

Elenice Messias do Nascimento Gonçalves

Incidência de enteroparasitas com caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em diferentes comunidades brasileiras

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo
Pereira Corbett

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus pela graça da vida;

Aos meus pais, Benedito e Nair (in memorian), meus exemplos;

Ao Nelson, meu esposo e amigo de todos os momentos, pela cumplicidade ímpar em mais esta jornada;

Aos meus filhos: Bruno e Mariana, razões maiores de minha vida;

Aos meus irmãos: Edson, Euclésia, Evanilde e Etelvina e todas suas gerações, pelo apoio incondicional;

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett pela valiosa orientação e exemplo profissional. Sou grata por todas as oportunidades oferecidas, pela paciência e determinação na produção deste estudo.

À Prof^a Dra. Vera Lúcia Pagliusi Castilho, pela amizade, confiança e incentivo na vida pessoal, profissional e científica. Como amiga, soube escutar e tentar entender meus anseios. Como profissional, soube compreender as necessidades de dividir-me entre minha família, meu estudo e o laboratório. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Marcelo Nascimento Burattini, diretor técnico da DLC – HCFMUSP pela viabilização deste projeto.

À Magali Orban pela amizade fortalecida e pela contribuição ímpar durante a realização deste trabalho.

À Iaiko Horroiva Uemura, amiga de todas as horas e parceira incondicional, que sempre soube me escutar, estimular e cooperar.

À Ronalda Silva Araújo, amiga e parceira, pelo entusiasmo e profissionalismo durante os experimentos moleculares.

À Prof. Dra. Maria Helena Matté, minha mais nova parceira, detentora de conhecimento e sabedoria invejáveis, que aprendi a admirar no dia a dia pelas afinidades pessoais e profissionais.

Aos inestimáveis amigos do Serviço de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP: Divina Venâncio do Espírito Santo, Dorca

Lopes, Doris Rodrigues Alves, Iaike Horroiva Uemura, Loide Lopes, Magali Orban, Noélia Góes Rosa Fernandes, Renata Barbosa Pinto Ferreira, Valéria Aparecida Faria, Valquíria Antonia Luciano, Vera Lúcia Pagliusi Castilho e Wladimir Ribeiro dos Santos pelo trabalho em equipe, sem o qual seria inviável esta realização. Equipe de competência profissional, incansável e disponível a qualquer hora. Muito obrigada por todos os incentivos!

Aos amigos do Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas da FMUSP: Márcia, Cláudia, Thaise, Felipe, Edson, Zenaide pelo carinho acolhedor e disponibilidade.

À Lia Negrão pela amizade, respeito, carinho e dedicação de sempre.

À amiga Dalila Certo pela valiosa revisão final.

Aos amigos do Laboratório de Práticas de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP: Prof. Dr. Glavur Rogério Matté, Prof. Dra. Maria Helena Matté, Mirian, Milena, Martha, Therezinha, Licia e Livia, pelo acolhimento e colaboração na execução deste trabalho.

Aos membros de minha banca de qualificação pelos comentários pertinentes: Prof. Dr. Júlio César Rodrigues Pereira, Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva e Prof. Dra. Maria Helena Matté.

Ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo, por viabilizar a vinda do Prof. Dr. Martin Cox e de sua aluna Melane Whitehead, da Universidade de Coventry, Inglaterra.

À Prof^a. Márcia Kubrusly, pela permissividade na utilização de seu laboratório de biologia molecular durante a estadia dos pesquisadores ingleses.

Ao José Luis Llanos Carrillo que pacientemente prestou assessoria nas análises estatísticas, com direito a esclarecimento de tantas dúvidas.

Às secretárias Liduvina e Vera, do Departamento de Patologia e da Pós-Graduação da FMUSP, pela presteza nos trâmites burocráticos.

Às bibliotecárias: Valéria, Marinalva e Sueli pela presteza no processo final.

A todos os amigos da DLC do HCFMUSP pelo incentivo e solidariedade em diferentes etapas deste projeto.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação;

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo.

Summary

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Enteroparasitoses	2
1.2 <i>Cryptosporidium</i> spp.	5
1.2.1. Taxonomia	5
1.2.2. Histórico	9
1.2.3. Morfologia e sobrevivência dos oocistos	10
1.2.4. Localização	12
1.2.5. Ciclo de Vida	13
1.2.6. Transmissão	15
1.2.7. Epidemiologia	22
1.2.8. Patogenia e Sintomatologia	27
1.2.9. Tratamento	31
1.2.10. Diagnóstico	32
2. OBJETIVOS	37
2.1 Geral	37

2.2	Específicos	37
3.	MÉTODOS	39
3.1	Local de Estudo	39
3.2	Obtenção de Amostras	40
3.3	Obtenção de dados	41
3.4	Análise Microscópica	42
3.4.1.	Detecção de enteroparasitos	
3.4.2.	Detecção, morfometria e quantificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	42
3.5	Análise molecular	44
3.5.1.	Recuperação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	44
3.5.2.	Extração de DNA	44
3.5.3.	Amplificação do DNA pela Reação de Cadeia de Polimerase Dupla (Nested Polymerase Chain Reaction) – PCR Dupla	45
3.5.3.1.	Amplificação do fragmento de 1035 pb da região SSUrRNA	45
3.5.3.2.	Eletroforese em gel de agarose	47
3.5.4.	Análise do DNA pela RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Perfil de digestão com enzimas de restrição	49
3.6	Análise Estatística	49
4.	RESULTADOS	52
4.1	Características do local de estudo	52

4.2	Obtenção de amostras	52
4.3	Características da população estudada	53
4.4	Análise microscópica	60
4.4.1.	Detecção de enteroparasitos	60
4.4.2.	Detecção, quantificação e mensuração morfológica de <i>Cryptosporidium</i> spp.	62
4.5	Análise molecular	63
4.5.1.	Detecção molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. através da PCR – Dupla	63
4.5.2.	Caracterização molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. através da RFLP	63
4.6	Análise epidemiológica	66
5.	DISCUSSÃO	75
6.	CONCLUSÕES	99
7.	ANEXOS	102
8.	REFERÊNCIAS	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Micrografia de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	12
Figura 2	Micrografia de biópsia mostrando infecção epitelial (1) e diferentes estágios de desenvolvimento de <i>Cryptosporidium</i> spp. (2)	12
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.	16
Figura 4	Prováveis ciclos de transmissão de <i>Cryptosporidium</i> spp. ..	20
Figura 5	Micrografia de <i>Cryptosporidium</i> spp. Método de Kinyoun modificado	43
Figura 6	Esquema da localização das regiões variáveis e posições relativas dos iniciadores dentro do gen 18 SSUrRNA, com respectivos tamanhos de seus produtos amplificados	46
Figura 7	Alinhamento de espécies contidas na região polimórfica	48
Figura 8	Frequência de helmintos detectados em 2.410 amostras fecais submetidas a diferentes métodos de concentração ...	61
Figura 9	Frequência de número de protozoários associados em 671 amostras fecais com positividade para estes parasitos	61
Figura 10	Frequência de protozoários detectados em 2.410 amostras fecais submetidas a diferentes métodos de concentração e de colorações	62

Figura 11	Imagem do gel de agarose apresentando os fragmentos amplificados de 214 pb de diferentes amostras fecais submetidas a PCR – Dupla	64
Figura 12	Resultado da digestão do fragmento de 214 pb com a enzima de restrição <i>TaqI</i> de diferentes amostras clínicas ...	65
Figura 13	Resultado da digestão do fragmento de 214 pb com a enzima de restrição <i>AseI</i> de diferentes amostras clínicas ...	65
Figura 14	Distribuição de amostras fecais com positividade microscópica para oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em diferentes regiões do Brasil	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Nomenclatura taxonômica válida de espécies de <i>Cryptosporidium</i>	8
Tabela 2	Critério utilizado para estimativa da quantidade de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	44
Tabela 3	Distribuição de amostras fecais selecionadas de acordo com o ano de coleta	53
Tabela 4	Distribuição de dados clínicos como controle de saúde, doenças e sintomas por registros recuperados em meios físicos e/ou informatizados	55
Tabela 5	Distribuição de amostras fecais selecionadas de acordo com diferentes faixas etárias.....	56
Tabela 6	Distribuição de amostras fecais selecionadas de acordo com atividades setoriais	57
Tabela 7	Distribuição de amostras fecais de acordo com as Regiões de Saúde estabelecidas pelo Ministério da Saúde, nos estados do Brasil	58
Tabela 8	Distribuição de amostras fecais de acordo com as Diretorias Regionais de Saúde (DIRs), no Estado de São Paulo	59

Tabela 9	Correlação de amostras fecais com perfis característicos dos genótipos de <i>C. hominis</i> , de <i>C. parvum</i> e de <i>Cryptosporidium</i> não <i>hominis</i> não <i>parvum</i> , caracterizados pela análise molecular, com marcador imunológico – CD4 .	69
Tabela 10	Distribuição de amostras fecais microscopicamente positivas para oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. de acordo com sexo e idade na população estudada	70
Tabela 11	Distribuição de amostras fecais com perfis característicos dos genótipos de <i>C. hominis</i> , de <i>C. parvum</i> e de <i>Cryptosporidium</i> não <i>hominis</i> não <i>parvum</i> , caracterizados pela análise molecular, de acordo com as Diretorias Regionais de Saúde (DIRs), no Estado de São Paulo, Brasil	73

