

Avaliação de técnicas de coloração no diagnóstico laboratorial da criptosporidiose

Evaluation of staining techniques in the laboratory diagnosis of cryptosporidiosis

Mariana A. Cruz¹, Thiago R. Santos¹, Ana L. Fonseca¹, Kelly D. Pacheco¹, Alexandra M. Anjos¹, Ronaldo R. Costa^{1,2}, Marccone A. L. Oliveira¹, Paula R. Chellini¹, Lauren H. Jaeger¹

RESUMO

Introdução: A criptosporidiose é uma doença diarreica que afeta principalmente crianças e indivíduos imunocomprometidos. Seu diagnóstico laboratorial é baseado em técnicas de coloração permanente e muitos desafios ainda precisam ser vencidos para a sua implementação como rotina de laboratórios clínicos. **Objetivos:** Comparar a eficácia de diferentes técnicas de coloração permanente na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes e avaliar a melhor metodologia a ser implementada em laboratórios clínicos. **Métodos:** Indivíduos apresentando suspeita clínica de criptosporidiose foram convidados a participar do estudo. Um total de 18 amostras de fezes (com e sem o conservante formol 10%) foram analisadas. Cinco diferentes abordagens foram realizadas: Ziehl-Neelsen (ZN) com e sem aquecimento, Safranina (SF) com e sem aquecimento e Panótico Rápido. **Resultados:** Das 18 amostras analisadas, sete (38,9%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. por pelo menos uma das técnicas de coloração utilizadas. A técnica da SF com aquecimento teve o melhor desempenho, apresentando maior percentagem de acertos (77,78%) e menor percentagem de erros (5,56%) quando comparada às outras técnicas de coloração. A concordância estatística foi “leve” (Kappa=0,36, p<0,0001). A qualidade da fixação do esfregaço fecal em lâmina e da coloração mostrou resultados satisfatórios tanto macro quanto microscopicamente. **Conclusão:** O presente estudo chama a atenção para a frequência de infecção moderada para *Cryptosporidium* spp. em Juiz de Fora e a necessidade de avaliação das técnicas utilizadas na rotina laboratorial para diagnóstico de coccídeos.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp.; Colorações permanentes; Microscopia; Diagnóstico; Controle de qualidade.

ABSTRACT

Introduction: Cryptosporidiosis is a diarrheal disease that mainly affects children and immunocompromised individuals. Laboratory diagnosis is based on permanent staining techniques and many challenges still need to be overcome for its implementation as a routine in clinical laboratories. **Objectives:** Compare the effectiveness of different staining techniques in the detection of *Cryptosporidium* spp. in stool samples and evaluate the best methodology to be implemented in clinical laboratories. **Methods:** Individuals presenting clinical suspicion of cryptosporidiosis were invited to participate in the study. A total of 18 stool samples (with and without 10% formaldehyde preservative) were analyzed. Five different methodologies were performed: Ziehl-Neelsen (ZN) with and without heating, Safranina (SF) with and without heating and Panoptic Fast. **Results:** Of the 18 samples analyzed, seven (38.9%) were positive for *Cryptosporidium* spp. by at least one of the staining techniques used. Statistical agreement was “slight” (Kappa=0.36, p<0.0001). The quality of fixation of the fecal smear on slide and staining showed satisfactory results, both macroscopically and microscopically. **Conclusion:** The present study highlights the frequency of moderate infection with *Cryptosporidium* spp. in Juiz de Fora and the need to evaluate the techniques before being implemented in the laboratory routine.

Keywords: *Cryptosporidium* spp.; Permanent stains; Microscopy; Diagnosis; Quality control.

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora/MG, Brasil.

² Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. Juiz de Fora/MG, Brasil.

Correspondência:
laurenhj@hotmail.com

Direitos autorais:
Copyright © 2023 Mariana A. Cruz, Thiago R. Santos, Ana L. Fonseca, Kelly D. Pacheco, Alexandra M. Anjos, Ronaldo R. Costa, Marccone A. L. Oliveira, Paula R. Chellini, Lauren H. Jaeger.

Licença:
Este é um artigo distribuído em Acesso Aberto sob os termos da Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional.

