

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE CRIPTOSPORIDIOSE EM LABORATÓRIOS DE ANÁLISES CLÍNICAS DE PEQUENO A MÉDIO PORTE

Milena Lucia Bonfim¹, Jhennifer Mara Branco², Carine de Freitas Milarch³

¹Centro Universitário Avantis, Joinville – SC, Brasil

e-mail: milena.bonfim@uniavan.edu.br; jhennifer.branco@uniavan.edu.br; carine.milarch@uniavan.edu.br

Recepção: 13 de Abril de 2024

Aprovação: 20 de Maio de 2024

Resumo: A criptosporidiose é uma doença infecciosa causada pelo parasita *Cryptosporidium*, responsável por gastroenterites. Sendo o diagnóstico laboratorial uma das formas de profilaxia da parasitose. O presente estudo tem como objetivo analisar a importância do diagnóstico laboratorial de Criptosporidiose e, revisar dentre os ensaios disponíveis qual terá uma aplicabilidade na prática de parasitologia para laboratórios de análises clínicas de pequeno a médio porte por meio de revisão de literatura. Para a coleta de dados, foram utilizadas as seguintes bases de dados: PubMed (NIH-National Library of Medicine), SciELO (Scientific Electronic Library Online), ScienceDirect e LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde). Foram selecionados artigos publicados no período entre 2013 e 2023. Foram localizados 156 artigos científicos nas plataformas, após aplicados os procedimentos metodológicos e critérios de inclusão, 23 artigos foram considerados potencialmente elegíveis, os quais foram lidos na íntegra. Após a seleção, foram incluídos 09 artigos no estudo. Após a análise e discussão dos resultados, foi possível concluir que a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen, mostra ser a metodologia viável para a pesquisa rotineira de *Cryptosporidium* em pacientes sintomáticos, devido seu baixo custo e por já estar disponíveis nos laboratórios de análises clínicas.

Palavras-Chave – *Cryptosporidium*. Diagnóstico laboratorial. Criptosporidiose.

LABORATORY DIAGNOSIS OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN SMALL TO MEDIUM SIZE CLINICAL ANALYSIS LABORATORIES

Abstract – Cryptosporidiosis is an infectious disease caused by the *Cryptosporidium* parasite, responsible for gastroenteritis. Laboratory diagnosis is one of the forms of parasitic prophylaxis. The present study aims to analyze the importance of laboratory diagnosis of Cryptosporidiosis and, among the available assays, review which will have applicability in the practice of parasitology for small to medium-sized clinical analysis laboratories through a literature review. For data collection, the following databases were used: PubMed (NIH-National Library of Medicine), SciELO (Scientific Electronic Library Online), ScienceDirect and LILACS

(Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences). Articles published in the period between 2013 and 2023 were selected. 156 scientific articles were located on the platforms. After applying the methodological procedures and inclusion criteria, 23 articles were considered potentially eligible, which were read in full. After selection, 9 articles were included in the study. After analyzing and discussing the results, it was possible to conclude that the Ziehl-Neelsen staining technique proves to be a viable methodology for the routine investigation of *Cryptosporidium* in symptomatic patients, due to its low cost and because it is already available in clinical analysis laboratories.

Keywords – *Cryptosporidium*. Laboratorial diagnosis. *Cryptosporidiosis*.

I. INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma doença infecciosa causada pelo parasita *Cryptosporidium*, responsável por sintomas intestinais como diarreia crônica e persistente, náusea, vômito e dor abdominal [1], [2]. As manifestações clínicas estão relacionadas a indivíduos com comprometimento no sistema imune, como idosos, crianças e imunocomprometidos [3].

As espécies *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum* são as que representam o maior índice de relato em infecções humanas. A transmissão direta ou indireta entre pessoas está associada ao *C. hominis*. O *C. parvum* é uma espécie zoonótica, tendo como reservatório principal os bovinos [4]. A principal via de transmissão dos oocistos é a fecal-oral [1].

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose em amostras de humanos, pode propiciar ao paciente uma terapêutica assertiva, e nas amostras ambientais, se faz necessário para a identificação de surtos, rastreamento de fontes, avaliação de fatores de riscos e intervenções [2].