LISTA DE ABREVIATURAS

et al.	expressão abreviada de “et alli” e significa ‘e outros’
P.A.	para análise
q.s.p.	quantidade suficiente para
r.p.m.	rotações por minuto
T.A.	temperatura ambiente

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Cl ⁻	Íon de Cloro
g	Grama
H ₂ O	Água
H ₂ O MQ	Água Milli Q
Kb	Kilobase (Kilobyte)
mA	Miliampère
mg	Miligramma
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio (Magnesium Chloride)
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
Na ⁺	Íon de Sódio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amônio
nm	Nanômetro
p	Nível de Significância
pb	Pares de Bases
pH	Potencial de Hidrogênio
PVP	Polivinilpirrolidona
spp	Espécies do gênero
TAE	Tampão Tris Acetato EDTA
V	Volt
W	Watt
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
AseI	enzima de restrição purificada da bactéria <i>Aquaspirillum serpens</i>
CD4	sub-população de linfócitos T que expressão moléculas CD4
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
COWP	Proteína da parede de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> (<i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein)
dATP	Adenina deoxinucleosídeo trifosfato
dCTP	Citosina deoxinucleosídeo trifosfato
dGTP	Guanina deoxinucleosídeo trifosfato
DIRs	Diretórios Regionais de Saúde
DLC-HCFMUSP	Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado.
dTTP	Timina deoxinucleosídeo trifosfato.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra – acético (EthyleneDiamineTetracetic)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme Linked Imuno Sorbent Assay)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCLAB	Programa Informatizado para Gestão Laboratorial
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Vírus</i>)
ICR	Instituto da Criança
IFA	Ensaio de Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ITS	espaço interno transcrito (Internal transcribed spacer)
NBR-ISO 9001	versão brasileira da norma internacional ISO 9001
PALC	Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
RFLP	Perfil de Digestão com Enzimas de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (lauril sulfato de sódio)
SIGHLAB	Sistema de Informação e Gestão Hospitalar para Laboratórios Clínicos
SSUrRNA	Subunidade menor do RNA ribossômico
SUS	Sistema Único de Saúde
Taq DNA	enzima para realização da PCR
<i>TaqI</i>	enzima de restrição purificada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão tris ácido bórico e EDTA
TE	Tampão de EDTA
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral (Tumor Necrosis Factor – alpha)
Tris – HCL	Tri-hidroximetil aminometano (Tris Hydrochloride)
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (United States Environmental Protection Agency)
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization

RESUMO

Gonçalves, EMN. Incidência de enteroparasitas com caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em diferentes comunidades brasileiras. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 183p.

O estudo foi desenvolvido com o intuito de detectar e caracterizar *Cryptosporidium* spp. em pacientes de diferentes comunidades brasileiras, atendidos no HC-FMUSP. A amostra utilizada foi de 2.410 amostras fecais, provenientes de exames realizados na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC-HCFMUSP), no período de 2000 a 2006. A maioria das amostras (96,82%) era oriunda do Estado de São Paulo (DIR 1 a DIR 24), sendo que 56,18% eram do Município de São Paulo (DIR 1). Foi avaliada, também, sua relação com outros enteroparasitos, com dados clínicos e localização geográfica. Todas as amostras fecais foram submetidas a métodos de concentração para pesquisa de enteroparasitos, com resultado positivo de 4,6 % e 27,8 % para helmintos e protozoários, respectivamente. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados, por microscopia óptica após coloração pelo método de Kinyoun em 233 amostras fecais (9,7%), semi quantificados e medidos. A maioria das amostras apresentava pequena quantidade de oocistos. Nos isolados biológicos obtidos foi feito a extração do DNA genômico utilizando 223 amostras fecais preservadas a 20°C negativos, incubadas com solução de lise (Tris-HCl + EDTA + SDS 10% + β mercaptoetanol + PVP) e proteinase K seguida de extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) em tubo Phase Lock Gel light . A amplificação do DNA alvo foi feita com PCR dupla, tendo como marcador genético o gene 18 SSUrRNA. Os produtos da amplificação (amplicons) da PCR – Dupla foram digeridos pelas enzimas de restrição: *TaqI* e *Asel*. A PCR dupla confirmou *Cryptosporidium* em 37,2 %

(83/223) das amostras fecais analisadas, com sua caracterização em 62,7 % (52/83) após a digestão de seus produtos. Foram observados perfis característicos de *C. hominis* (88,5%), *C. parvum* (3,8%), *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis* (34,9%) e infecções mistas com *C. hominis* (27,2 %). Os não caracterizados foram considerados *Cryptosporidium* spp. *Cryptosporidium* spp. apresentou associações significativas com todos os grupos de riscos avaliados e diarreia. Foi observada correlação estatisticamente significativa entre tamanho dos oocistos detectados na microscopia e os genótipos *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium* não *hominis* não *parvum*. Conclui-se que diferentes genótipos de *Cryptosporidium* circulam em uma mesma região geográfica, infectando indivíduos tanto imunocompetentes como imunodeprimidos. A maior frequência de *Cryptosporidium hominis* indica a rota fecal oral como a mais importante na transmissão desta infecção. Métodos moleculares de genotipagem são essenciais para estudos epidemiológicos deste organismo.

Descritores: 1.*Cryptosporidium*/classificação; 2.Doenças parasitárias; 3.Reação em cadeia da polimerase; 4.Epidemiologia molecular.

SUMMARY

Gonçalves EMN. Incidence of enteroparasites with molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in different Brazilian communities. [Thesis]. São Paulo, Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2007. 183p.

The study was developed with the purpose to detect and characterize *Cryptosporidium* spp. in patients of different Brazilian communities attended at the HC-FMSUP. Fecal samples from 2,410 individuals were arise from the Central Laboratory Division of the University of São Paulo Medical School Hospital (DLC-HC-FMUSP) searching for enteroparasites, in the period from 2000 to 2006. Most samples (96.82%) were from São Paulo state (DIR 1 to DIR 4) of which 58.18% were from São Paulo city (DIR 1). Their relationship with other enteroparasites, clinical data and geographical localization was also assessed. In the search for enteroparasites, all fecal samples were submitted to concentration methods with a 4.6% and 27.8% positive result for helminths and protozoans, respectively. *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected, semi-quantified and measured in 233 fecal samples (9.7%), using light microscopy after staining by Kinyoun's method. Most samples presented few oocysts. In the biologic isolates genomic DNA extraction was performed using 223 fecal samples stored at -20°C, incubated with lysing solution (Tris-HCl + EDTA + 10% SDS + β mercaptoethanol + PVP) and proteinase K followed by extraction with

phenol-chloroform-isoamyl alcohol in a Phase Lock Gel Light tube. Amplification of target DNA was performed with double PCR, with 18 SSUrRNA gene as genetic marker. The double PCR amplification products (amplicons) were digested by *TaqI* and *AseI* restriction enzymes. Double PCR confirmed *Cryptosporidium* in 37.2% (83/223) of the analyzed fecal samples with characterization in 62.7% (52/83) after digestion of its products. Characteristic profiles of *C. hominis* (88.5%), *C. parvum* (3.8%), *Cryptosporidium non-parvum non-hominis* (34.9%) and mixed infection with *C. hominis* (27.2%) were observed. Those not characterized were considered to be *Cryptosporidium* spp. *Cryptosporidium hominis* presented significant associations with all evaluated risk groups and diarrhea. A statistically significant correlation between size of the oocysts detected by microscopy and the *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium non-hominis non-parvum* genotypes was observed. It is concluded that different *Cryptosporidium* genotypes circulate in the same geographical region, infecting both immunocompetent and immunodepressed individuals. The higher frequency of *Cryptosporidium hominis* indicates the fecal-oral pathway as the most important in the transmission of this infection. Molecular genotyping methods are essential for epidemiological studies on this parasite.

Descriptors: 1.*Cryptosporidium*/classification; 2.Parasitic disease; 3.Polymerase chain reaction; 4.Molecular epidemiology.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Enteroparasitoses

As enteroparasitoses são infecções parasitárias com distribuição mundial, mas predominando em países em desenvolvimento. Representam ainda grande agravo à saúde pública, causando problemas econômicos e sociais (World Health Organization, 1981; Colley, 2000; Brasil, Ministério da Saúde, 2005a). Contribuem para o baixo rendimento escolar em crianças e podem provocar baixo desenvolvimento cognitivo (Berkman et al, 2002; Niehaus et al, 2002), produtividade inadequada em adultos com redução da capacidade de trabalho, além de gastos com assistência médica (Fundação Nacional de Saúde, 2000; Awasthi et al, 2003). As manifestações clínicas são variadas, podendo apresentar diarreia, dores abdominais, perda proteica intestinal, desnutrição e anemia, além de aumentar a suscetibilidade a outras infecções (Muniz-Junqueira e Queiroz, 2002; Muniz et al, 2002; Stephenson, 1994; Sawaya et al, 1990; Pedrazzani et al, 1988).

A gravidade da sintomatologia das infecções parasitárias é decorrente do desequilíbrio entre parasito – hospedeiro – ambiente (Brasil, Ministério da Saúde, 2005a). Quanto ao parasito devem ser considerados: a espécie envolvida, sua patogenia, a intensidade da infecção, as associações parasitárias, sua localização, rota de transmissão e sensibilidade ao tratamento. Os fatores pertinentes ao hospedeiro, como grau de nutrição,

idade, hábitos de higiene, atividade econômica, condição sócio cultural, presença de doença básica concomitante e resistência imunológica, também são significativos na determinação da patogenia. Finalmente em relação ao meio ambiente, os fatores importantes são: condições climáticas, saneamento básico, fornecimento de água, processo migratório, densidade populacional, fontes de contaminação e controle de vetores e reservatórios (Monteiro et al, 1986; Gross et al, 1989; Savioli et al, 1992; Ferreira MU et al, 2000; Colley, 2000; Teixeira e Heller, 2006; Brooker et al, 2006).

