

Cryptosporidium spp.: avaliação de corante fluorescente benzazólico em esfregaços fecais

Sandra Márcia Tietz Marques
Valter Stefani

RESUMO

Este trabalho avalia o uso de corante fluorescente do grupo dos compostos heterocíclicos benzazólicos em protocolo diagnóstico para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em lâminas de esfregaços fecais. De um total de 578 amostras fecais foram selecionadas 54 (9,34%) positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp., evidenciadas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (ZNM) e testadas com o corante fluorescente 2-(2'-hidroxi-5'aminofenil) benzoxazol isotiocianato (BzICT). A leitura das lâminas observadas em microscopia de epifluorescência confirmou todas as amostras positivas por ZNM. O corante fluorescente mostrou fotoestabilidade nas lâminas de esfregaços fecais. Este corante está ainda sendo investigado sob outras condições, tais como amostras fecais frescas, diferentes tempos de impregnação do fluorocromo, trocas nos valores de pH e esforço para reduzir o *background* de outros componentes das amostras fecais, como restos de material celulósico.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp.. Oocistos. Compostos benzoxazólicos. Fluorocromo.

Cryptosporidium spp.: evaluation of a benzazolic fluorescent dye in fecal smears

ABSTRACT

This study assesses the use of a fluorescent dye of the group of benzoxazole heterocycles in a diagnostic protocol for *Cryptosporidium* spp. oocysts using fecal smears. Of 578 fecal samples submitted to the modified Ziehl-Neelsen (mZN) method and tested with fluorescent dye 2-(2'-hydroxy-5'aminophenyl) benzoxazole isothiocyanate (BzICT), 54 (9.34%) were positive for *Cryptosporidium* spp. oocysts. Epifluorescence microscopy confirmed that all samples were positive in the mZN. The fluorescent dye showed photostability of fecal smears. This fluorochrome is still being investigated under other conditions, such as the use of fresh stool specimens, different fluorochrome impregnation times, change in pH value, and attempt to reduce the background in other fecal sample components as, for instance, in remnants of cellulosic material.

Keywords: *Cryptosporidium* spp.. Oocysts. Benzoxazole compounds. Fluorochrome.

Sandra Márcia Tietz Marques – Médica Veterinária, Dra., Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS. Pesquisa como parte do estágio de Pós-doutorado no Instituto de Química da UFRGS sob a supervisão do Prof. Dr. Valter Stefani.

Valter Stefani – Químico, Prof. Titular, Dr. Instituto de Química, Laboratório de Novos Materiais Orgânicos (LNMO) da UFRGS.

Endereço para correspondência: S. M. T. Marques. Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000. Porto Alegre/RS, Brasil. Fone: (51) 3308.6136. E-mail: smtmuni@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium spp. é um protozoário intracelular extracitoplasmático que parasita a superfície das células epiteliais intestinais sem entrar no interior delas, ocorrendo em outros sítios teciduais, dependente da espécie e do grupo zoológico hospedeiro. Há diagnóstico em mais de 150 espécies de mamíferos, e responsável em humanos pela diarreia de verão e diarreia dos viajantes (ACHA; SZYFRES, 2005; FAYER, 2008; XIAO; RYAN, 2008).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que as infecções são mais comuns e amplas que previamente se pensava e o predomínio de infecções em animais ou populações humanas é difícil de determinar com algum grau de precisão. Muitos pacientes apresentam quadro clínico de severa doença, o suficiente para ter garantida a atenção médica e/ou veterinária. Embora a verdadeira extensão de infecção por *Cryptosporidium* permaneça conjuntural, a importância como patógeno animal e humano tem se tornado mais reconhecida através do número crescente e diversidade de casos clínicos registrados ao redor do mundo (LUNA, 2002; YOIDER; BEACH, 2007; PUTIGNANI; MENICHELLA, 2010).