Existe uma diversidade de técnicas para o diagnóstico da criptosporidiose, podendo ser realizada a microscopia para detecção direta de oocistos, técnicas imunodiagnósticas e pesquisa de biologia molecular [5].

A prevalência da criptosporidiose no Brasil está subestimada, o diagnóstico só é realizado mediante solicitação clínica, a pesquisa não é feita rotineiramente [6]. Não há protocolos de investigação deste parasita em nosso país.

Devido a crescente importância do *Cryptosporidium*

spp. como parasitas oportunistas infectando humanos e animais, este estudo tem como objetivo analisar a importância do diagnóstico laboratorial de Criptosporidiose, através da análise das diferentes técnicas disponíveis, por meio da avaliação de parâmetros de sensibilidade e especificidade, tempo de execução e a viabilidade em diferentes contextos, e técnicas que apresentem representatividade, baixo custo e fácil implantação na rotina de parasitologia em laboratórios de análises clínicas de pequeno e médio porte.

II. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O presente estudo trata-se de uma revisão bibliográfica integrativa, com abordagem qualitativa com objetivo exploratório. A coleta de dados foi realizada em meio digital, com artigos científicos sobre o tema. Foram utilizadas as seguintes bases de dados: PUBMED (NIH-National Library of Medicine), SciELO (Scientific Electronic Library Online), SCIEDIRECT (Journals & Books) e LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde). As bases de dados foram selecionadas por sua abrangência em termos de informações relevantes relacionadas ao tema em estudo, bem como por cumprir os rigorosos critérios científicos exigidos para a indexação de periódicos publicados no Brasil.

Para a realização de coleta de dados foram empregados os seguintes termos de busca: “Diagnóstico Laboratorial de *Cryptosporidium*”; “Diagnóstico de laboratório de *Cryptosporidium*”; “Laboratory Diagnosis of *Cryptosporidium*”. Foram incluídos na pesquisa artigos publicados no período compreendido de 2013 e 2023, redigidos em português, espanhol e inglês, com conteúdo integralmente disponível e, com dados relevantes para a pesquisa.

Foram excluídos os artigos que não estavam diretamente relacionados ao tema de pesquisa do projeto; não apresentaram rigor metodológico; não estavam acessíveis, por restrições de assinatura ou por falta de disponibilidade. A seleção dos artigos obedeceu a sequência dos fatos: análise dos títulos encontrados; leitura dos resumos, com observância aos requisitos estipulados para incorporação dos artigos. Foram mantidos os pertinentes ao tema da pesquisa e, utilizados para a elaboração da revisão integrativa.

III. RESULTADOS

Após as pesquisas sistematizadas, foram localizados cento e cinquenta e seis artigos científicos, em busca realizada em agosto de 2023.

Na primeira etapa de busca, realizada de acordo com os descritores estipulados nos procedimentos metodológicos, foram encontrados: trinta e seis artigos na plataforma PUBMED, sendo, dois excluídos por duplicidade e quatorze por estarem fora da temática da pesquisa. Na segunda seleção, ficaram vinte artigos; na plataforma da SCIELO, foram encontrados seis artigos, sendo, dois excluídos por duplicidade e, quatro por estarem fora da temática da pesquisa.

Após a aplicabilidade das exclusões, não restou artigos para a pesquisa, nesta plataforma; na plataforma SCIENCE

DIRECT foram encontrados cento e doze artigos, noventa e cinco foram excluídos por estarem fora da temática da pesquisa. Na segunda seleção, restaram dezessete artigos; na plataforma LILACS, foram encontrados dois artigos, um foi excluído por estar fora da temática da pesquisa. Na segunda seleção, restou um artigo.

Na segunda seleção dos artigos, foram excluídos após a leitura dos resumos, por não estarem pertinentes ao tema da pesquisa: PUBMED (n= 04), SCIEDIRECT (n= 11). Para a leitura na íntegra dos artigos ficaram: PUBMED (n= 16), SCIEDIRECT (n= 06) e LILACS (n= 1).

