc., Vista, CA). Uma alíquota de 400 µL de cada amostra fecal foi lavada por duas vezes, por 5 minutos, em PBS-EDTA (tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2, contendo 0,01 M de EDTA) por centrifugação a 14000 rpm a 4°C. Em seguida, em um tubo com capacidade para 2 mL, contendo matriz de lise (Multi Mix 2 Matrix, Cat #6560-215), foram adicionados 300 µL de cada amostra lavada, 400 µL de solução de lise celular (Cell Lysis/DNA Solubilizing Solution for Vegetation - CLS-VF-Cat. #6540-402), 200 µL de solução de precipitação de proteínas (Protein Precipitation Solution - PPS, Cat. #6540-403) e 100 µL polivinil pirrolidona (PVP, Cat #85645-2, Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WWI). As soluções CLS-VF e PVP foram usadas para maximizar a remoção de carboidratos e compostos fenólicos das fezes. Na seqüência, a mistura foi homogeneizada em agitador de tubo (Vortex) na potência máxima durante 1 minuto, para promover o rompimento dos oocistos presentes nas amostras e posteriormente centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante, que continha o DNA, foi transferido para um outro tubo e misturado a 600 µL de matriz de captura (Binding Matrix, Cat. #6540-408). O material foi homogeneizado manualmente por inversão do tubo e deixado por 5 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugado a 14000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em 500 µL de solução de cloreto de sódio diluído em etanol (SEWS-M, Cat.#6540-405) e a matriz de captura foi ressuspensa por meio de cuidadosas e sucessivas micropipetagens. A suspensão foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante novamente descartado. Uma segunda centrifugação a 14000 rpm por 10 segundos foi realizada para a remoção total da solução SEWS-M. O sedimento foi ressuspensionado em 100µL de solução de eluição de DNA (DES, Cat. #6540-406), incubado durante 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugado por 2 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante contendo DNA foi transferido para um tubo limpo.

Após o processo de extração, o DNA eluído foi submetido a processo de purificação, utilizando-se o QIAquick

PCR purification *kit* (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA), com a finalidade de se remover completamente os inibidores de PCR³. Assim, 80 µL do DNA extraído foram misturados com 400 µL do tampão de adsorção (PB), aplicados na coluna QIAquick e centrifugados a 13000 rpm por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 750 µL de tampão de lavagem (PE) e a solução foi centrifugada duas vezes a 13000 rpm por 1 minuto, para que todo o tampão fosse removido. Nestas três etapas as soluções filtradas através da coluna foram retidas em seu tubo de suporte, e foram descartadas. Finalmente, a coluna foi transferida para um tubo limpo, com capacidade de 1,5 mL e, no centro da coluna, foram adicionados 30 µL de tampão de eluição (EB: 10 mM TRIS-HCl, pH 8,5) para eluir o DNA da coluna de sílica gel. Após repouso por 1 minuto, o conjunto foi centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto e o DNA recuperado no filtrado final. Todas as soluções tampão mencionadas estavam contidas no *kit* de purificação. O DNA foi armazenado sob congelamento a -20°C.

A amplificação do DNA foi realizada por Nested-PCR, empregando-se na primeira reação de amplificação o protocolo descrito por Pedrazza-Dias et al.²². Dessa forma, na REAÇÃO 1, um segmento de 769pb do gene COWP foi amplificado com os “primers” BCOWPF (5'-ACC GCT TCT CAA CAA CAA TCT TGT TCC TC-3') e BCOWPR (5'-CGCACCTGT TCC CACTCA ATG TAA ACC CC-3') e, em seguida, baseando-se em Spano²³, o produto obtido foi submetido à REAÇÃO 2 com os “primers” CRY9 (5'GGACTGAAA TACAGG CAT TAT CTT G3') e CRY15 (5'GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G3'), cujos produtos esperados são de 553 pb.

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 25 µL com 2,5 µL do DNA extraído; empregando tampão enzima (20 mM de tris-HCL pH 8,4; 50 mM de KCL); 1,5 mM de MgCl₂; 0,25 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP); 10 pmol de cada “primer” e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 18038-42).