A identificação dos oocistos do parasito é obtida com técnicas parasitológicas rotineiras de baixo custo, porém de valor limitado pela baixa sensibilidade (TEE et al., 1993; KEHL et al., 1995; HUBER et al., 2004). A imunofluorescência incrementa a sensibilidade em comparação com estes métodos (CONNALLY et al., 2006) e técnicas moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade (AARNAES et al., 1994; PETRY; HARRIS, 1999; CACCIO, 2004), porém o fator limitante é seu alto custo para a rotina (PAUL et al., 2009).

Compostos heterocíclicos benzazólicos são alvo de grande investigação em função de suas propriedades fotoemissoras devido a seu maior rendimento quântico de fluorescência em relação a outros fluoróforos. A família dos benzazóis é bastante utilizada para esse fim, uma vez que apresenta transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT) e, como consequência, uma maior estabilidade fotoquímica (STEFANI et al., 2003). Sua elevada fluorescência tem motivado pesquisas visando aplicações como corantes para laser e ótica não linear, monômeros para a síntese de polímeros fluorescentes ou como sondas para marcação de proteínas (HOLLER et al., 2002; CORBELLINI, 2004).

Este experimento avalia pela primeira vez a potencialidade do uso do composto 2-(2'-hidroxi-5'aminofenil) benzoxazol isotiocianato (BzICT) como corante fluorescente para a marcação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em lâminas de esfregaços fecais.

MATERIAL E MÉTODOS

Teste de concentração dos corantes benzazóis

Os corantes e as soluções utilizadas na investigação desta metodologia variaram de concentrações de 10^{-3} a 10^{-6} . O teste inicial utilizou amostras fecais caninas (material

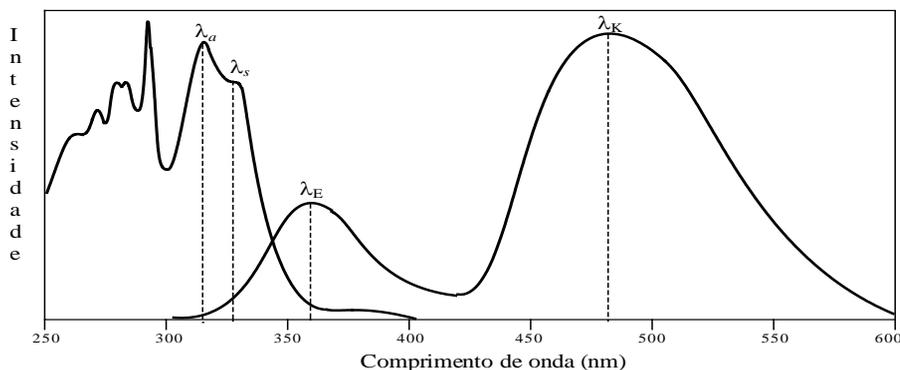
estoque) com quantidade suficiente de oocistos para os testes de concentração com o objetivo de resguardar os esfregaços fecais das espécies a serem avaliadas. Foram confeccionadas lâminas de esfregaços fecais de amostras previamente positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em número suficiente para os testes reativos de fluorescência, observados em microscópio de epifluorescência marca Zeiss Axiolab. O protótipo escolhido foi 2-(2'-hidroxi-5'aminofenil) benzoxazol isotiocianato na concentração 3×10^3 molar.

Obtenção de 2-(2'-hidroxi-5'aminofenil) benzoxazol – 3×10^3 molar

Em um balão de 50 mL foram misturados e aquecidos até a solubilização 9,8 g de ácido fosfórico 85 % e 10,2 g de pentóxido de fósforo. Em seguida foram adicionados 1,64 g de *orto*-aminofenol e 2,3 g de ácido 5-aminosalicílico, degaseificou-se com nitrogênio e aqueceu-se por 2 h a 180-190 °C e 2 h a 220-230 °C. O conteúdo do balão foi vertido em 50 mL de água, neutralizado com solução saturada de bicarbonato de sódio, filtrado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e extraído em Soxhlet contendo sílica 70-230 mesh por uma semana com hexano: diclorometano 1:1. A evaporação do solvente produziu 2,2 g (65 %) de cristais amarelos em forma de agulhas com fluorescência cor alaranjada à luz UV (365 nm) e Razão de eluição (Rf) em Cromatografia de Camada Delgada (CDD) idêntico ao de amostra previamente preparada no laboratório.