Após a leitura na íntegra dos artigos, quatorze foram excluídos pelas seguintes razões: artigos com estudo em animais (n= 02), artigo com estudo prospectivo (n= 01), artigo com estudo em bioinformática (n=01) e artigos que não apresentavam dados suficiente para preencher os critérios de inclusão (n= 10). No Quadro 1 estão dispostos os nove artigos elegíveis que foram incluídos no presente estudo.

Quadro 1. Artigos selecionados para o estudo.

AUTOR	DETALHAMENTO DO ESTUDO
Khurana, S, Chaudhary, P [2]	<p>OBJETIVO: O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose é essencial para o tratamento adequado dos pacientes e a identificação de surtos ambientais.</p> <p>DELINEAMENTO: Revisão bibliográfica. Critérios de seleção podem ser usados para procurar <i>Cryptosporidium</i>, incluindo indivíduos imunocomprometidos, crianças menores de 5 anos, viajantes de países não endêmicos, visitas a fazendas e surtos locais.</p> <p>DESFECHO: Ressalta-se, portanto, que o <i>Cryptosporidium</i> deve idealmente ser procurado em todos os pacientes com diarreia, mas deve ser investigado em crianças e pacientes imunocomprometidos.</p> <p>SUGESTÃO DE FUTURAS PESQUISAS :A necessidade de desenvolver testes no local de atendimento e testes multiplexados para detecção simultânea de múltiplos patógenos.</p>
Ahmed, AS, Karanis, P [4]	<p>OBJETIVO: Estimular pesquisas para melhorar o monitoramento das metodologias diagnósticas de <i>Cryptosporidium</i> nas fezes.</p> <p>DELINEAMENTO: Revisão bibliográfica.</p> <p>DESFECHO: Os métodos de flotação são mais simples, econômicos e rápidos do que os métodos de centrifugação</p>

	<p>gradiente. A coloração ácido-resistente modificada é recomendada para detectar <i>Cryptosporidium</i>. Os testes de coproantígeno são rápidos, mas menos sensíveis que o IFA e as ferramentas moleculares. O método PCM é adequado para pesquisas de campo, enquanto a imunofluorescência direta e o diagnóstico molecular (PCR, PCR em tempo real, LAMP) são os mais sensíveis.</p> <p>SUGESTÃO DE FUTURAS PESQUISAS: Mais estudos são necessários para simplificar as opções de diagnóstico da criptosporidiose e melhorar a detecção em materiais relacionados. Recomenda-se a validação de procedimentos para testes padronizados e laboratoriais em diferentes ambientes, para aprimorar a vigilância da doença e garantir maior segurança contra ela</p>	<p>Ignatius, R, Klemm, T, Zander, S, Gahutu, JB, Kimmig, P, Mockenhaupt, FP, Regnath, T [8]</p> <p>OBJETIVO: Comparar a microscopia de contraste de fase (PCM) de lâminas não coradas para detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp. oocistos com um imunoenensaio enzimático (EIA) comercialmente disponível para a detecção de <i>Cryptosporidium</i> em amostras de fezes humanas.</p> <p>DELINEAMENTO: Artigo de estudo de caso em apoio à pesquisa.</p> <p>DESFECHO: O PCM é um método de diagnóstico acessível e específico para detectar diferentes espécies de oocistos de <i>Cryptosporidium</i>, sendo adequado para estudos de campo. Sua sensibilidade depende do número de oocistos excretados, identificando principalmente pacientes com infecção aguda. Ensaio de PCR mais sensíveis podem ser necessários para detectar portadores assintomáticos, mas sua implementação em ambientes com recursos limitados é desafiadora e custosa.</p> <p>SUGESTÃO DE FUTURAS PESQUISAS: Os autores não fizeram referência sobre estudos futuros.</p>	
<p>Gerace, E, Lo Presti, VDM, Biondo [5]</p>	<p>OBJETIVO: Resumir os aspectos gerais do <i>Cryptosporidium</i> com foco nas ferramentas de diagnóstico disponíveis usadas para o diagnóstico de criptosporidiose. Também são discutidos os métodos moleculares atualmente disponíveis para sua detecção e o progresso no desenvolvimento de novos diagnósticos.</p> <p>DELINEAMENTO: Revisão bibliográfica.</p> <p>DESFECHO: Apesar da prevalência global da criptosporidiose e seu impacto significativo em pacientes imunocomprometidos, os programas de controle atuais têm deficiências, especialmente em termos de diagnóstico. Os testes diagnósticos comuns podem diagnosticar erroneamente a doença em áreas endêmicas. As técnicas microscópicas são amplamente utilizadas para detecção de <i>Cryptosporidium</i> em amostras de fezes, mas sua precisão depende da experiência do microscopista.</p> <p>SUGESTÃO DE FUTURAS PESQUISAS: Há necessidade de desenvolver técnicas moleculares que sejam sensíveis, específicas, fáceis de executar, econômicas e de alto rendimento para o diagnóstico precoce.</p>	<p>Fitri, LE, Candradikusuma, D, Setia, YD, Wibawa, PA, Iskandar, A, Winaris, N, Pawestri, AR [7]</p> <p>OBJETIVO: Descrever vários métodos de imunodiagnóstico e diagnóstico molecular para infecção intestinal por protozoários <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp.</p> <p>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: Revisão bibliográfica.</p> <p>DESFECHO: Apesar da extensa pesquisa em métodos diagnósticos, não há um método único e perfeito para diagnosticar protozoários intestinais. Cada método tem suas vantagens, desvantagens e aplicabilidade para diferentes propósitos. A escolha do método adequado deve considerar a finalidade do exame, o parasita esperado, o tipo de amostra e os recursos disponíveis.</p> <p>SUGESTÃO DE FUTURAS PESQUISAS: Esforços para desenvolver abordagens de detecção melhores e ideais para protozoários intestinais são continuamente realizados para explicar os aspectos inexplorados desses membros eucarióticos do microambiente intestinal.</p>	
		<p>Cama, VA, Mathison, BA[9]</p> <p>OBJETIVO: Estudo sobre as infecções entéricas em humanos causadas pelos protozoários: <i>Cryptosporidium</i> spp, <i>Cyclospora</i></p>	