As condições de amplificação em termociclador (Mastercycle Gradient-Eppendorf) foram programadas segundo cada produto desejado como se segue:

REAÇÃO 1: Desnaturação inicial – incubação a 94°C por 5 minutos, **Amplificação** (30 ciclos) – **hibridização** a 65°C por 60 segundos, **polimerização** a 72°C por 60 segundos e desnaturação a 94°C por 60 segundos; **Extensão final** a 72°C por 10 minutos e resfriamento a 4°C e REACAO 2: semelhante a REACAO 1, exceto pela **Amplificação** (30 ciclos) – **hibridização** a 55°C por 30 segundos, **polimerização** a 72°C por 50 segundos e desnaturação a 94°C por 50 segundos.

Os produtos das reações foram detectados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador ultravioleta e, em seguida, digitalizados (Kodak Digital Science 1D™).

Análise estatística

Os cálculos relativos ao coeficiente Kappa para a análise de concordância entre os resultados obtidos nos diferentes métodos diagnósticos foram realizados pelo programa Epi-Info⁴.

Para interpretação dos valores do coeficiente Kappa utilizaram-se os critérios apresentados por Fleis (1985)⁷.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra que as quinze amostras fecais apresentaram resultado positivo para *Cryptosporidium* pelo método parasitológico (KINYOUN), duas mostraram resultado negativo pelo método de ELISA (amostras 4 e 9) e quatro foram negativas pelo método N-PCR (amostras nº 4, 9, 12 e 15). As amostras 4, 9 e 15 foram avaliadas mais de uma vez pelos métodos parasitológico e ELISA.

Na análise das 14 amostras fecais negativas para *Cryptosporidium* pelo método parasitológico (KINYOUN) mas positivas para outras parasitoses detectadas anteriormente pelos métodos parasitológicos (Direto, Hoffmann, Kato-Katz e Rugai) ou com presença de Bacilos Álcool Ácido Resistente (BAAR), pode-se observar que as amostras nº 2, 3, 9, 11 e 12 apresentaram resultados positivos para *Cryptosporidium* pelo método molecular (N-PCR), mas foram todas negativas no método imunológico (ELISA). As amostras 2, 3, 9, 11 e 12 foram avaliadas mais de uma vez pelo método ELISA (Tabela 2).

A análise comparativa dos resultados obtidos nos métodos de detecção de *Cryptosporidium* (ELISA e KINYOUN) e (N-PCR e KINYOUN) pode ser observada na Tabela 3. Das 29 amostras testadas no método de KINYOUN, 15 foram positivas

e 14 foram negativas. No método ELISA, 13 foram positivas e 16 foram negativas. No método N-PCR, 16 foram positivas e 13 foram negativas. Os índices de concordância e discordância para os métodos estudados apresentaram coeficiente Kappa = 0,862 para os métodos (ELISA e KINYOUN) e coeficiente Kappa = 0,378 para os métodos (N-PCR e KINYOUN).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente trabalho a coloração de auramina como método de triagem permitiu observar os oocistos de *Cryptosporidium* fluorescentes, facilitando assim um rastreamento rápido na lâmina com a objetiva de 40X. Nas lâminas com organismos fluorescentes, foi feita a confirmação por meio da coloração de Kinyoun, identificando os oocistos de *Cryptosporidium* pelas suas características morfológicas e pela coloração rosa intenso ou vermelho brilhante.

A sensibilidade do método é diminuída em amostras contaminadas com grande quantidade de leveduras ou baixa concentração de oocistos nas fezes e a correta identificação dos oocistos ao microscópio requer um profissional experiente e bem treinado. Estas observações já foram anteriormente apontadas por outros autores^{6,14,17}.

Em nosso estudo os resultados obtidos no método ELISA apresentou índice Kappa de 0,862 em relação ao método parasitológico (Tabela 3), nível de concordância

Tabela 1. Resultados obtidos em amostras fecais de pacientes portadores do vírus HIV e com AIDS utilizando os métodos imunológico (ELISA) e molecular (N-PCR) para 15 amostras positivas para *Cryptosporidium* pelo método parasitológico (KINYOUN), sendo algumas associadas a outras parasitoses detectadas anteriormente pelos métodos parasitológicos (Direto, Hoffmann, Kato-Katz e Rugai).