Os helmintos apresentam grande diversidade em estrutura, fisiologia e comportamento, consequência de suas múltiplas adaptações ao hospedeiro. As helmintíases humanas mais comuns são as causadas por geohelmintos: *Ascaris lumbricoides*, Ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*) e *Trichuris trichiura*. (Awasthi et al, 2003; Bundy et al, 2000; Pedrazzani et al, 1988).

Protozoários intestinais têm distribuição cosmopolita e dentre os patogênicos mais importantes estão *Entamoeba histolytica*/ *dispar* e *Giardia lamblia* (ou *G. duodenalis* ou *G. intestinalis*) (Melo et al, 2004; Brasil, Ministério da Saúde, 2005a; Savioli et al, 2006). *Entamoeba dispar*, morfologicamente idêntica a *Entamoeba histolytica*, não é invasiva e apresenta baixa virulência. A caracterização destas duas espécies só é realizada por métodos imunoenzimáticos ou moleculares (Calderaro et al, 2006).

A presença de protozoários comensais indica a exposição do hospedeiro a fontes de infecção (Melo et al, 2004; Graczyk et al, 2005).

No Brasil, os trabalhos realizados durante as duas últimas décadas (Anexo A), não obstante a relevância epidemiológica, demonstram heterogeneidade nos métodos de coleta, conservação e análise das amostras fecais, assim como a seleção de amostragem da população estudada, normalmente constituída de usuários de serviços de saúde, alunos de escolas públicas e comunidades carentes. Esta heterogeneidade dificulta a comparação destes estudos, com freqüência das enteroparasitoses bastante variáveis, mas mostra que este é um problema inerente aos indivíduos econômica e culturalmente menos favorecidos (Wainstein e Petrillo, 1987; Monteiro et al, 1988; Gross et al, 1989; Moura et al, 1989; Ferreira CS et al, 1991; 1994; Guerra et al, 1991; Torres et al, 1991; Ferrari et al, 1992; Gioia, 1992; Lomazi et al, 1993; Santana et al, 1994; Costa-Cruz et al, 1995; Kobayashi et al, 1995; Dorea et al, 1996; Costa-Macedo e Rey, 1997; 2000; Ferreira e Marçal Junior, 1997; Rezende et al, 1977; da Costa-Macedo et al, 1998; Ferreira MR et al, 1998; Machado e Costa-Cruz, 1998; Miranda et al, 1998; 1999; Cimerman et al, 1999b; 2002; Ludwig et al, 1999; Machado RC et al, 1999; Tavares-Dias e Grandini, 1999; Tsuyuoka et al, 1999; Ferreira MU et al, 2000; Feitosa et al, 2001; Giraldi et al, 2001; Machado RLD et al, 2001; Prado et al, 2001; Uchoa et al, 2001; Capuano et al, 2002; Carneiro et al, 2002; Gomes et al, 2002; Gonçalves et al, 2002; 2003; 2005b; Alves JR et al, 2003; Brito et al, 2003; Ferreira P et al, 2003; Morrone et al, 2004; Zani et al, 2004; Araújo e Fernandez, 2005; Gurgel et al, 2005; Marques et al, 2005; Nascimento e

Moitinho, 2005; Nolla et al, 2005; Quadros et al, 2004; Tashima e Simões, 2004; Silva CV et al, 2005; Brooker et al, 2006).

O aparecimento da AIDS, a utilização de drogas imunossupressoras, o processo de globalização e a busca de técnicas específicas para diagnóstico mostraram o ressurgimento de doenças infecciosas consideradas erradicadas e o aparecimento de outras até então desconhecidas (Ferreira e Borges, 2002; Wilson, 2005).

Parasitos intestinais causadores de diarreia autolimitada em pacientes imunocompetentes, quando infectam indivíduos imunodeprimidos, podem provocar infecções parasitárias com sintomatologia mais severa, como diarreia profusa (Moura et al, 1989; Feitosa et al, 2001; Botero et al, 2003; Brantley et al, 2003).

Deste modo, infecções causadas por protozoários emergentes e oportunistas, tais como: *Microsporidio*, *Blastocystis hominis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* e *Cryptosporidium* spp.; tem despertado o interesse dos profissionais e gestores de saúde, devido à morbidade que causa e mesmo mortalidade (Curry e Smith, 1988; Goodgame, 1996; Ferreira e Borges, 2002; WHO, 2002; Ribes et al, 2004; Gonçalves et al, 2005a; 2006a; 2006b).

***Cryptosporidium* spp.**

Taxonomia

Cryptosporidium spp. é um protozoário parasito intracelular obrigatório, extracitoplasmático, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina e família Cryptosporidiidae (Casemore et al, 1985; Current e Garcia, 1991; Tzipori e Ward, 2002; Sunnotel et al, 2006a).

Análises filogenéticas utilizando seqüências gênicas da subunidade ribossomal do RNA (SSUrRNA) e β – tubulina (Carreno et al, 1999; Leander et al, 2003), e a existência de fases de desenvolvimento extracelular “in vitro” (Hijawi et al, 2004; Rosales et al, 2005), indicam que o gênero *Cryptosporidium* apresenta maior afinidade com gregarinas do que com coccídeos. Gregarinas são parasitos de invertebrados aquáticos e reações cruzadas com anticorpos anti-*Cryptosporidium* e gregarinas podem ocorrer. *Cryptosporidium* spp. difere de outros coccídeos pelo seu pequeno tamanho, seu confinamento na região apical das células hospedeiras, formação de oocistos de parede fina e grossa, e sua insensibilidade a agentes anti-coccídeos (Zhu et al, 2000).

O gênero *Cryptosporidium* consiste de diferentes espécies e genótipos que infectam diversos hospedeiros, que, anteriormente, quando isolados de humanos eram identificados como *Cryptosporidium parvum* (Egyed et al, 2003; Joachim, 2004).

Foram relatadas mais de 20 espécies de *Cryptosporidium* com base em: diferenças morfológicas, especificidade de hospedeiro, sítios de localização, comportamento e distribuição geográfica (Spano et al, 1997;

Fayer et al, 2000; Dillingham et al, 2002; Egyed et al, 2003; Xiao et al, 2002; 2004a), já que apenas critérios morfológicos são inconclusivos para diferenciação de espécies (Fall et al, 2003; Slapeta, 2006).

A determinação da posição taxonômica de várias espécies de *Cryptosporidium* ainda surpreende pela contínua expansão da complexidade deste gênero, o que se tornou mais confiável após a inclusão de ferramentas moleculares, segundo alguns pesquisadores (Pedraza-Diaz et al, 2001; Egyed et al, 2003; Thompson et al, 2005).

Mesmo assim, devido às diferenças relativamente pequenas entre as seqüências de isolados de *Cryptosporidium* de diversos hospedeiros, às vezes, associado à ausência de dados biológicos, alguns pesquisadores o denominam como complexo *C. parvum* (Widmer et al, 2002; 2004).

Assim sendo, para identificação ou denominação de nova espécie, é recomendável: obter medidas morfológicas de oocistos e micrografias através de microscópio ótico comum (método morfológico); descrever ciclo de vida incluindo estágios endógenos e estudos de transmissão cruzada, se possível documentar com microscopia eletrônica (método biológico); submeter a seqüência gênica a bancos de dados reconhecidos internacionalmente, e, se pertinente, enviar seus isolados a outros pesquisadores para avaliação paralela (método genético) (Xiao et al, 2000; 2004a; Morgan-Ryan et al, 2002; Bowman, 2005).

Tabela 1: Nomenclatura taxonômica de espécies válidas de *Cryptosporidium*. Adaptado de Xiao et al, 2004a; Fayer et al, 2000.

Espécie	Hospedeiro	Isolado em casos humanos	Medida (%)
<i>C. andersoni</i> **	Gado bovino	Não	6,0-8,1 X 5,0-6,5
<i>C. baileyi</i>	Frango	Ocasionalmente	5,6-6,3 X 4,5-4,8
<i>C. canis</i>	Cão	Ocasionalmente	3,7-5,9 X 3,7-5,9
<i>C. felis</i>	Gato	Ocasionalmente	3,2-5,1 X 3,0-4,0
<i>C. galli</i> ****	Pássaro	Não	8,0-8,5 X 6,2-6,4
<i>C. hominis</i> ***	Homem	Frequente	4,5-5,4 X 4,4-5,9
<i>C. meleagridis</i>	Peru	Ocasionalmente	4,5-6,0 X 4,2-5,3
<i>C. molnari</i>	Peixe marinho	Não	3,3-5,5 X 3,0-5,0
<i>C. muris</i>	Camundongo	Ocasionalmente	6,6-7,9 X 5,3-6,5
<i>C. parvum</i> ("cryptic species")*	Mamíferos	Não	4,5-5,4 X 4,2-5,0
<i>C. suis</i> (C. genótipo pig)*****	Porcos	Ocasionalmente	4,9-4,4 X 4,0-4,3
<i>C. bovis</i> *****	Gado bovino	Não	4,8-5,4 X 4,2-4,8
<i>C. parvum</i> (C. <i>pestis</i>)*****	Gado bovino	Frequente	4,5-5,4 X 4,2-5,0
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos	Não	4,4-5,6 X 4,2-5,2
<i>C. serpentis</i>	Cobras	Não	5,6-6,6 X 4,8-5,6
<i>C. wrairi</i>	Porco da Índia	Não	4,8-5,6 X 4,0-5,0