A concentração da solução testada consistiu de 3×10^3 molar do fluorocromo em etanol como solvente. A espectroscopia de emissão de fluorescência foi obtida através do registro do espectro de fluorescência em um espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500. Os comprimentos de onda dos máximos de emissão e excitação foram expressos em nanômetros (nm), e utilizadas cubetas de quartzo de 1cm de caminho ótico (FIGURA 1).

FIGURA 1 – Modelo de espectro de absorção (à esquerda) e de emissão (à direita) de 2-(2'-hidroxi-5'aminofenil) benzoxazol.



Fonte: Corbellini, 2004, p.77.

Esfregaços fecais

De um total de 578 amostras fecais foram utilizados 54 amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo método de Ziehl-Neelsen modificado (ZNm), distribuídos em: 18 amostras de suínos (4,6%) e 25 de equinos (27,8%). As 11 amostras fecais de animais cativos em zoológico foram obtidas de um exemplar de: *Alouatta caraya*, *Aotus nigriceps*, *Ateles chamek*, *Puma concolor*, *Sphiggurus villosus*, *Dama dama*, *Cervus unicolor*, *Kobus ellipsiprymnus* e *Myrmecophaga tridactyla* e dois exemplares *Rhea americana* (TABELA 1). Os esfregaços positivos corados pela técnica de ZNm (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981) formaram o grupo controle. As amostras foram consideradas positivas quando ao menos um oocisto com correta morfologia (4.6-5.6 um X 4- 4.8 um) e coloração foram identificados.

TABELA 1 – Diagnóstico parasitológico através da técnica de Ziehl-Neelsen modificada em esfregaços fecais, segundo Henriken e Pohlenz (1981).

Animais	Número de amostras fecais	ZNm (%)
Equinos	90	25 (27,8)
Suínos	390	18 (4,6)
Cativos de Zoo	92	9 (9,8)
Emas	6	2 (33,3)
TOTAL	578	54 (9,34)

Uma fração das fezes de cada amostra positiva foi homogeneizada e centrifugada. Uma alíquota de sedimento, resultante da centrifugação, foi depositada em lâmina de vidro numerada, totalizando 54 esfregaços fecais. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, fixadas em metanol, por 1 minuto, e submetidas a secagem com fogo. Estas lâminas formaram o grupo teste e foram submetidas à metodologia com 2-(2'-hidroxi-5'aminofenil) benzoxazol isotiocianato na concentração de 3×10^3 molar.

Teste de 2-(2'-hidroxi-5'aminofenil) benzazol isotiocianato (BzICT)

Os esfregaços fecais foram secos à temperatura ambiente. As lâminas foram submetidas à fixação em metanol durante 1 minuto e secas pelo fogo; no passo seguinte, 2 ml da solução 2-(2'-hidroxi-5'aminofenil) benzazol isotiocianato cobriu toda a lâmina, sendo mantida em incubação por 5 minutos; em seguida descorada 2 vezes com ácido clorídrico 0,5% em metanol absoluto, intercalando com lavagem em água corrente e deixada para secar à temperatura ambiente.