| AMOSTRA | OUTROS PARASITOS ASSOCIADOS | KINYOUN | ELISA | N-PCR |
|---------|--|---------|-------|-------|
| 1 | <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 2 | <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 3 | <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 4 | <i>Cryptosporidium</i> | P* | N* | N |
| 5 | <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 6 | <i>Entamoeba coli</i> e <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 7 | <i>Ascaris lumbricoides</i> e <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 8 | <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 9 | <i>Cryptosporidium</i> | P* | N* | N |
| 10 | <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 11 | <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 12 | <i>Cryptosporidium</i> | P | P | N |
| 13 | <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 14 | <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> | P | P | P |
| 15 | <i>Cryptosporidium</i> | P* | P* | N |

P = Positivo; N = Negativo; * = amostras avaliadas mais de uma vez

ELISA = Ensaio imunoenzimático; N-PCR = "Nested"- Reação de Polimerase em Cadeia; KINYOUN = coloração para análise parasitológica

aceitável entre os métodos⁷. Apenas duas amostras apresentaram resultados discordantes entre as 29 amostras testadas, foram positivas pelo método morfológico e negativas pelo ELISA (Tabelas 1 e 2). A especificidade do ELISA foi máxima (100%), quando testadas com 14 amostras negativas para *Cryptosporidium* pelo método parasitológico (Tabela 2). Os dois resultados negativos obtidos no teste ELISA, podem ter ocorrido por fatores de interferência como presença de inibidores, baixa concentração de oocistos, variação antigênica entre espécies e outros¹⁴.

Neste trabalho, o método de ELISA apresentou muita facilidade no manuseio e foi de rápida execução, levando em

consideração o número de testes realizados. A leitura pode ser feita visualmente ou em leitor de ELISA, não tendo sido observados resultados inconclusivos. As instruções contidas no *kit* comercial empregado não contemplam informações quanto à espécie ou o genótipo de *Cryptosporidium* utilizado para a produção de anticorpo anti-CSA. A possibilidade de ocorrência em nosso meio de diferentes espécies de *Cryptosporidium*, apresentando configurações antigênicas não reconhecidas pelo anticorpo anti CSA do *kit*, poderia justificar os dois resultados negativos. Doing et al.⁶ mencionam que a sensibilidade do ELISA é superior ao método parasitológico, mas citam problemas com relação à especificidade.

Tabela 2. Resultados obtidos em amostras fecais de pacientes portadores do vírus HIV e com AIDS utilizando os métodos imunológico (ELISA) e molecular (N-PCR) para 14 amostras negativas para *Cryptosporidium* no método parasitológico (KINYOUN), mas positivas para outras parasitoses detectadas anteriormente pelos métodos parasitológicos (Direto, Hoffmann, Kato-Katz e Rugai) ou amostras com presença de Bacilo Álcool Ácido Resistente (BAAR).

| AMOSTRA | AGENTES PARASITÁRIOS | ELISA | N-PCR |
|---------|--|-------|-------|
| 1 | <i>Giardia duodenalis</i> | N | N |
| 2 | <i>Giardia duodenalis</i> | N* | P |
| 3 | <i>Giardia duodenalis</i> | N* | P |
| 4 | <i>Isospora belli</i> | N | N |
| 5 | <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba coli</i> | N | N |
| 6 | <i>Strongyloides stercoralis</i> | N | N |
| 7 | <i>Strongyloides stercoralis</i> + Ancilostomatidae | N | N |
| 8 | <i>Strongyloides stercoralis</i> + Ancilostomatidae | N | N |
| 9 | Ancilostomatidae | N* | P |
| 10 | Ancilostomatidae | N | N |
| 11 | <i>Trichuris trichiura</i> | N* | P |
| 12 | <i>Endolimax nana</i> | N* | P |
| 13 | BAAR | N | N |
| 14 | BAAR | N | N |

P = Positivo; N = Negativo; * = amostras analisadas mais de uma vez

ELISA = Ensaio imunoenzimático; N-PCR = "Nested"- Reação de Polimerase em Cadeia; KINYOUN = coloração para análise parasitológica

Tabela 3. Resultado comparativo entre os métodos imunológico (ELISA), molecular (N-PCR) e parasitológico (Kinyoun), para detecção de *Cryptosporidium* em 29 amostras fecais de pacientes portadores do vírus HIV e com AIDS.