Submetido:
8/12/2022

Aprovado:
9/3/2023

ISSN:
2446-5410

INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* causam uma doença diarreica com interesse para a saúde pública e animal¹. A criptosporidiose humana é normalmente causada pelas espécies *Cryptosporidium parvum* ou *C. hominis*, entretanto, diversas outras espécies podem causar infecção nesse hospedeiro². Esses protozoários acometem principalmente crianças e indivíduos com HIV/AIDS, e sua transmissão se dá por via fecal-oral, cujas fontes de infecção incluem água e alimentos contaminados com oocistos ou o contato com pessoas ou animais infectados³.

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose é baseado na observação, através da microscopia de esfregaços fecais corados, de oocistos nas fezes de pacientes infectados. Essa ferramenta é a mais difundida devido ao seu baixo custo e razoável facilidade na preparação. Entretanto, nem todos os laboratórios clínicos disponibilizam a pesquisa de coccídeos como parte de seu serviço. De fato, alguns desafios devem ser enfrentados para a implementação dessa metodologia como rotina, na qual incluem: i) a baixa sensibilidade, principalmente em infecções por baixa carga parasitária; ii) a qualidade da coloração, e iii) a disponibilidade de microscopistas treinados para identificação das formas parasitárias^{2,4-5}.

O objetivo do presente trabalho foi comparar a eficácia de diferentes técnicas de coloração permanente na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes e avaliar a melhor metodologia a ser implementada em laboratórios clínicos.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEP HU-UFJF) (número CAAE: 06999319.6.0000.5133, aprovação em 28 de fevereiro de 2019). O projeto foi desenvolvido no HU-UFJF em Juiz de Fora, Minas Gerais. Indivíduos maiores de 18 anos de idade com solicitação de qualquer exame nas fezes (exame parasitológico de fezes [EPF], pesquisa de coccídeos, de sangue oculto, gordura e/ou de leucócitos nas fezes) foram convidados a participar do estudo. Fo-

ram excluídos aqueles menores de idade. Todos os indivíduos leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O período de coleta foi de outubro de 2019 a março de 2020. A coleta das fezes foi realizada pelos participantes em suas residências ou no hospital. Amostras de fezes com e sem o conservante formol 10% foram aceitas para realização das análises. Todas as amostras recebidas estavam em condições aceitáveis (quali e quantitativamente) para a realização das análises parasitológicas. Devido à pequena quantidade de amostras recebidas no período e de aceitabilidade dos indivíduos em participar do estudo, apenas 18 amostras fecais foram incluídas.

As amostras foram homogeneizadas e submetidas à técnica de concentração parasitária de centrífugo-sedimentação com formalina-éter⁶. Os esfregaços fecais foram preparados com o sedimento utilizando bastão de vidro⁶. Após secarem a temperatura ambiente, os esfregaços foram fixados com metanol durante 5 minutos. Foram utilizadas cinco diferentes técnicas (em cada amostra fecal) de coloração permanente para a detecção de oocistos: i) Ziehl-Neelsen sem aquecimento (ZN S/AQ); ii) ZN com aquecimento (ZN C/AQ); iii) Safranina sem aquecimento (SF S/AQ); iv) SF com aquecimento (SF C/AQ)⁶; e v) Panótico Rápido (PR – Laborclin) conforme instruções do fabricante. Para todas as colorações, um controle negativo (contendo água destilada) foi adicionado. A etapa de aquecimento consistiu em submeter a lâmina ao aquecimento em bico de Bunsen até a emissão de vapores após a adição dos corantes fucsina e Safranina nas técnicas de ZN C/AQ e SF C/AQ, respectivamente.

A qualidade macro e microscópica da fixação do esfregaço fecal em lâmina foi avaliada. Para isso, os seguintes critérios foram adotados: fixação geral do esfregaço e fixação do “fundo” da preparação. Os resultados foram expressos em: satisfatório (boa fixação do material biológico em lâmina) ou não satisfatório (fixação ruim). Além disso, a interferência da prévia conservação do material biológico em formol 10% (máximo 48 horas) na fixação e a coloração do esfregaço fecal foram analisadas. Para isso, os seguintes critérios foram adotados: a intensidade da coloração da lâmina, a intensidade da coloração das estruturas parasitárias e do “fundo” da preparação.