	<p><i>cayetanensis</i>, <i>Giardia duodenalis</i> (<i>Giardia lamblia</i>, <i>Giardia intestinalis</i>) e <i>Cystoisospora belli</i> (anteriormente <i>Isospora que belli</i>).</p> <p>DELINEAMENTO: Revisão bibliográfica.</p> <p>DESFECHO: A microscopia é o método principal para detectar os parasitas mencionados, ressaltando a importância do processamento e coloração das amostras, além das características morfológicas. Ensaios de diagnóstico rápido, como os de fluxo lateral/cartões imunocromatográficos, estão disponíveis para criptosporidiose ou giardíase, incluindo dispositivos aprovados para sua detecção simultânea. Além disso, há ensaios moleculares para detectar múltiplos patógenos entéricos, incluindo vírus, bactérias e parasitas, com alta sensibilidade e especificidade, incluindo a detecção de coinfeções.</p> <p>SUGESTÃO DE FUTURAS PESQUISAS: A necessidade de que seja solicitado pelos médicos testes específicos, como a microscopia ácido-resistente modificada (MAF), ou a detecção de antígeno (metodologia qualitativa ou quantitativa).</p>
--	---

IV. DISCUSSÕES

Dentre as técnicas de diagnóstico laboratorial da criptosporidiose em humanos, este estudo aborda as que já são usualmente utilizadas em laboratórios de análises clínicas de pequeno a médio porte como a identificação microscópica, identificação imunológica e a identificação molecular de *Cryptosporidium* spp. A técnica de biologia molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR), usada para a pesquisa de material genético do parasita, será citada em comparação, mas devido, seu alto custo, é inviável a aplicabilidade desta metodologia em pequenas rotinas.

A manipulação das fezes de pacientes suspeitos de criptosporidiose precisa ser processada em cabines de segurança, o *Cryptosporidium* possui classificação de nível II de biossegurança. Deve-se analisar preferencialmente no mínimo três amostras de fezes coletadas em dias alternados, em virtude de os oocistos serem eliminados de forma intermitente [6], [5].