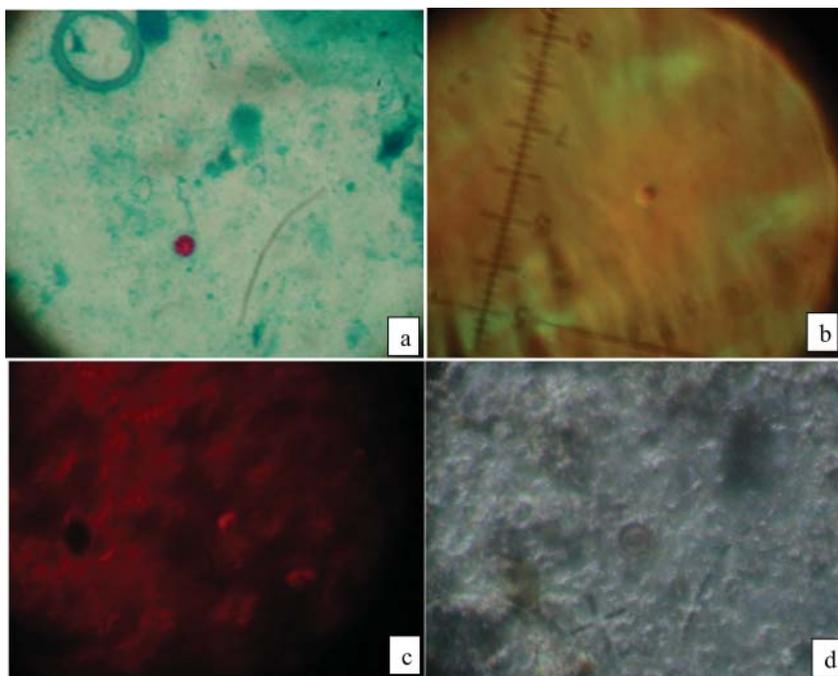
As lâminas com os esfregaços prontos foram examinadas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em microscópio de epifluorescência equipado com

uma lâmpada Hg 100 w marca Osram de alta pressão de mercúrio, com filtro UV-2A (330-380 nm) para derivados benzoxazólicos (CORBELLINI, 2004) e filtros de barreira violeta (V), verde (G) e azul (B) e visualizados e fotografados em objetivas 40X e 100X, utilizando microscópio marca Zeiss Axiolab. As imagens foram capturadas usando uma máquina digital Sony.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados por ZNm em 54/578 (9,34%) dos esfregaços (TABELA 1), variando na quantidade de oocistos por amostra fecal. Cada esfregaço fecal submetido à análise por microscopia óptica e de epifluorescência foi esquadrinhado em toda a sua extensão. Pelo método ZNm os oocistos são visualizados corados de rosa, contra um fundo verde, correspondendo a lâmina controle (Figura 2a). A solução 2-(2'-hidroxi-5' aminofenil) benzazol isotiocianato confirmou todas as amostras positivas (FIGURAS 2b-d).

FIGURA 2 – a. Oocisto de *Cryptosporidium* spp. em esfregaço fecal de suíno corado por ZNm (aumento 100X) – b. Oocisto em esfregaço fecal de suíno corado com BzlCT (100X – Filtro UV) – c) oocisto em esfregaço fecal de *Rhea americana* corado com BzlCT (100X – Filtro G) – d) Oocisto em esfregaço fecal de equino corado com BzlCT (100X – Filtro UV).



Este é o primeiro estudo que utiliza 2-(2'-hidroxi-5'aminofenil) benzazol isotiocianato (BzICT) para avaliar a reatividade em oocistos de *Cryptosporidium* spp. obtidos de esfregaços fecais confeccionados em lâminas de vidro.

As técnicas de concentração e flutuação permitem melhorar a sensibilidade e quantificar a excreção de oocistos, importantes para estudos epidemiológicos, com facilidade de execução, rápida obtenção de resultado e guarda permanente de material. Entretanto, técnicas imunológicas tem maior sensibilidade que as técnicas de esfregaços fecais para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. Porém, Casemore et al. (1985) e Tee et al. (1993) relataram que a metodologia preferida é a combinação de técnicas que utilizem um corante fluorescente e o método de ZNm, para ampliar a possibilidade de resultado positivo, pois só o método de ZNm pode resultar em não identificação de oocistos em infecção leve.

Em relação a outras metodologias empregadas, a performance dos testes fenol-auramina e imunofluorescência foram suficientemente comparáveis para suportar o uso de mais de um método como procedimento de rotina, embora com custo maior quando se utiliza kit de imunofluorescência ou PCR, podendo limitar seu uso (TEE et al, 1993; PAUL et al., 2009).