*Complexo *C. parvum* inclui subespécies que infectam cangurus, furões, coelhos, cavalos e macacos (Slapeta, 2006; Coupe et al, 2005; Widmer et al, 2002)

**Classificado como nova espécie (Lindsay et al, 2000)

***Classificado como nova espécie, anteriormente denominado *C. parvum* genótipo humano (Morgan-Ryan et al, 2002)

****Classificado como nova espécie (Ryan et al, 2003)

*****Classificado como nova espécie, anteriormente denominado *C. parvum* genótipo pig (Ryan et al, 2004)

*****Classificado como nova espécie, anteriormente denominado *C. parvum* genótipo bovino B (Fayer et al, 2005)

*****Classificado como nova espécie, anteriormente denominado *C. parvum* genótipo bovino (Slapeta, 2006).

Atualmente as espécies consideradas válidas são: *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. galli*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. molnari*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. saurophilum* e *C. serpentis* (Tabela 1) (Fayer et al, 2000; Xiao et al, 2004a). Destas, oito são reconhecidas por diversos pesquisadores como causadoras de criptosporidiose humana: *C. parvum* (*C. parvum* genótipo bovino ou genótipo 2 ou genótipo C ou tipo II ou *C. pestis*)

e *C. hominis* (*C. parvum* genótipo humano ou genótipo 1 ou genótipo H ou tipo I) são responsáveis pela maioria das infecções humanas; *C. felis*, *C. meleagridis* e *C. canis* (*C.* tipo dog) são relatados em pacientes imunocompetentes; e *C. muris*, *C. baileyi*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. suis* (*C.* genótipo pig) estão relacionados com criptosporidiose em pacientes imunossuprimidos (Fayer et al, 2000; Katsumata et al, 2000; Pedraza-Diaz et al, 2001; Xiao et al, 2001; 2004a.; Ramirez et al, 2004; Cacciò et al, 2005a; b; Thompson et al, 2005; Smith et al, 2006; Sunnotel et al, 2006a).

Histórico

Este parasito foi descrito primeiramente por Tyzzer em glândulas gástricas (1907) e intestino (1912) de camundongos, que os denominou de *C. muris* e *C. parvum*, respectivamente (Fayer et al, 2000; Ferreira e Borges, 2002; Hunter et al, 2002; Dillingham et al, 2002; Xiao et al, 2004a).

Em 1971, *C. parvum* teve importância reconhecida como agente etiológico de diarreias em bezerros provocando grande perda econômica (Casemore et al, 1985; Egyed et al, 2003).

Os dois primeiros casos humanos de criptosporidiose foram relatados em 1976. O primeiro caso foi de uma menina de três anos de idade apresentando gastroenterite severa por duas semanas (Nime et al, 1976),

enquanto que o segundo caso ocorreu dois meses depois, em um indivíduo imunossuprimido por terapia (Meisel et al, 1976).

Até 1982, *Cryptosporidium* foi relacionado a 11 casos esporádicos de gastroenterites autolimitadas, em pacientes imunocompetentes (Fayer et al, 1986; 2000; Dillingham et al, 2002).

A partir de 1982 assume importância relevante, por causar doenças graves em pacientes imunodeprimidos e/ou imunossuprimidos (Dillingham et al, 2002; Chalmers et al, 2004; Joachim; 2004; Thompson et al, 2005; Sunnotel, 2006a), sendo que até 1983 existiam cerca de 60 publicações e 56 comunicados adicionais ao CDC (Moura e Oliveira, 1985).

Em 1988, a USEPA, agência norte americana de proteção ambiental, inclui controle de *Cryptosporidium* em água potável, após a ocorrência do primeiro surto de criptosporidiose em 1985, no Texas (Hachich, 2002).

Em 1993, a ocorrência do surto de Milwaukee, Wiscosin, acometendo 403.000 pessoas, com 4.000 hospitalizações e cerca de 100 mortes, evidenciou que *Cryptosporidium* spp. é uma das causas relevantes de surtos, relacionados à distribuição de água, além de ser de difícil controle. O custo associado foi de \$31,7 milhões em medicamentos e de \$64,6 milhões em perda de produtividade (Corso et al, 2003; Hlavsa et al, 2005).

Morfologia e sobrevivência dos oocistos

Oocistos são esféricos ou ovalados e medem de 4 a 6 µm de diâmetro (Figura 1). Apresentam quatro esporozoitos e um corpo residual composto

por vários grânulos (Fayer e Ungar, 1986; Fall et al, 2003). Estudos ultraestruturais mostram que estágios endógenos de *Cryptosporidium* spp. possuem uma organela de adesão (Fayer e Ungar, 1986; Goodgame, 1996; Smith et al, 2005). A parede dos oocistos é lisa, com espessura média de 50 nm, composta por duas camadas eletrodensas, constituídas por glicoproteínas, separadas por uma camada glicolipídica/lipoproteica intermediária (Fayer e Ungar, 1986; Fall et al, 2003). Apresenta uma sutura linear disposta no terço ou metade distal da parede, por onde elimina os esporozoitos durante o processo de excitação (Dillingham et al, 2002; Smith et al, 2005). A digestão prévia de sua parede com proteinase K se mostra mais eficiente que a realizada por tripsina e pepsina, proporcionando melhor lise quando utilizado fenol-clorofórmio (Fayer e Ungar, 1986). Oocistos podem permanecer viáveis por vários meses no ambiente, demonstrado por estudo onde oocistos de bezerro incubados sob condições ambientais controladas e avaliados por cinco diferentes ensaios resultaram infectivos pelo período de sete meses (Dillingham et al, 2002; Ortega e Liao, 2006). A temperatura afeta sua infectividade que é inativada pelo rápido decréscimo ou aumento de temperatura (Ortega & Liao, 2006). Oocistos são resistentes às técnicas antissépticas comuns, mas sensíveis à solução de amônia 5 a 10% e formaldeído 10% (Carey et al, 2004; Fayer e Ungar, 1986).

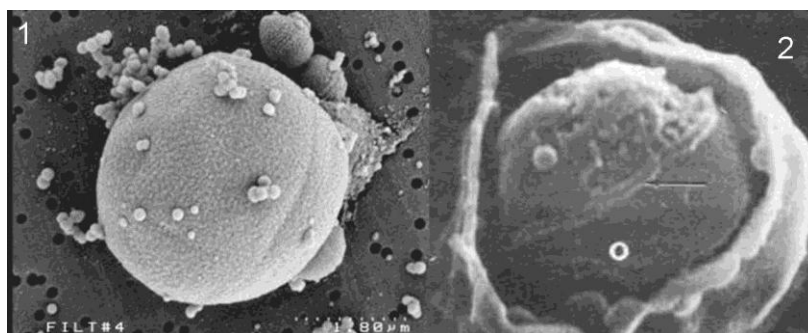


Figura 1: Micrografia de oocistos de *Cryptosporidium* spp. 1 - Oocisto de parede fina. 2 - Oocisto de parede grossa (Fayer e Ungar, 1986)

Localização

Cryptosporidium spp. infecta a região apical das células epiteliais do trato gastrointestinal e respiratório de vários hospedeiros vertebrados, incluindo humanos. Sua localização é intracelular, extracitoplasmática, dentro de um vacúolo parasitóforo aderido à membrana apical da célula (Casemore et al, 1985; Fayer et al, 2000; Current e Garcia, 1991; Zhu et al, 2000; Hashim et al, 2006; Xiao et al, 2000; 2004a) (Figura 2).

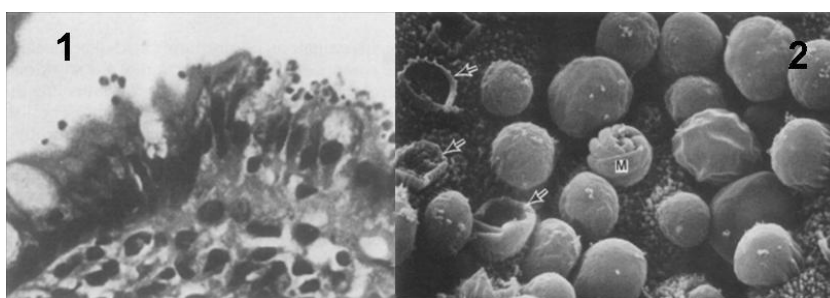


Figura 2: Micrografia de biópsia mostrando infecção epitelial (1) e diferentes estágios de desenvolvimento de *Cryptosporidium* spp. (2) (Casemore et al, 1985; Current e Garcia, 1991).

Um modelo utilizando porcos sustenta a hipótese de que um fator específico de aderência lecitina esporozoíta foi identificado como agente de

ligação à superfície das células intestinais (Goodgame, 1996). Após a aderência do esporozoíto, há a hipótese de que as células da mucosa epitelial liberam citocinas que ativam fagócitos. Essas células ativadas liberam fatores solúveis que aumentam a secreção intestinal de água e cloretos e inibem a absorção. Esses fatores solúveis incluem histamina, serotonina, adenosina, prostaglandina e fatores ativadores de plaquetas, que atuam sobre os nervos entéricos e as próprias células epiteliais. Conseqüentemente, as células morrem por resultado direto da invasão, multiplicação e extrusão do parasito, ou se danificam devido à inflamação, causando distorção das vilosidades, má absorção de nutrientes, desidratação e desequilíbrio eletrolítico (Fayer e Ungar, 1986; Hunter e Nichols, 2002; Smith et al, 2005; Hashim et al, 2006).