Cryptosporidium podem ser evidenciados nas amostras de fezes frescas ou preservadas. Os conservantes mais utilizados são formalina a 10%, acetato de sódio-ácido acético-formaldeído ou álcool polivinílico [4]. No entanto, algumas técnicas de coloração podem não serem adequadas para amostras preservadas em álcool polivinílico. As amostras preservadas em formalina são inviáveis para a pesquisa de

biologia molecular do parasita [2]. A remoção por lavagem é ineficaz se o conservante já estiver penetrado nos oocistos [1].

Estudos mostram que a realização prévia de técnicas de concentração aumenta as possibilidades de achados de oocistos de *Cryptosporidium* nos métodos de diagnósticos. As técnicas mais comuns são a flotação em solução saturada de sacarose (SSF) e a centrífugo-sedimentação (Técnica de Richie) pela formalina-éter [6], [5], [3].

A microscopia é a técnica mais usual para a pesquisa de protozoários intestinais por ser uma metodologia que exige poucos recursos. Entretanto, requer microscopistas habilitados e experientes no reconhecimento dos parasitas intestinais [5], [7], [8]. A subjetividade do diagnóstico, limita a sua sensibilidade e especificidade [7].

Embora os oocistos possam ser detectados por microscopia óptica de luz ou microscopia de contraste de fase [6]. O emprego de coloração ácido-resistente-modificada aumenta a sensibilidade desta técnica [7], [5], [8]. Entretanto, há a limitação de não conseguir identificar a espécie de *Cryptosporidium* [8].

Dentre as várias técnicas citadas em sua pesquisa [4], recomendam a coloração ácido-resistente modificada. Neste mesmo sentido, [6] expõem que os métodos de coloração ácida resistente ao calor continuam a ser os mais utilizados para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. devido ao baixo custo, fácil execução e melhor fixação dos corantes. Esta técnica predispõe laudos falso-positivos, em virtude da coloração de partículas de gordura e leveduras, que podem levar o microscopista menos experientes a identificá-las como *Cryptosporidium* spp [6].

Em estudo realizado com idosos residentes em instituições de longa permanência na cidade de Lages/SC, utilizaram a centrífugo-sedimentação pela formalina-éter, e realizaram a coloração de Ziehl-Neelsen modificada. Os autores relatam que a técnica de coloração utilizada viabiliza um diagnóstico simples e célere para a detecção dos oocistos de *Cryptosporidium*. Entretanto, o sucesso da metodologia diagnóstica depende da sintomatologia do paciente e do número de oocistos eliminados. Podendo ocorrer resultados falsos negativos [3].

O uso da microscopia eletrônica é reportado em algumas pesquisas para diagnóstico de *Cryptosporidium* em humanos. Entretanto, a limitação e complexidade da técnica, bem como, o alto custo com equipamentos e instalação, inviabilizam esta metodologia em laboratórios com baixo volume de exames parasitológicos [2].

Os métodos imunológicos podem ser baseados na detecção de antígenos, com métodos que reproduzem boa sensibilidade e especificidade na faixa de 93 % a 100 % [6], [2]. Podendo ser utilizado a detecção de anticorpos, entretanto, os imunoenaios baseados na detecção de anticorpos são de utilidade para inquéritos soropidemiológicos da doença [2]. Em áreas endêmicas, o diagnóstico pela detecção de anticorpos apresenta limitações, não havendo como determinar se a infecção é recente ou futura, portanto, apresentam baixa eficácia no diagnóstico de *Cryptosporidium* [6].

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e a pesquisa usando anticorpo fluorescente direto, para a pesquisa de *Cryptosporidium* foram avaliados em vários estudos, e

obtiveram resultados equiparados de 90% de sensibilidade e 95% de especificidade. Em contrapartida, os testes rápidos de imunocromatografia apresentam baixa sensibilidade a depender do fabricante, em torno de 50,1% a 86,7% [7]. Os ensaios rápidos podem apresentar alta especificidade (98%–100%) [2], não exige aptidão técnica e sua execução pode ser feita em qualquer ambiente [1].