As técnicas baseadas em fluorescência provêm um meio eficiente para qualificar e quantificar o diagnóstico de biomoléculas, significando suficiência na detecção de uma simples molécula quando as condições são otimizadas, tendo-se apenas o cuidado de discriminar daquelas de autofluorescência. Técnicas de seleção espectral são úteis para suprimir a autofluorescência mas nem sempre são aplicáveis, por causa da abundância e alcance espectral de autofluoróforos (CONNALLY et al., 2006). Nesta pesquisa não ocorreu a presença de material autofluorescente, o que permitiu que se descartasse o confundimento com outras estruturas biológicas presentes nas fezes.

Quanto à visualização dos oocistos, houve diferença no aspecto de tridimensionalidade das amostras positivas submetidas à microscopia de epifluorescência (Figuras 2b-d), provavelmente dependente da composição do material fecal, podendo esta diferença estar relacionada à dieta alimentar, ou pela espessura do esfregaço ou ainda pela diferente impregnação do fluoróforo que interagiria de maneira diferenciada com as camadas hidrofóbica e/ou lipofílica da parede dos oocistos.

Embora não exista um padrão internacionalmente aceito sobre critérios de validação de técnicas laboratoriais para o diagnóstico de rotina em criptosporidiose, verifica-se que os resultados por nós encontrados, até o presente, ainda não foram totalmente satisfatórios, em qualidade de imagem e facilidade na visualização. Deparamo-nos com algumas limitações decorrentes do ineditismo. Técnicas parasitológicas e de colorações rotineiras como os métodos de Willis-Mollay, de Faust et al., coloração com fuccina fenicada ou auramina também tem limitações, principalmente aquelas que utilizam para o diagnóstico a microscopia óptica e reagentes de baixo custo, que é o mais comum em laboratórios de países menos desenvolvidos. Além disso, o diagnóstico de criptosporidiose necessita ainda de observador “expert” porque os oocistos são de dimensões reduzidas e podem

ser confundidos com outras estruturas biológicas parasitárias de patogenicidade importante nas espécies animal e humana.

As benzoxazolas apresentam fotossmaecimento praticamente nulo devido ao mecanismo de fotoexcitação e fotoemissão, que rapidamente regenera a população de moléculas no estado fundamental mesmo em exposição continuada de excitação o que facilita a análise microscópica, de material marcado por maior tempo, como o relatado por Corbellini (2004) quando utilizou este corante em amostras fúngicas.

Em nosso entender, minimizar a perturbação do sistema biológico é o maior desafio, o que talvez possa ser resolvido utilizando técnica de desagregação física das fezes para remover debris contaminantes e visualizar com maior facilidade os oocistos em esfregaços fecais.

Aperfeiçoar as condições do protocolo de diagnóstico, pela redução dos passos da técnica ou a melhor impregnação do fluorocromo no oocisto é o que devemos alcançar. Outro ponto ainda não esclarecido é como os oocistos do gênero *Cryptosporidium* se comportam frente às ligações oocisto-fluorocromo. O que buscamos é dar maior destaque aos oocistos nas lâminas de esfregaços fecais e facilitar a identificação do agente, podendo dar retorno de resultado diagnóstico mais rápido e de melhor relação custo-benefício.