Análise estatística para avaliar a concordância entre as técnicas de coloração permanente estudadas foi realizada através do cálculo do índice Kappa no programa *Microsoft Excel*[®], utilizando a ferramenta *Real Statistic Using Excel*, com nível de confiança de 95% (significância estatística $p < 0,05$). Os

TABELA 1. Valores de referência para o índice Kappa

Valores de Kappa	Interpretação
<0	Ausência de concordância
0-0,19	Concordância pobre
0,20-0,39	Concordância leve
0,40-0,59	Concordância moderada
0,60-0,79	Concordância substantiva
0,80-1,00	Concordância quase perfeita

Fonte: Adaptado de McHugh⁷.

valores de referência para o índice Kappa são mostrados na Tabela 1. O software *Microsoft Excel*[®] foi também utilizado para avaliar o desempenho das técnicas de coloração permanente através de uma análise estatística multivariada, na qual se determinou a percentagem de erros e acertos de cada técnica, além da inferência disjuntiva para respostas positivas para *Cryptosporidium* spp. e da inferência conjuntiva para respostas negativas.

RESULTADOS

A análise da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais (n=18) por qualquer uma das técnicas de coloração revelou que 38,9% dos participantes (7/18) estavam infectados com o parasito (Tabela 2).

TABELA 2. Resultados da pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por diferentes técnicas de coloração permanente (n=18)

Amostra	Técnica de coloração permanente					Pesquisa de oocistos
	ZNS/AQ	ZNC/AQ	SFS/AQ	SFC/AQ	PR	
CCC001	-	-	-	-	-	Negativo
CCC002	-	-	O	-	-	Negativo
CCC003	-	-	-	-	-	Negativo
CCC004	-	-	-	-	-	Negativo
CCC005	+	-	+	-	-	Positivo
CCC006	-	-	-	+	-	Positivo
CCC007	-	-	-	-	-	Negativo
CCC008	-	-	-	-	-	Negativo
CCC009	-	-	-	-	-	Negativo
CCO001	+	O	-	O	-	Positivo
CCO002	+	O	O	O	O	Positivo
CCO003	-	-	-	-	-	Negativo
CCO004	-	-	-	+	+	Positivo
CCO005	-	-	-	+	-	Positivo
CCO006	-	-	-	-	-	Negativo
CCO007	-	O	-	-	-	Negativo
CCO008	O	O	O	O	O	O
CCO009	-	-	-	+	-	Positivo
Positividade	3	0	1	4	1	7

ZN S/AQ: Ziehl-Neelsen sem aquecimento; ZN C/AQ: Ziehl-Neelsen com aquecimento; SF S/AQ: Safranina sem aquecimento; SF C/AQ: Safranina com aquecimento; PR: Panótico Rápido. O: sem esfregaço. Fonte: Os autores (2023).

A técnica que demonstrou maior número de amostras positivas foi a SF C/AQ (n=4), seguida da técnica ZN S/AQ (n=3) (Tabela 2). Foi possível detectar a presença de oocistos pela técnica de coloração hematológica PR em um indivíduo. Não foi possível obter resultado positivo por todas as cinco técnicas de coloração simultaneamente. Em duas amostras, foi possível detectar a presença de oocistos por mais de uma técnica: amostra CCC005 nas técnicas ZN S/AQ e SF S/AQ e amostra CCO004 nas técnicas SF C/AQ e PR (Tabela 2).

A concordância entre as técnicas utilizadas foi avaliada através do índice Kappa, $K=0,39$ ($p<0,0001$), indicando concordância leve. Quanto à inferência disjuntiva para respostas positivas para *Cryptosporidium* spp. e a inferência conjuntiva para respostas negativas revelaram que, se considerarmos que todos os resultados positivos nas cinco técnicas são verdadeiros, a técnica da SF C/AQ mostrou o melhor resultado, com 77,8% de resultados verdadeiros positivos e menor percentagem de erros (5,6%), enquanto a técnica de ZN C/AQ mostrou o pior resultado, com apenas 55,6% de resultados verdadeiros positivos (Tabela 3).