Embora os trabalhos citados nesta pesquisa não abordem a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 786 de 2023, que é a norma da Agência Nacional de Vigilância Sanitária [10] que regula e controla as atividades relacionadas à saúde, e estabelece os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de laboratórios clínicos no Brasil. Está normativa faz previsão no Art. 147 que todo serviço que execute exames de análises clínicas deve-se realizar o CIQ (Controle Interno da Qualidade) em todos os analitos executados. Esta decisão repercute de forma significativa nos exames imunocromatográficos elevando seus custos operacionais.

O diagnóstico laboratorial de criptosporidiose em fezes diarreicas, pode ser realizado através do ensaio imunoenzimático (ELISA) e do teste imunocromatográfico, que apresentam boa sensibilidade e especificidade para detecção de antígenos de *Cryptosporidium*. Sendo ineficazes se a carga do parasita no paciente for baixa, o que é comum em pacientes assintomáticos [5].

As técnicas imunológicas de microscopia por imunofluorescência direta, ELISA e de imunocromatografia obtém excelentes resultados na pesquisa de *Cryptosporidium* spp. Relata ainda a alta sensibilidade e especificidade da imunofluorescência direta. “*Cryptosporidium* spp., usando imunofluorescência direta de amostras fecais usando anticorpos monoclonais marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), atua contra epítomos de oocistos expostos à superfície. Foi relatado que ele tinha sensibilidade e especificidade quase perfeitas contra esse protozoário, embora não conseguisse distinguir diferentes espécies de *Cryptosporidium* [7].

A microscopia de imunofluorescência, apesar de ser um diagnóstico menos subjetivo do que a microscopia óptica, requer a observação das características dos oocistos de *Cryptosporidium* (uso de contraste de interferência diferencial para os conteúdos internos esporozoítos e coloração com fluorógeno nuclear para os núcleos dos esporozoítos [1].

Devido à sua maior sensibilidade, especialmente para esfregaços com baixas concentrações de oocistos, a coloração do anticorpo imunofluorescente parece ser o método de detecção de escolha para estudos de prevalência em infecções por *Cryptosporidium* em humanos, animais e meio ambiente [4]. Entretanto é uma metodologia com alto custo financeiro, não sendo usada rotineiramente [9].

A microscopia de contraste e fase, quando na ausência de qualquer coloração, provou ser um método altamente específico e pouco exigente para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes, com pacientes sintomáticos. Apresentando boa sensibilidade quando comparado com a metodologia de imunoensaio enzimático (EIA) [8]. A automação e maior sensibilidade dos testes de imunoensaios enzimáticos, se sobrepõe a técnica de microscopia ácido-resistente [1]. A utilização de anticorpos

monoclonais para alvos específicos em métodos imunológicos, possibilitam diagnósticos diferenciais entre as espécies, o que torna este método extremamente sensível quando comparados com as técnicas de coloração [6].

A diversidade de espécies de *Cryptosporidium* spp., possuem características morfológicas e morfométricas semelhantes, os métodos moleculares contribuem na identificação e epidemiologia deste protozoário [6], [7]. É um ensaio com sensibilidade e especificidade superior à microscopia [7]. Esta técnica é altamente sensível, viabilizando o diagnóstico de pacientes assintomáticos.

As principais técnicas moleculares empregadas no diagnóstico da criptosporidiose, baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). “... nested-PCR, PCR de polimorfismo de conformação de cadeia simples (PCR SSCP), hibridização de sondas de DNA, PCR de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), PCR multiplex e PCR em tempo real. Essas técnicas são geralmente associadas ao sequenciamento de fragmentos amplificados para confirmação de resultados e para análise da diversidade genética entre espécies [6].

A metodologia de PCR multiplex em tempo real, induz a um maior número de diagnóstico positivo para protozoários intestinais, sendo, portanto, um método superior a microscopia e a detecção de antígeno [7]. É uma técnica que consegue detectar a criptosporidiose com eficácia em pacientes assintomáticos [5]. Tendo como desvantagem, ser uma metodologia que requer equipamentos específicos, em lugares com recursos limitados, é inviável sua aplicabilidade, em virtude de ser exigente e dispendiosa [8].

Os estudos proporcionam um avanço contínuo nas metodologias moleculares no diagnóstico dos parasitas intestinais, havendo uma limitação em sua aplicabilidade nos laboratórios de análises clínicas, e inexistindo na grande maioria. Nos países subdesenvolvidos tem relação direta aos custos e a operacionalização técnica para sua implantação [5].