CONCLUSÃO

Nas condições em que foi executado este estudo, conclui-se que os oocistos detectados com a solução de 2-(2'-hidroxi-5' aminofenil) benzazol isotiocianato mostraram grande fotoestabilidade nas lâminas de esfregaços fecais, o que é um resultado muito importante tendo em vista que a maior parte dos fluorocromos normalmente usados em microscopia de epifluorescência apresentam elevado fotossmaecimento (*photobleaching*) em curto espaço de tempo. Do mesmo modo, este fluorocromo ainda é um candidato que deve ser avaliado sob outras condições, como a utilização de amostras fecais frescas, diferentes tempos de impregnação do fluorocromo e esforço no sentido de reduzir o *background*, relacionado à impregnação do fluoróforo nos outros componentes da amostra fecal como, por exemplo, em restos de material celulósico.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado em parte pelo CNPq (projeto Universal 475126/2008-4) e UFRGS (projeto número 14295) como parte do programa de Pós-doutorado da UFRGS (Sandra M. T. Marques) no Laboratório de Novos Materiais Orgânicos (LNMO) do Instituto de Química da UFRGS. Agradecemos também ao biólogo Rodrigo Ludwig pelas amostras obtidas dos animais do zoológico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul; ao professor Dr. David E. S. N. de Barcellos (UFRGS) e ao Médico Veterinário Ricardo T. Lippke pelas amostras fecais de suínos.

REFERÊNCIAS

- AARNAES, S. L. et al. Comparison of the ProSpecT and Color Vue enzyme-linked immunoassays for the detection of *Cryptosporidium* in stool specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.19, p.221, 1994.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonoses et Maladies Transmissibles Communes à l'Homme et aux Animaux, 3.ed., 2005. Office International des Epizooties, Paris.
- CACCIO, S. M. New methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parassitologia*, v.46, n.1-2, p.151-155, 2004.
- CASEMORE, D. P.; ARMSTRONG, M.; SANDS, R. L. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J. Clinical Pathology*, v.38, p.1337-1341, 1985.
- CONALLY, R.; JIN, D.; PIPER, J. High intensity solid-state UV source for time-gated luminescence microscopy. *Cytometry Part A*, 69A, p.1020-1027, 2006.
- CORBELLINI, V. A. *Síntese e avaliação de propriedades fotofísicas e biológicas de 2-(2'-hidroxifenil) benzoxazolas e cumarinas em fungos de interesse clínico*. 2004. Tese. (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004. 332p.
- FAYER, R. Biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. (Eds.). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, 2.ed., CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, p.1-42, 2008.
- HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veter. Scand.*, v.22, n.3-4, p.594-596, 1981.
- HOLLER M. G. et al. Synthesis and spectroscopic characterization of 2-(2'-hydroxyphenyl) benzazole isothiocyanates as new florescent probes for proteins. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v.149, p.217-225, 2002.
- HUBER, F.; BOMFIM, T. C.; GOMES, R. S. Comparação da eficiência da coloração pelo método de safranina a quente e da técnica de centrífugo-flutuação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de animais domésticos. *Rev. Bras. Paras. Vet.*, v.13, n.2, p.81-84, 2004.
- KEHL, K. S. C.; CICIRELLO, H.; HAVENS, P. L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, p.416, 1995.
- LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.5, n.3, p.229-243, 2002.
- PAUL, S. et al. Comparative evaluation and economic assessment of coprological diagnostic methods and PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in bovines. *Vet. Parasitol.*, v.164, p.291-295, 2009.
- PETRY, F.; HARRYS, J. R. Ultrastructure, fractionation and biochemical analysis of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Int. J. Parasitol.*, v.29, p.1249-1260, 1999.
- PUTIGNANI, L.; MENICHELLA, D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious diseases*, v.2010, article ID 753512. 39 pages, DOI:10.1155/2010/753512.
- STEFANI, V. et al. *Aplicação de benzazolas como fluorocromos para análise por imagem de microorganismos*. Patent (2003).
- TEE, G. H. et al. Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J Clin Pathol*, v.46, p.556-558, 1993.

XIAO, L.; RYAN, U. M. Molecular epidemiology. In: FAYER, R.; XIAO, L. (eds.). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2.ed., CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, p. 119- 163, 2008.

YODER, J. S.; BEACH, M. J. Cryptosporidiosis surveillance – USA, 2003-2005. *MMWR Surveill. Summ.*, v.56, p.1-10, 2007.

Recebido em: mar. 2012

Aceito em: abr. 2012