O controle de qualidade realizado para avaliação macroscópica da fixação do esfregaço fecal em lâmina mostrou que 55,6% das amostras (n=10) tiveram uma boa resposta (Tabela 4). A avaliação microscópica da fixação do esfregaço fecal em lâmina mostrou que 72,2% das amostras (n=13) tiveram uma boa fixação. A avaliação da qualidade da coloração em lâmina mostrou que 72,2% das lâminas (n=13) tiveram um resultado satisfatório, tanto

macro quanto microscópica (Tabela 4). Observou-se que a qualidade das colorações foi influenciada pela qualidade de fixação do esfregaço. A coloração de “fundo” dos esfregaços apresentou tonalidade esverdeada ou azulada, resultando em um bom contraste. O controle negativo mostrou resultados esperados. Não foi observada contaminação com artefatos ou outras estruturas parasitárias.

Quando avaliada a interferência do uso do formol 10% na fixação e coloração do esfregaço em lâmina (Tabela 4), pôde-se verificar que na maioria das lâminas (85,7%) o esfregaço teve boa aderência e contraste na coloração (amostras positivas), sugerindo não haver interferência do uso do conservante prévio nas amostras fecais.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a frequência de infecção de *Cryptosporidium* spp. foi moderada (38,9%). Estudos anteriores no Brasil mostraram uma prevalência menor em indivíduos de comunidade (não hospitalizados), que variou de 7% a 17%⁸⁻¹⁰. Já em indivíduos hospitalizados, a prevalência foi de 26%¹¹. Em outros países em desenvolvimento, a prevalência varia de 29% a 43%, tanto em indivíduos hospitalizados quanto de comunidade¹²⁻¹⁴. Um estudo do tipo metanálise mostrou que a prevalência média da criptosporidiose em países em desenvolvimento é de 7,6%, e que alguns países como México, Nigéria, Bangladesh e Coreia apresentam as mais altas frequências de infecção, que variaram de

TABELA 3. Resultados da análise multivariada mostrando a percentagem de erros, acertos e sem esfregaço de cada técnica de coloração permanente estudada

Técnica de coloração	Análise multivariada		
	Erros (%)	Acertos (%)	Sem esfregaço (%)
ZN S/AQ	22,2	72,2	5,56
ZN C/AQ	22,2	55,6	22,22
SF S/AQ	16,7	66,7	16,67
SF C/AQ	5,6	77,8	16,67
PR	22,22	66,7	11,11

ZN S/AQ: Ziehl-Neelsen sem aquecimento; ZN C/AQ: Ziehl-Neelsen com aquecimento; SF S/AQ: Safranina sem aquecimento; SF C/AQ: Safranina com aquecimento; PR: Panótico Rápido. Fonte: Os autores (2023).

TABELA 4. Resultados do controle de qualidade e da interferência do uso prévio de formol 10% na fixação do esfregaço fecal em lâmina

Amostra	Fixação do esfregaço		Coloração		Amostra previamente conservada em formol 10%	Interferência da conservação prévia com formol 10%
	Macroscópica	Microscópica	Macroscópica	Microscópica		
CCC001	✘	✘	✘	✘	SIM	✘
CCC002	✘	✓	✘	✓	SIM	NÃO
CCC003	✓	✓	✓	✓	NÃO	-
CCC004	✓	✓	✓	✓	SIM	NÃO
CCC005	✓	✓	✓	✓	SIM	NÃO
CCC006	✓	✓	✓	✓	SIM	NÃO
CCC007	✘	✓	✓	✓	SIM	NÃO
CCC008	✓	✓	✓	✓	SIM	NÃO
CCC009	✘	✓	✓	✓	NÃO	-
CCO001	✘	✘	✘	✘	NÃO	-
CCO002	✘	✘	✘	✘	NÃO	-
CCO003	✓	✘	✓	✘	NÃO	-
CCO004	✓	✓	✓	✓	NÃO	-
CCO005	✘	✓	✓	✓	NÃO	-
CCO006	✓	✓	✓	✓	NÃO	-
CCO007	✓	✓	✓	✓	NÃO	-
CCO008	✘	✘	✘	✘	NÃO	-
CCO009	✓	✓	✓	✓	NÃO	-

✓: Resultado satisfatório/bom; ✘: Resultado não satisfatório/ruim. Fonte: Os autores (2023).