Ciclo de Vida

Oocistos, formas infectantes do *Cryptosporidium* spp., são responsáveis pela infecção de hospedeiros vertebrados, quando ingeridos ou mesmo inalados. No intestino delgado (íleo), a excitação é desencadeada pela ação de enzimas proteolíticas e sais biliares, ocorrendo liberação de quatro esporozoítos, que invadem as células epiteliais intestinais na superfície luminal. Ocorrem ciclos assexuados (merogonia ou esquizogonia) com produção de merontes tipo I (quatro divisões nucleares) e tipo II (duas divisões nucleares), com produção de 8 ou 4 merozoítos,

respectivamente. Merozoitos derivados de merontes tipo II invadem novas células e se diferenciam em micro e macrogametocitos (esporogonia ou gametogonia). Os microgametas, móveis e aflagelados, rompem a célula hospedeira e invadem uma célula contendo macrogameta, que se fertilizam formando o zigoto. Esse zigoto se reveste de parede formando dois tipos de oocistos: um de parede fina (20%) e outro de parede grossa (80%), ambos infectantes e com quatro esporozoitos livres. Oocistos de parede fina apresentam falhas na constituição da parede resistente, e são responsáveis pela auto-infecção, com liberação de esporozoitos ainda no intestino que infectam novas células. Os oocistos de parede grossa, envoltos por parede dupla, que lhes confere maior resistência, são eliminados com as fezes para o meio ambiente, infectando novos hospedeiros (Casemore et al, 1985; Dillingham et al, 2002; Joachim, 2004; Sunnotel et al, 2006a).

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. é rápido (Figura 3). Cada geração desenvolve e amadurece dentro de 12 a 14 horas. Devido a essa rapidez e aos ciclos autoinfectivos, mesmo com baixo número de oocistos ingeridos, o número de parasitas colonizando o trato intestinal é elevado, provocando morte celular e estímulo do sistema imune, responsáveis pelos sintomas observados durante a infecção (Casemore et al, 1985; Dillingham et al, 2002; Carey et al, 2004; Thompson et al, 2005; Sunnotel et al, 2006a). Embora a infecção normalmente se restrinja ao trato digestivo, em indivíduos imunossuprimidos ela pode ser estendida ao estômago, ductos biliar e pancreático além do trato respiratório (Palmieri et al, 2005; Clemente et al, 2000).

Transmissão

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. eliminados pelos hospedeiros infectados permanecem viáveis por longo período no meio ambiente e mais de 10^{10} são eliminados por infecção (Spano et al, 1997; Tzipori e Ward; 2002; Dillingham et al, 2002; Ramirez e Sreevatsan, 2006). Apresenta uma grande implicação em saúde pública porque muitos casos são assintomáticos, não existe tratamento efetivo, e a criptosporidiose pode ser fatal em indivíduos imunocomprometidos (Katsumata et al, 2000; Dillingham et al, 2002; Joachim, 2004; Thompson et al, 2005).

A disseminação destes oocistos é determinada por cinco fatores importantes: seu pequeno tamanho; sua resistência aos desinfetantes comuns; seu estágio infectivo quando eliminado; sua baixa dose de infecção; e seu potencial zoonótico, exceto *C. hominis*. O risco de infecção depende do número (inóculo) e da virulência ou infectividade de oocistos ingeridos, assim como da suscetibilidade do hospedeiro. (Kosek et al, 2001; Dillingham et al, 2002; Tzipori e Ward, 2002; Carey et al, 2004; Xiao et al, 2004a; Cacciò et al, 2005b; Sunnotel et al, 2006a).

A quantidade real de oocistos necessária para estabelecer a criptosporidiose humana, não é conhecida; como pode ocorrer autoinfecção, a ingestão de poucos oocistos, pode levar a infecção persistente, particularmente em imunodeprimidos. A dose média de infecção (ID 50) é de 132 oocistos para pessoas sadias sem evidência sorológica de infecção prévia. Em surtos, esta dose pode ser menor, como ocorrido em Milwaukee

quando indivíduos desenvolveram a doença com a ingestão de apenas um oocisto (Tzipori e Ward, 2002; Carey et al, 2004; Thompson et al, 2005; Smith et al, 2006).

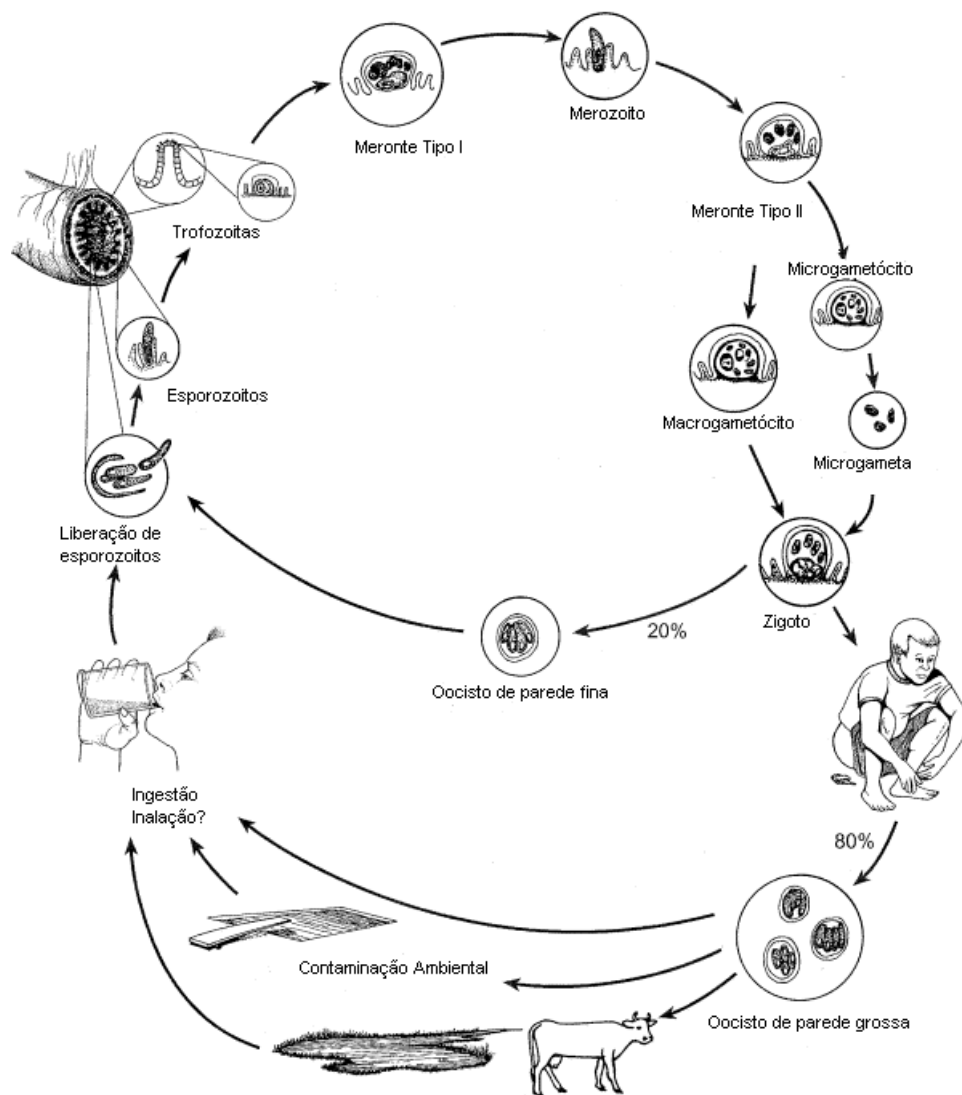


Figura 3: Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Adaptado de Dillingham et al, 2002.

A viabilidade do oocisto pode ser estimada por colorações vitais ou excistação, cultura celular ou transmissão cruzada (Dillingham et al, 2002; Carey et al, 2004; Xiao et al, 2004a; Smith et al, 2005; Hashim et al, 2006). Dentre as colorações vitais, DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindone) / PI (*propidium iodide*) são as mais utilizadas para monitoramento e fornecem boa correlação com a excistação 'in vitro'. Oocistos são classificados em: viáveis (permeável ao DAPI e impermeável ao PI), inviáveis (permeável ao DAPI e ao PI), e latentes (impermeável ao DAPI e ao PI) (WHO, 2002). Tanto a cultura celular como a transmissão cruzada é utilizada para controle de desinfecção, principalmente em amostras ambientais (Johnson et al, 1995; WHO, 2002; Health Canada, 2004; Sunnotel et al, 2006a).

A suscetibilidade do hospedeiro varia com a idade, estado imunológico, exposição prévia ao parasito e outros fatores genéticos ou ambientais (Newman et al, 1999; 1994; 1993; Dillingham et al, 2002; Joachim, 2004; Xiao et al, 2004a; Cacciò et al, 2005b; Sunnotel et al, 2006a; Roy et al, 2004).