Embora o número de casos de criptosporidiose notificados em todo o mundo nos últimos anos tenha aumentado, com um número de 3 casos por 100.000 habitantes, numerosos indicadores (ou seja, sintomas clínicos) indicam que a frequência da infecção será provavelmente 100 vezes superior ao número de casos notificados [5].

Há necessidade de que a pesquisa da criptosporidiose seja de forma rotineira, devido a sua importância e subestimação. “Os exames coproparasitológicos são de fundamental importância para o diagnóstico das enteroparasitoses, e devem ser solicitados na rotina dos serviços de saúde, considerando que as parasitoses intestinais são frequentes na população e, diferentes métodos devem ser usados para evidenciar ovos e larvas de helmintos, assim como cistos e oocistos de protozoários intestinais. Esta afirmação é importante uma vez que a técnica de diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* spp. é muito específica e em muitos casos não é solicitado na rotina laboratorial. Assim o diagnóstico da criptosporidiose é baixo ou subestimado na população [3].

Cryptosporidium não são facilmente detectáveis pela microscopia de montagem úmida, necessitando que técnicas específicas para a criptosporidiose sejam solicitadas, como a microscopia ácido-resistente modificada, testes imunológicos ou microscopia fluorescente baseada em anticorpos [9]. Os

desafios na pesquisa da criptosporidiose, poderá ser minimizado com a padronização de técnicas diagnósticas, bem como, viabilizaram o rastreamento dos surtos e o conhecimento etiológico do parasita [1].

Pacientes portadores de HIV e imunocomprometidos, possuem predisposição para quadros graves da doença, devendo os médicos ponderar em solicitar de forma rotineira para este público, quando sintomáticos, a pesquisa de anticorpo por fluorescência direta e testes moleculares para *Cryptosporidium* [7]. Adotar critérios de triagem na ausência de requisições médicas para a pesquisa de *Cryptosporidium*, incluindo pacientes imunocomprometidos; crianças menores de cinco anos; pacientes que tenha viajado para lugares endêmicos; pacientes que frequentem fazendas; e surtos locais [2].

O diagnóstico precoce é a melhor forma de combater a criptosporidiose, havendo, portanto, a real necessidade de que sejam desenvolvidos testes moleculares econômicos, de fácil manuseio e de alto rendimento [5]. Para a manutenção da vida de pacientes que necessitam de diagnóstico diferencial de criptosporidiose, deve-se implantar reformas políticas para viabilizar o acesso ao diagnóstico. A utilização da microscopia e de testes imunocromatográficos, juntamente com testes moleculares, forneceria precisão diagnóstica do parasita intestinal [6].

Não há um consenso em métodos diagnósticos para a pesquisa de protozoários intestinais. “Independentemente da extensa pesquisa em métodos diagnósticos, não existe um método único e perfeito para diagnosticar protozoários intestinais. Cada método tem diferentes superioridades, desvantagens e adequação para diferentes propósitos [10]. A deliberação metódica deve ser realizada ao selecionar o método ou ensaio apropriado, dependendo do propósito do exame ou estudo, do parasita esperado, do tipo de amostra e da disponibilidade de recursos. Esforços para desenvolver abordagens de detecção melhores e ideais para protozoários intestinais são continuamente realizados para explicar os aspectos inexplorados desses membros eucarióticos de microrganismo [7].

IV. CONCLUSÕES

A pesquisa de criptosporidiose pela técnica de coloração de *Ziehl-Neelsen*, mostra ser a metodologia viável para a pesquisa rotineira de *Cryptosporidium* em pacientes com fezes diarreicas, apresentando parâmetros de sensibilidade e especificidade representativos para o diagnóstico da parasitose e baixo custo operacional. A grande parte dos laboratórios de análises clínicas de pequeno a médio porte já utilizam a coloração para a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), não teriam, portanto, que fazer novos investimentos.

Com base nas experiências adquiridas, o uso do micrômetro na microscopia óptica é indispensável para análise das características morfológicas dos oocistos de *Cryptosporidium*. O diagnóstico por teste imunocromatográfico, que é uma metodologia que requer o mínimo de perícia técnica, torna inviável sua aplicabilidade

em pequenas rotinas parasitológicas no Brasil em virtude do Art.147 da RDC 786/2023.