34% a 83%¹⁵. É de conhecimento geral que a prevalência dessa doença é significativamente menor em países desenvolvidos em comparação aqueles em desenvolvimento, devido principalmente às condições de saneamento básico e à qualidade da água para consumo². Nosso estudo chama a atenção para a prevalência moderada encontrada, mesmo em uma população pequena, na qual sugere haver uma subestimação da real frequência de infecção por *Cryptosporidium* spp. na região. Nesse contexto, devemos mencionar que através das técnicas parasitológicas convencionais utilizadas na rotina laboratorial — como as técnicas de concentração parasitária — não é possível detectar a infecção por esses protozoários. As técnicas mais indicadas são aquelas de coloração, normalmente Ziehl-Neelsen modificado, previamente submetidas a uma técnica de concentração parasitária¹⁶.

Surpreendentemente, observou-se que as cinco técnicas de coloração permanente utilizadas no

presente estudo não tiveram boa concordância na detecção dos oocistos. A concordância foi calculada através do índice Kappa e foi caracterizada como “leve”. Em apenas duas amostras obteve-se um resultado positivo com duas técnicas simultaneamente. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de as técnicas de microscopia baseadas em coloração permanente apresentarem baixa sensibilidade — em torno de 30%². Acredita-se que essa baixa sensibilidade possa estar relacionada também à existência de oocistos “fantasmas”, que não coram com a fucsina de Ziehl-Neelsen⁵ e passam despercebidos pelo microscopista. E apesar do baixo custo e da facilidade na preparação das lâminas para microscopia, uma boa coloração (qualidade dos corantes e no preparo das lâminas) e as habilidades visuais dos microscopistas são essenciais para a liberação de laudos confiáveis⁴. Outro fato que pode explicar a baixa concordância entre as técnicas de coloração usadas é a confecção e análise de apenas uma lâ-

mina por técnica. No diagnóstico laboratorial dos protozoários intestinais, é recomendado que um significativo número de lâminas seja examinado antes de se concluir pela ausência do protozoário na amostra fecal⁶.

Um melhor desempenho na detecção de oocistos foi observado quando realizada a coloração pela técnica da SF C/AQ. Nossos resultados discordam de estudos anteriores, que demonstram que a técnica ZN S/AQ possui um melhor desempenho na coloração de *Cryptosporidium* quando comparada a outras técnicas, como SF e auramina¹⁷. Interessantemente, a coloração pelo PR, mostrou ser capaz de corar oocistos de *Cryptosporidium* spp. Normalmente utilizada na rotina de coloração de células hematológicas, a coloração pelo PR já foi descrita para coloração de hemoparasitos¹⁸. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo demonstrando a coloração de coccídeos intestinais utilizando essa coloração.

No presente estudo, a prévia conservação das amostras fecais em formol 10% não interferiu na fixação ou coloração do esfregaço em lâmina. É conhecido que oocistos submetidos à conservação prévia em formol 10% podem perder a capacidade de reter o corante fucsina¹⁹⁻²⁰. Entretanto, o tempo de exposição ao formol foi mais baixo (48 horas) quando comparado, por exemplo, ao estudo de Harrington²⁰, que submeteu os oocistos há vários dias ou semanas ao conservante.

Uma limitação do presente estudo foi o baixo número de amostras analisadas. Entretanto, não inviabilizou a realização e a confiança nos resultados.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a técnica de coloração permanente com Safranina com aquecimento apresentou melhor desempenho quando comparada a outras técnicas de coloração permanente no diagnóstico laboratorial de *Cryptosporidium* spp. Nós chamamos a atenção para a necessidade de constante avaliação e controle de qualidade das técnicas utilizadas na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