São considerados fatores de risco: viagens para países endêmicos, contato com animais ou indivíduos infectados; contato com indivíduos com diarreia; crianças menores de cinco anos e freqüentadoras de creche ou menores de dois anos residentes em locais sem saneamento adequado ou ainda crianças desnutridas; freqüentar piscinas públicas; indivíduos com resposta imune celular e/ou humoral deficientes, tais como: infectadas com HIV, ou imunossuprimidos por hipo ou agamaglobulinemia, síndrome de hiperimmunoglobulinemia M, com deficiência seletiva de IgA, deficiência de

IFN γ , leucemia, transplantados ou em terapia com drogas imunossupressivas; idosos; gestantes e usuários de água de superfície contaminada (Dillingham et al, 2002; Hunter et al, 2002; 2004a; Roy et al, 2004; Thompson et al, 2005; Cacciò et al, 2005b; 2006; Savioli et al, 2006).

A transmissão pode ocorrer através do contato pessoa a pessoa, animal – pessoa ou água e alimentos contaminados por pessoas ou animais eliminadores de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Egyed et al, 2003; Cacciò et al, 2005b; Gonçalves et al, 2006a; Smith et al, 2006; Savioli et al, 2006; Sunnotel et al, 2006a).

A transmissão pessoa a pessoa, através de higiene deficiente ou provável inalação de oocistos, é responsável pela maioria dos surtos em creches e hospitais, assim como atividades sexuais também podem ser responsabilizadas entre indivíduos com AIDS (Newman et al, 1994; Fayer et al, 2000; WHO, 2002; Dillingham et al, 2002; Gonçalves, 2002; Hunter e Nichols, 2002; Ramirez et al, 2004; Cacciò et al, 2005b; 2006).

A transmissão através do contato animal - pessoa, principalmente bezerros, é mais freqüente na zona rural; como o surto ocorrido em Pensilvânia, 1991. Animais domésticos parecem não estar implicados nesta rota. (Joachim, 2004; Xiao et al, 2004a; Tanriverdi et al, 2006).

Transmissão indireta ou zoonótica pode ocorrer através de contaminação de bebidas e alimentos, assim como das águas de superfície (abastecimento, recreacionais, oceânicas e estuárias) e efluentes de esgoto e de atividades agropecuárias (Heller 2004; Health Canada, 2004; Slifko et

al, 2000; WHO, 2002; Dillingham et al, 2002; Lima e Stamford, 2003; Xiao et al, 2004a; Cacciò et al, 2005b; Thompson et al, 2005; Ramirez et al, 2006; Smith et al, 2006; Savioli et al, 2006).

Alimentos e bebidas podem ser contaminados por manipuladores assintomáticos e sintomáticos, ou através de irrigação com água ou adubo contaminado. Há indícios de que esta contaminação, também, possa ocorrer por vetores mecânicos tais como: baratas, moscas domésticas, alguns tipos de besouro e rotíferos aquáticos, provocando casos esporádicos ou surtos (Johnson et al, 1995; Fayer et al, 2000; Quiroz et al, 2000; Hunter et al, 2002; Gragzyk et al, 2003; Carey et al, 2004; Heller et al, 2004). Já foram relatados casos de criptosporidiose pela ingestão de leite, frango, salsicha, carne, saladas, vegetais crus, ostras, mariscos e mexilhões (Slifko et al, 2000; Takayanagui et al, 2001; Schlundt et al, 2004; Miller et al, 2005). Por outro lado, a ingestão de vegetais crus parece oferecer papel protetor à infecção, hipoteticamente explicado por repetidas exposições a esta rota, com formação de imunidade protetora (Hunter et al, 2004b; 2004a; Ramirez et al, 2004; Gonçalves et al, 2006a).

Contaminação das águas de superfície pode ocorrer por precipitação de chuva, contato com esgoto, tratamento inadequado ou ineficiente, ou por todos estes fatores relacionados. Oocistos podem permanecer viáveis na água por mais de 140 dias e são resistentes ao cloro utilizado em desinfecção para o consumo humano. Esta representa a maior fonte de criptosporidiose para humanos. Vários surtos têm sido relatados por contaminação de águas recreacionais, assim como, por colapso ou

sobrecarga no fornecimento de água pública (Johnson et al, 1995; Spano et al, 1998; McLauchlin et al, 2000; Carey et al, 2004; Ramirez et al, 2004; 2006; Xiao et al, 2004a; Thompson et al, 2005; Smith et al, 2006; Sunnotel et al, 2006a).

Explicar a epidemiologia da criptosporidiose humana é difícil pela existência de diferentes rotas de transmissão e pelas dificuldades em identificar espécies utilizando ferramentas convencionais, mas o avanço de técnicas moleculares tem oferecido um grande impacto neste campo (Hunter et al, 2002; Joachim, 2004; Xiao et al, 2004a; 2004b; Miller et al, 2005; Gonçalves et al, 2006a; Cacciò et al, 2005a; 2005b).

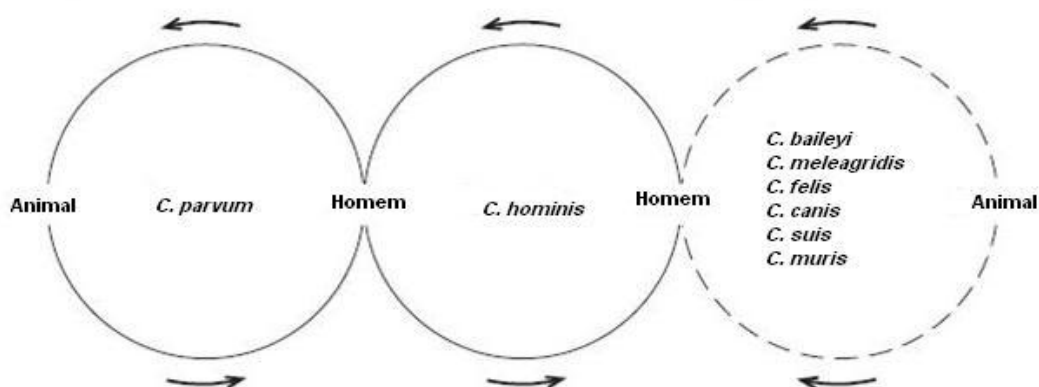


Figura 4: Prováveis ciclos de transmissão de *Cryptosporidium* spp. Adaptado de Cacciò et al (2005a) e Joachim (2004).

A maioria das infecções humanas é causada por *C. hominis* e *C. parvum*, embora novos genótipos estejam sendo identificados, ciclos de transmissão diferentes, antroponótico e zoonótico, são sugeridos para criptosporidiose de acordo com a Figura 4 (Peng et al, 1997; Gatei et al, 2003; Samie et al, 2006; Alves M et al, 2003; Monis et al, 2003; Joachim,

2004; Hunter et al, 2004a; Ramirez et al, 2004; Xiao et al, 2004b; Cacciò et al, 2005a; Sulaiman et al, 2005; Thompson et al, 2005; Smith et al, 2006; Sunnotel et al, 2006a).

Estudos recentes têm mostrado que *C. parvum* e *C. hominis* apresentam significante polimorfismo genético, podendo sofrer recombinações genéticas dentro e entre genótipos isolados. Este polimorfismo genético pode ser detectado por marcadores como mini e macro satélite (Feng et al, 2000; Widmer, 2004; Joachim, 2004; Xiao et al, 2004a; 2004b; Cacciò et al, 2005a; 2005b; 2006; Gonçalves et al, 2006a; Muthusamy et al, 2006).

Interessantemente, variações geográficas e temporais são observadas para infecções causadas por *C. hominis* e *C. parvum*. *C. hominis* é mais prevalente nas Américas, Austrália e África (62%), enquanto que *C. parvum* o é na Europa (57%) (Xiao e Ryan, 2004b; Alves M et al, 2003; Cacciò et al, 2005b; Leoni et al, 2006). Na Inglaterra apresentam variações dentro do próprio país, indicando que a infecção humana causada por *C. parvum* é maior em zonas rurais (Cacciò et al, 2005a; 2006; Leoni et al, 2006). Na Inglaterra, a sazonalidade é marcada por dois picos de doença: na primavera (*C. parvum*) e final de verão e início de outono (*C. parvum* e *C. hominis*) (McLauchlin et al, 2000; Cacciò et al, 2005a; 2005b). Nos Estados Unidos da América o pico da infecção ocorre no verão e início do outono (Hlavsa et al, 2005). A grande maioria dos surtos é causada por uma única espécie/genótipo de *Cryptosporidium*, enquanto que isolados de infecções esporádicas, algumas vezes, apresentam mais de uma espécie/genótipo

(McLauchlin et al, 2000; Fayer et al, 2000; Tanriverdi et al, 2006; Xiao et al, 2004a; Egyed et al, 2003; Guk et al, 2005; Gonçalves et al, 2006a).

Epidemiologia

Cryptosporidium spp. está amplamente associado a infecções entéricas em mais de 170 espécies animais, das quais 150 são mamíferos. Tem sido relatado em mais de noventa países, nos seis continentes, principalmente em meses quentes e úmidos (Fayer et al, 2000; Dillingham et al, 2002; Carey et al, 2004; Joachim, 2004; Ramirez et al, 2004; Thompson et al, 2005).

Criptosporidiose representa um grande problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento (Newman et al, 1993; Kosek et al, 2001; Pereira et al, 2002; Savioli et al, 2006; Smith et al, 2006; Sunnotel et al, 2006). Geralmente em países em desenvolvimento a infecção é endêmica, enquanto que em países desenvolvidos está relacionado a surtos esporádicos e epidêmicos (Fayer et al, 2000; Newman et al, 1994; Dillingham et al, 2002; Thompson et al, 2005; Gonçalves et al, 2006a; Carvalho-Almeida et al, 2006; Carvalho et al, 2006).