| | ELISA (1) | | N-PCR (2) | | TOTAL DE AMOSTRAS | |
|---------|-----------|----|-----------|----|-------------------|----|
| | P | N | P | N | | |
| KINYOUN | P | 13 | 2 | 11 | 4 | 15 |
| | N | ∅ | 14 | 5 | 9 | 14 |
| TOTAL | | 13 | 16 | 16 | 13 | 29 |

Índice Kappa (1) = 0,862; Índice Kappa (2) = 0,378

P = Positivo; N = Negativo; ∅ = Zero

ELISA = Ensaio imunoenzimático; N-PCR = "Nested"- Reação de Polimerase em Cadeia; KINYOUN = coloração para análise parasitológica

Diferentes protocolos foram propostos para detectar infecção por *Cryptosporidium* a partir de amostras fecais, por meio do método molecular^{2,19,20,22}.

Os estudos realizados por Balatbat et al.²; Pedraza-Diaz et al.²² demonstraram que algumas variações da técnica de PCR, como Nested-PCR, podem apresentar sensibilidade 100 vezes maior em relação à técnica de imunofluorescência. No presente trabalho utilizou-se a Nested PCR (N-PCR), realizando uma primeira amplificação gerando um fragmento de 769 pb, do gene COWP, com os “primers” BCOWPF e BCOWPR, e posteriormente uma segunda amplificação gerando um fragmento de 553 pb, com os “primers” CRY9 e CRY15.

A técnica de N-PCR possibilitou o encontro de cinco amostras positivas, que haviam sido negativas por Kinyoun e ELISA (Tabela 2). Entretanto, quatro amostras positivas pelo parasitológico e ELISA apresentaram resultados negativos por N-PCR (Tabela 1). Resultados negativos obtidos por método molecular, em amostras positivas no método morfológico, foram também observados por vários autores, que alegam diferentes fatores de interferência, como a baixa concentração de oocistos, condições inadequadas de armazenagem e conservação das amostras, existência de grande quantidade de substâncias inibidoras de PCR em material fecal, falhas na extração e outros^{2,3,11,19,20,21,22}.

A coloração feita pelo Kinyoun pode ser ainda considerada como uma boa estratégia diagnóstica pra ser utilizado na rotina laboratorial, pois apresenta boa sensibilidade e baixo custo, embora apresente limitações quanto a subjetividade na microscopia e tempo para execução de todas as etapas.

O teste ELISA, devido à possibilidade de automação, constitui método de escolha para estudos epidemiológicos e investigação de surtos de diarreia, em situações onde há necessidade de processar grande número de amostras.

A introdução de um método molecular (PCR e N-PCR) aplicável ao diagnóstico da criptosporidiose tem como limitação o desenvolvimento de uma técnica de extração do DNA, de fácil execução e baixo custo, a partir de matéria fecal, uma vez que é comum a presença de inibidores de PCR neste tipo de material. O método molecular (N-PCR), necessita ainda de aprimoramentos quanto a sua praticidade de execução, antes de ser introduzida como método diagnóstico no nosso meio. A sua utilização abriu perspectivas para se introduzir estudos de caracterização genotípica dos isolados encontrados em indivíduos imunocomprometidos ou não, permitindo uma melhor investigação quanto às fontes de infecção nos vários surtos de diarreia por criptosporidiose que vem sendo relatados em nosso meio, principalmente em creches^{1,15}. O desconhecimento por parte dos clínicos e demais profissionais da saúde com relação à importância de *Cryptosporidium* como um dos possíveis agentes patogênicos a serem pesquisados em situações de diarreia, deixam sem investigação casos de criptosporidiose e mesmo surtos de diarreia por este patógeno, pois a técnica de

concentração da amostra fecal pelo formol-éter e as técnicas de coloração (auramina e Kinyoun) não são normalmente utilizadas pelos laboratórios clínicos que realizam o exame parasitológico de fezes, portanto não detectam *Cryptosporidium*. O método específico além de auxiliar o clínico para uma conduta terapêutica correta, pode também, fornecer subsídios para estudos epidemiológicos, e nesses casos os métodos moleculares seriam de grande valia para a caracterização genotípica dos isolados.

Os métodos moleculares aplicados e adaptados para detecção e caracterização de *Cryptosporidium* em amostras ambientais, podem favorecer uma melhor compreensão dos mecanismos de transmissão desse parasito cosmopolita e de ampla distribuição em nosso meio.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa concedido.