1. Thompson ARC, Koh WH, Clode PL. *Cryptosporidium* — What is it? *Food And Waterborne Parasitol.* 2016; 4:54-61.
2. Gerace E, Lopresti VDM, Biondo C. *Cryptosporidium* infection: epidemiology, pathogenesis, and differential diagnosis. *Eur J Microbiol Immunol.* 2019; 9(4):119-123.
3. Dumaine JE, Tandel J, Striepen B. *Cryptosporidium parvum.* *Trends Parasitol.* 2020; 36(5):485-486.
4. Checkley W, White AC Jr, Jaganath D, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infect Dis.* 2015; 15(1):85-94.
5. Crestia, J, Razakandrainibe R, Costa D, Damiani C, Totet A, Le Govic Y. 'Seven shades of *Cryptosporidium*'. *Clin Microbiol Infect.* 2022; 28(4):548-549.
6. De Carli GA. *Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas.* 1st ed. São Paulo: Atheneu; 2001.
7. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb).* 2012; 22(3):276-82.
8. Andrade F, Rode G, Silva Filho HH, Greinert-Goulart JA. Parasitoses intestinais em um centro de educação infantil público do município de Blumenau, SC, Brasil, com ênfase em *Cryptosporidium* spp. e outros protozoários. *Rev Patol Trop.* 2009; 37(4):332-340.
9. Ferreira ACMS, Santana IM, Romeiro ET, et al. *Cryptosporidium* spp. em população de comunidades, PE- Brasil. *Braz J Develop.* 2021; 7(8):79316-79330.
10. Norberg AN, Manhães FC, Matos AA, et al. Coccioses intestinais em crianças menores de quinze anos da Comunidade São Francisco de Assis, Manhuaçu, Minas Gerais, Brasil. *Interdisc Sci J.* 2019; 6(2):119-129.
11. Peralta RH, Velásquez JN, Cunha FS, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111(1):30-36.
12. Al-Shamiri A, Al-Zubairy A, Al-Mamari R. The Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in Children, Taiz District, Yemen. *Iran J Parasitol.* 2010; 5(2):26-32.
13. Khan A, Shams S, Khan S, Khan MI, Khan S; Ali A. Evaluation of prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* infection in rural population of district Buner, Pakistan. *Plos One.* 2019; 14(1):1-17.
14. Tombang AN, Ambe NF, Bobga TP, et al. Prevalence and risk factors associated with cryptosporidiosis among children within the ages 0-5 years attending the Limbe regional hospital, southwest region, Cameroon. *BMC Public Health.* 2019; 19(1):1144.
15. Dong S, Yang Y, Wang Y, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Acta Parasitologica.* 2020; 65:882–889.
16. Santos RP, Faria AR. Atualização em coccidioses intestinais: uma abordagem crítica. *RBAC.* 2019; 51(4):290-5.

17. Pacheco FT, Silva RK, Martins AS, et al. Differences in the detection of *Cryptosporidium* and *Isospora* (*Cystoisospora*) oocysts according to the fecal concentration or staining method used in a clinical laboratory. *J Parasitol*. 2013; 99(6):1002-8.
18. Carneiro IV, Almeida JL, Santos ALQ. Hemoparasites of red piranha *Pygocentrus nattereri* (Kner, 1858) (Characiformes: Characidae) captured in red river, middle Araguaia River region, state of Goiás (GO), Brazil. *Vet Not*. 2016; 22(2):41-50.
19. Garcia LS, Bruckner DA. *Diagnostic Medical Parasitology*. 2nd ed.; Washington: ASM Press; 1993.
20. Harrington BJ. Microscopy of 4 pathogenic enteric protozoan parasites: a review. *Lab Med*. 2008; 39(4):231–238.

DECLARAÇÕES

Contribuição dos autores

Concepção: AMA, RRC, MALO, PRC, LHJ. Metodologia: MAC, TRS, ALF, KDP. Coleta de dados: MAC, TRS, ALF, KDP. Tratamento e análise de dados: AMA, RRC, MALO, PRC, LHJ. Discussão dos resultados: MAC, TRS, ALF, KDP. Redação: MAC, TRS, ALF, KDP. Revisão: AMA, RRC, MALO, PRC, LHJ. Aprovação da versão final: MAC, TRS, ALF, KDP, AMA, RRC, MALO, PRC, LHJ.

Financiamento

Este artigo teve apoio financeiro do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica XXXII BIC/UFJF- 2019/2020) e do Programa de Residência Multiprofissional em Atenção Hospitalar – Análises Clínicas.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Aprovação no comitê de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o número CAAE: 06999319.6.0000.5133.

Disponibilidade de dados de pesquisa e outros materiais

Dados de pesquisa e outros materiais podem ser obtidos por meio de contato com os autores.

Editores responsáveis

Carolina Fiorin Anhoque, Blima Fux, Taísa Sabrina Silva Pereira.

Endereço para correspondência

Rua José Lourenço Kelmer, s/n, campus universitário, São Pedro, Juiz de Fora/MG, Brasil, CEP: 36036-900.