Tanto indivíduos imunocompetentes quanto os imunodeprimidos congênitos ou induzidos por terapia ou HIV/AIDS são infectados, com prevalência maior no segundo grupo (WHO, 2002; Hunter et al, 2002; 2004a; Roy et al, 2004).

Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras fecais de pacientes imunocompetentes com gastroenterite, revela prevalência de 1 a 4% na Europa e América do Norte e de 3 a 20% na África, Ásia, Austrália, América do Sul e Central (Current e Garcia, 1991; Ferreira e Borges, 2002; Carey et al, 2004; Roy et al, 2004). Em pacientes admitidos em hospitais com diarreia, 2 a 2,5% estão eliminando oocistos (Upton, 1999; Hunter et al, 2002).

Para pacientes com AIDS é estimado que cerca de 10% apresente criptosporidiose crônica em países desenvolvidos, e acima de 40% em países em desenvolvimento (Rodrigues et al, 1991; Cimerman et al, 1999b; 2002; Ferreira e Borges, 2002; Leav et al, 2003).

Foi verificado, através de busca ativa, na Inglaterra, que 56% dos relatos de criptosporidiose, entre 1997 e 1998, não eram HIV+, e 90% não estavam envolvidos a surtos (Roy et al, 2004).

Criptosporidiose já foi relatada em indivíduos de 3 dias a 90 anos de idade. Em países desenvolvidos há picos de incidência em crianças de até 5 anos (creches) e adultos de 21 a 40 anos, enquanto que em países em desenvolvimento ocorre predomínio em crianças menores de 2 anos e idosos, devido à falta de higiene e saneamento básico (Casemore et al, 1985; Newman et al, 1994; Capuano et al, 2001; Pereira et al, 2002; Guk et al, 2005; Joachim, 2004; Xiao et al, 2004a; Thompson et al, 2005).

A taxa de portadores assintomáticos, detectada por endoscopia é de cerca de 10%, e pelo exame microscópico de fezes menor que 1%, em países desenvolvidos. Enquanto que em países em desenvolvimento, o

exame microscópico de fezes detecta taxa de 10 a 30% (Current e Garcia, 1991; Newman et al, 1994; Upton, 1999; WHO, 2002; Ramirez et al, 2004).

A taxa de soro prevalência em países desenvolvidos é de 25 a 35%; enquanto que em países em desenvolvimento é de 60 a 95%. Esta taxa aumenta com a idade do hospedeiro, sendo maior em trabalhadores rurais e de saúde, e em crianças freqüentadoras de creche ou moradoras em locais inadequados (Current e Garcia, 1991; Newman et al, 1994; WHO, 2002; Roy et al, 2004; Savioli et al, 2006).

O Centro de Vigilância de Doenças de Notificação de Wales, Inglaterra, recebe cerca de 5.000 casos de criptosporidiose notificados por ano (Hunter et al, 2004).

Até o ano de 2000, mais de 3.000 casos foram notificados ao CDC, posicionando *Cryptosporidium* spp. ao lado de *Escherichia coli* 0157: H7, no topo das vinte doenças mais notificadas nos EUA (Roy et al, 2004).

No Brasil, entre 1980 e 1997, foram detectados 2.842 casos de criptosporidiose entre pacientes imunodeprimidos, tendo a região Nordeste e Sudeste como as mais afetadas (Lima e Stamford, 2003). Este número deve estar subestimado em razão do desconhecimento da doença, inclusive por médicos (Wiebbelling et al, 2002), assim como a inadequação dos laboratórios clínicos para sua detecção (Castilho, 2002), ou, ainda, porque sua pesquisa é feita somente mediante solicitação médica específica (Sodré e Franco, 2001), além da não procura por atendimento médico pelo indivíduo com diarreia, implicando na ausência de diagnóstico (Wilson, 2005).

No Brasil, o registro sistemático de doenças veiculadas por água e alimentos, de notificação compulsória, foi implantado em 1999, com monitoramento de água e inclusão de pesquisa destes agentes, para que possa atingir o padrão de potabilidade (Brasil, Ministério da Saúde, 2005b). No Estado de São Paulo, esta implantação ocorreu em 1995, com a ocorrência de 13 surtos causados por *Cryptosporidium* spp. até 2005 (Gonçalves, 2002; São Paulo: CVE, 2006).

Em 2002, revisão feita sobre infecções afetando indivíduos imunocomprometidos, coloca *Cryptosporidium* spp. como o segundo agente causal de infecções oportunistas (Ferreira e Borges, 2002).

Há relatos de criptosporidiose em pacientes com AIDS, nos Estados de São Paulo (Dias et al, 1988; Rodrigues et al, 1991; Guizelini e Amato Neto, 1992; Sauda et al, 1993; Cimerman et al, 1999a; 1999b; 2002; Capuano et al, 2001; Oliveira et al, 2002) e do Rio de Janeiro (Moura et al, 1985; 1989; Silva S, 2004); submetidos a transplantes (Chieffi et al, 1990) e portadores de doenças hematológicas com uso de terapia imunossupressora (Chieffi et al, 2005). Em Fortaleza, Ceará, a ocorrência em imunodeprimidos parece estar associada à transmissão pela água (Wuhib et al, 1994), assim como em Recife, Pernambuco (Arcoverde, 2001).

Criptosporidiose foi detectada em crianças com diarreia em São Paulo, São Paulo (Guizelini e Amato Neto, 1992; Mangini et al, 1992; Grisi, 1993; Oliveira et al, 2002), em Ribeirão Preto, São Paulo (Medeiros et al, 2001), em Uberlândia, Minas Gerais (Gennari-Cardoso et al, 1996), no Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Silva S et al, 2003), em Belém, Pará (Loureiro et al,

1989), em Recife, Pernambuco (da Silva et al, 1994), em Fortaleza, Ceará (Bushen et al, 2007; Lima AA et al. 2000; Agnew et al, 1998), em Goiânia, Goiás (Pereira et al, 2002), em Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Oshiro et al, 2000), em Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Cantalice Neto et al, 1998), em Maringá, Paraná (Moitinho et al, 1999), e em Criciúma, Santa Catarina (Schnack et al, 2003). Também estão relatados surtos em creches de São Paulo, São Paulo (Guizelini et al, 1992; Gonçalves, 2002; Carvalho-Almeida et al, 2006), de Campinas, São Paulo (Franco e Cordeiro, 1996) e de Botucatu, São Paulo (Carvalho et al, 2006).

Em Fortaleza, Ceará, soro prevalência indica infecção nos dois primeiros anos de vida, com 90 % de positividade em crianças de até um ano de idade e residentes em favela. Animais domésticos e fontes de água contaminadas contribuem para a manutenção desta infecção na zona urbana (Lima AA et al, 1992; Newman et al, 1994; 1993; Agnew et al, 1998). Em São Paulo, soropositividade para IgG alcança 80% em crianças de até 10 anos de idade (Cox et al, 2005).

Em Perus, São Paulo, oocistos foram detectados em amostras fecais e de água (Toms, 1998). Em Itaquaquecetuba, São Paulo, sua presença foi detectada em água para consumo humano (Gamba et al, 2000). Em Florianópolis, Santa Catarina, amostras de esgoto foram positivas para *Cryptosporidium* spp. (Iacovski et al, 2004). Em Campinas, São Paulo, oocistos foram observados em água do Rio Atibaia (Franco et al, 2001) e em amostras de esgotos (Santos et al, 2005; Neto et al, 2006), assim como em Araras, São Paulo (Dias Junior, 1999). Em São Paulo, São Paulo, presença

de oocistos foi detectada em águas de superfície (Farias et al, 2002; Muller, 2000; Espindola, 2001; Hachich et al, 2004), assim como em amostras de esgotos (Farias, 2002).

Oocistos já foram relatados em água mineral (Franco e Cantusio Neto, 2002), em alface e rúcula (Takayanagui et al, 2001).

Também foram identificados em animais domésticos (Newman et al, 1993) e silvestres (Dall'Olio e Franco, 2004), em pombos (Carvalho-Almeida, 2004) e em cães (Lallo e Bondan, 2006).

Avaliações de eficácia terapêuticas foram conduzidas com colostro bovino (Abreu, 2001) e antiretrovirais (Bushen et al, 2004), assim como desinfecção ambiental (Neto et al, 2006).

Estudos epidemiológicos utilizando métodos moleculares têm relatado presença de *C. não parvum* (Ortega et al, 1991); de *C. hominis* em São Paulo, São Paulo (Gonçalves et al, 2002; 2006a); de *C. hominis* em Aracaju, Sergipe (Gatei et al, 2003), de *C. parvum*, *C. hominis* não *C. parvum* em Fortaleza, Ceará (Brantley et al, 2003) e em São Paulo, São Paulo (Carvalho-Almeida, 2004); de *C. parvum* e *C. hominis* em São Paulo e Taubaté, SP, e de *C. hominis* e *C. meleagridis* em Sorocaba, São Paulo (Araujo, 2004); de *C. parvum* e *C. hominis* no Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Silva, 2004).

Patogenia e Sintomatologia

Cryptosporidium spp. parece não se empenhar muito para invadir o sistema dos hospedeiros, seu sucesso parece estar ligado ao desenvolvimento rápido, à fácil disseminação e à grande resistência a desinfetantes usados rotineiramente em assepsia (Dillingham et al, 2002; Fayer et al, 2000; Cacciò et al, 2005b; Sunnotel et al, 2006a).