À Renata Alarcon bolsista da FAPESP na UNITAU-SP e Izabel M. Armelin funcionária do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Sorocaba pela colaboração prestada durante a execução dos ensaios laboratoriais.

REFERÊNCIAS

1. Alcântara, L. M. et al. Infecção por *Cryptosporidium* em crianças de creche de uma comunidade marisqueira em Encarnação de Salinas – BA. **J. Bras. Parasitol.** Anais -XV Congresso Latino- Americano de Parasitologia (Suppl), 94, 2001 – São Paulo – Brasil.
2. Balatbat, A. B. et al. **Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by Nested PCR.** *J. Clin. Microbiol.*, **34**: 1769-72, 1996.
3. Da Silva, A. J. et al. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. **Mol. Diagn.**, **4**: 57-64, 1999.
4. Dean A, G. et al. Epi Info, version 6: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputer. **Center of Disease Control on Prevention**, Atlanta, Georgia, U.S.A, 1994.
5. De Carli, G. A. Exame macroscópico e microscópico da amostra fecal fresca e preservada. In: __ **Parasitologia Clínica**. São Paulo: Atheneu. 2001. p. 27-81.
6. Doing, K. M. et al. False positive results obtained with the Alexon ProSpect *Cryptosporidium* Enzyme Immunoassay. **J. Clin. Microbiol.** **37**: 1582-3, 1999.
7. Fleis, A. R. Clinical epidemiology. In: _ **The architecture of clinical research**. Philadelphia: WB Saunders. 1985, p. 185-6.
8. Gamba, R. C. et al. Detections of *Cryptosporidium sp* oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo – Brazil. **Braz. J. Microbiol.** **31**: 151-3, 2000.
9. Garcia, L. S; Shimizu, R. Y. 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.** **35**: 1526-9, 1997.
10. 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. **J. Clin. Microbiol.**, **41**: 1458-62, 2003.
11. Gobet, F. et al. A detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in formed human feces by a sensitive PCR- based assay including Uracil-N-Glycosylase inactivation. **J. Clin. Microbiol.** **35**: 254-6, 1977.

12. Gomes, A. H. S. et al. Monitoramento das condições higiênico sanitárias das alfaves produzidas no município de Ibiúna- SP, Brasil. [Suplemento científico, Anais XXV Congresso Latino- Americano de Parasitologia de 7 a 11 de outubro de 2001 – São Paulo – Brasil]. **J. Bras. Parasitol.** 37: 94, 2001.
13. Healy, G. R.; Garcia, L. S. Intestinal and Urogenital Protozoa. In: Murray, P. R.; Baron. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 6th ed. Washington (D.C) ASM Press. 106: 1204-28, 1995.
14. Ignatius, R. et al. Efficacy of different methods for detection of low *Cryptosporidium parvum* oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimens- **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 16: 732-6, 1997.
15. Informenent- DTA. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (tabela de 1995 a 2002). Dados Estatísticos São Paulo, 2002. DDTHA/CVE-SES/ SP. Available from:URL:<http://www.cve.saude.sp.gov.br> [cited sept 2003].
16. Johnson, D.W. et al. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. **Appl. Environ Microbiol.** 61: 3849-55, 1995.
17. Kehl, K.S.; Cicirello, H.; Havens, P.L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **J. Clin. Microbiol.** 33: 416-8, 1995.
18. Lasser, K. H.; Lewin, K. L.; Ryning, F. W. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. **Hum. Pathol.** 10: 234-40, 1979.
19. Laxer, M.A.; Timblin, B.K.; Patel, R. J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 45: 688-94, 1991.
20. Morgan, U. M. et al. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **J. Clin. Microbiol.** 36: 995-8, 1998.
21. Orlandi, P. A.; Lampel, K. A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic Protozoa. **J. Clin. Microbiol.** 38: 2271-7, 2000.
22. Pedraza-Dias, S. et al. Nested Polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocysts wal protein gene. **Emerg. Infect. Dis.** 7: 49-56, 2001.
23. Perez-Schael, I. et al. Cryptosporidiosis in Venezuelan children with acute diarrhea. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 34: 721-2, 1985.
24. Pieniazek, N. J. et al. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV- infected persons. **Emerg. Infect. Dis.** 5: 444-9, 1999.
25. Spano, F. et al. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocysts wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiol Lett.** 150: 209-17, 1997.