REFERÊNCIAS

- [1] Chalmers, RM, Katzer, F. Procurando por *Cryptosporidium*: a aplicação de avanços na detecção e diagnóstico. Trends in Parasitology, Vol. 29, 2013.
- [2] Khurana, S, Chaudhary, P. Diagnóstico laboratorial da criptosporidiose. Tropical Parasitology, 28 maio de 2018.
- [3] Quadros, RM, Miguel, RL. *Cryptosporidium* spp. em idosos residentes em instituições de longa permanência no sul do Brasil. Clin Biomed Res. 2018.
- [4] Ahmed, AS, Karanis, P. Comparação dos métodos atuais usados para detectar oocistos de *Cryptosporidium* em fezes. Jornal internacional de higiene e saúde ambiental, v. 221, n. 5, 2018.
- [5] Gerace, E, Lo Presti, VDM, Biondo, C. *Infecção por Cryptosporidium*: epidemiologia, patogênese e diagnóstico diferencial. Jornal Europeu de Microbiologia e Imunologia, 2019.
- [6] Cunha, FS, Peralta, RHS, Peralta, JM. Novos insights sobre a detecção e caracterização molecular de *Cryptosporidium* com ênfase em estudos brasileiros: uma revisão. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo. 2019.
- [7] Fitri, LE, Candradikusuma, D, Setia, YD, Wibawa, PA, Iskandar, A, Winaris, N, Pawestri, AR. Métodos de diagnóstico de protozoários intestinais comuns: métodos imunológicos e moleculares atuais e futuros. Medicina Tropical e Doença Infecciosa. 2022.
- [8] Ignatius, R, Klemm, T, Zander, S, Gahutu, JB, Kimmig, P, Mockenhaupt, FP, Regnath, T. Detecção altamente específica de *Cryptosporidium* spp. oocistos em amostras de fezes humanas por microscopia de contraste de fase barata e pouco exigente. Parasitol Res. 2015.
- [9] Cama, VA, Mathison, BA. Infecções por *Coccidia* Intestinal e *Giardia duodenalis*. Clínicas em Medicina Laboratorial. 2015.
- [10] Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 786 de 05 de maio de 2023. Dispõe sobre os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Laboratórios Clínicos, de Laboratórios de Anatomia Patológica e de outros Serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas. 2023.

DADOS BIOGRÁFICOS

Milena Lúcia Bonfim Araújo Porth nascida em em 14/06/1971 em Capanema/PA. Formada em Licenciatura de Educação Física pela Universidade Estadual do Pará, tendo exercido o magistério por 05 anos na rede estadual de ensino do Pará. Atualmente é advogada (2017), formada pela Faculdade Gamaliel; é graduada em Biomedicina pela Uniavan (2024). Sua atividade principal é gerente Técnica e

Administrativa do Laboratório Oswaldo Cruz desde 2002. Suas áreas de interesse são: Direito Médico, Gerência de processos de qualidade em laboratórios de análises clínicas e Parasitologia.

Jhennifer Mara Branco, nascida em 11/03/1998 em Cascavel, PR, é acadêmica do curso de Biomedicina pelo Centro Universitário Avantis -Uniavan.

Carine de Freitas Milarch, nascida em 20/11/1990 em Cachoeira do Sul - RS, é Bióloga (2012) pela Universidade Luterana do Brasil, Nutricionista (2023) pelo Centro Universitário Leonardo da Vinci, Farmacêutica (2024) pelo Centro Universitário Unisociesc, mestre (2021) e doutor em Ciências Biológicas (2018) e doutora em Bioquímica Toxicológica (2020), Pós doutorado em Farmacologia (2019) pela Universidade Federal de Santa Maria e Pós doutorado em Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Catarina (2021). Atualmente é professora Adjunta na Faculdade Ielusc e Tutora do Curso de Biomedicina na Uniavan. Suas áreas de interesse são: Bioquímica, Fisiologia, Patologia, Biologia Molecular, Nutrição e Farmacologia.