Todos os indivíduos são suscetíveis à infecção pelo *Cryptosporidium* spp., mas a duração e severidade da doença dependem da virulência da espécie/genótipo do infectante e da resposta imune do hospedeiro (Hunter et al, 2002; WHO, 2002; Brantley et al, 2003; Gatei et al, 2003; Leav et al, 2003; Carey et al, 2004; Joachim, 2004; Xiao et al, 2004a; Savioli et al, 2006). Quanto à virulência *Cryptosporidium* spp. pode ser classificado como: de alta virulência para *C. hominis* e *C. parvum*, de baixa virulência para *C. meleagridis* e *C. muris* e; de virulência desconhecida para *C. baileyi*, *C. felis*, *C. canis* e *C. suis* (Egyed et al, 2003).

O potencial de cada espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* em estabelecer sintomatologia clínica é desconhecido, mas estudo recente relata que além dos pertinentes ao trato digestivo, *C. hominis* parece causar dores articulares, recorrentes dores de cabeça, vertigens e fadiga, provavelmente por apresentar menor diversidade genética que *C. parvum* (Hunter et al, 2004a; 2004b; Cacciò et al, 2000; 2005b).

Geralmente a infecção se limita ao jejuno e íleo, mas em imunodeprimidos pode se estabelecer no esôfago, estômago, duodeno e ceco, como também no trato biliar, respiratório e urinário (Hunter et al, 2002; Leav et al, 2003; Carey et al, 2004; Palmieri et al, 2005). Em crianças

desnutridas, a criptosporidiose, geralmente, implica em doenças respiratórias acompanhadas de diarreia (Agnew et al, 1998; Hunter et al, 2002).

É sugerido que tanto as respostas imunes celular quanto humoral oferecem proteção contra reinfecção, ou diminuem a severidade da doença em casos de infecção por espécie ou genótipo diferente, provável razão pela qual cerca de um terço de infectados imunocompetentes não apresentam sintomatologia (Cacciò et al, 2000; WHO, 2002; Ferreira e Borges, 2002; Hunter et al, 2002; Brantley et al, 2003; Leav et al, 2003; Xiao et al, 2004a). A doença é mais persistente em indivíduos com contagem de CD4 menor que 180 células / mm³ (Capuano et al, 2001; Hunter e Nichols, 2002; Roy et al, 2004; Muthusamy et al, 2006).

O período pré-patente, tempo entre infecção e eliminação ativa de oocistos, geralmente é de 4 a 20 dias, com média usual de sete dias. O período patente, tempo de excreção de oocistos pelas fezes, pode variar de dias a meses ou anos, com média de 1 a 2 semanas após o final da sintomatologia (Hunter et al, 2002; 2004b; Carey et al, 2004; Roy et al, 2004).

Estudo da difusão típica de oocistos foi feito em bezerros Holstein de quatro dias de idade, infectados oralmente com 25 milhões de oocistos de *Cryptosporidium* spp., com fezes coletadas, em intervalos de 24 horas, e quantificação do número de oocistos. Nenhum oocisto foi detectado antes de quatro dias pós-infecção (DPI), o pico máximo de produção foi entre 6 e 8

DPI, com número variável de 2 a 20 bilhões de oocistos em um único período de 24 horas nessa fase (Upton, 1999).

O sintoma mais comum é a diarreia aquosa, algumas vezes profusa e com muco, raramente com sangue. Frequentemente está associada a náusea, febre baixa, distúrbios intestinais e anorexia. Em indivíduos imunocompetentes pode perdurar por 10 a 14 dias e é autolimitada, isso porque respondem à infecção com produção de anticorpos que parecem reduzir o número de parasitos no intestino. Em imunocomprometidos, a sintomatologia é mais grave, apresentando diarreia: aguda, crônica, intermitente ou contínua, com 2 a 26 evacuações por dia, totalizando até 25 litros de fezes líquidas, o que leva a uma perda de peso e ao desequilíbrio eletrolítico, e morte em cerca de 50% dos casos. A terapia antiretroviral tem reduzido este impacto (Spano et al, 1998; Bornay_Llinares et al, 1999; Pieniazek et al, 1999; Cacciò et al, 2000; Amadi et al, 2002; Ferreira e Borges, 2002; Pereira et al, 2002; Dillingham et al, 2002; Brantley et al, 2003; Chalmers et al, 2004; Carey et al, 2004; Ribes et al, 2004; Sunnotel et al, 2006a; Leav et al, 2003; Hashim et al, 2006; Sandhu et al, 2006).

A diarreia, geralmente, acontece quando há prejuízo da absorção intestinal ou aumento de secreções, processos regulados pelos enterócitos infectados por *Cryptosporidium* spp. Em modelos experimentais, tem sido observado prejuízo na absorção de Na^+ e de H_2O e /ou aumento da secreção de Cl^- com anormalidades na propriedade de barreira do epitélio intestinal, resultando na liberação de lactato desidrogenase citoplasmática, podendo culminar em morte celular. Em pacientes aidéticos, má-absorção

de vitamina B12 e D xilose tem sido observada, assim como teste de permeabilidade anormal de lactose/manitol (Hunter e Nichols, 2002; Fayer et al, 2000; Brantley et al, 2003).

Tratamento

Nenhuma terapia segura e efetiva foi desenvolvida satisfatoriamente. Um antiparasitário salicilamida de amplo espectro derivado de nitrotiazol, nitazoxanida reduz a diarreia e a eliminação de oocistos (Amadi et al, 2002; Savioli et al, 2006). Terapia antiretroviral induz a auto-resolução ou confere proteção ao hospedeiro, por provocar resposta imune (Hunter e Nichols, 2002; Bushen et al, 2004). Para resolução e/ou prevenção de criptosporidiose são necessários linfócitos CD4⁺ e IFN γ . Camundongos com decréscimo de linfócitos CD4⁺ apresentam maior suscetibilidade e são incapazes de resolver a infecção. Deficiência de IFN γ diminui o período de incubação, aumenta a excreção de oocistos e acelera a doença, neste caso tratamento com IL-12 reduz a severidade da infecção. A resposta imune pelas células humanas infectadas parece envolver produção de TNF α e de IL-8 (Hunter e Nichols, 2002; Sandhu et al, 2006; Sunnotel et al, 2006a).

Há necessidade de reidratação, que pode ser associada à terapia farmacológica como a paromomicina e azitromicina, e a terapia imunológica como o colostro bovino hiperimune ou anticorpos monoclonais (Clemente et al, 2000; Palmieri et al, 2005; Zardi et al, 2005).

Diagnóstico

Cryptosporidium spp. pode ser detectado por métodos invasivos ou não. Sua primeira identificação como patógeno foi feita em biópsia de intestino, por Tyzzer em 1907, é uma técnica específica, mas, geralmente, os sítios comuns de localização não são acessíveis por endoscopia (Clemente et al, 2000; Mehta, 2002, Leav et al, 2003).

Oocistos nas fezes são detectados desde 1978, pelas colorações de Giemsa, Ziehl – Neelsen a quente, Safranina, Kinyoun modificada e Auramina (Garcia et al, 1983; Casemore et al, 1985; Moura e Oliveira, 1985; Weber et al, 1992; Mehta, 2002). A coloração de Kinyoun modificada é utilizada como rotina diagnóstica, desde 1987, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo - HCFMUSP (Gonçalves, 2002).

Podem ser utilizados métodos de concentração para identificação dos oocistos diretamente em amostras fecais, tais como: método de flutuação por Cloreto de Sódio, método de flutuação por Sulfato de Zinco, método de flutuação por densidade de sacarose, método de concentração por água - éter (Casemore et al, 1985; Weber et al, 1992; Gonçalves, 2002).

Embora o método de coloração seja considerado padrão ouro para o diagnóstico, este só pode ser realizado por microscopista treinado, além de requerer grande quantidade de oocistos para sua detecção, podendo resultar em diagnósticos equivocados ou casos não diagnosticados. Também, não permite diferenciação de espécies/genótipos de *Cryptosporidium* (Garcia e Shimizu, 1997; Xiao et al, 2001; Gonçalves, 2002;

Carey et al, 2004; Leav et al, 2003; Lima e Stamford, 2003; Magi et al, 2006; Chalmerset al, 2004; Sunnotel et al, 2006a).

Os testes imunológicos, comerciais, para detecção de antígenos de *Cryptosporidium parvum* nas fezes, tanto os imunoenzimáticos (EIA ou ELISA) como os de imunofluorescência (IFA) e imunocromatografia apresentam boa sensibilidade (75% a 88%) e especificidade ($\geq 98\%$), são de fácil execução, não requerem conhecimento e experiência como a microscopia, permitem processamento de grande número de amostras em curto tempo, não apresentam reações cruzadas. São testes que prevêm limitações de procedimento, sugerindo repetições e/ou correlações com sintomatologia, principalmente quando o número de oocistos é baixo, além de custo considerável. Para amostras ambientais o mais utilizado é IFA, mas requer um grande número de oocistos para sua detecção (Garcia et al, 1997; 2003; Gonçalves, 2002; Mehta, 2002; Lima e Stamford, 2003; Weitzel et al, 2006). Em estudo realizado experimentalmente com gatos infectados com *Cryptosporidium* spp. e tendo IFA e PCR como métodos avaliados para sua detecção, a concordância entre eles foi de 72%, denotando maior sensibilidade ao PCR (Scorza et al, 2003).

Os métodos sorológicos para detecção de anticorpos anti *Cryptosporidium* são simples, rápidos, mas não diferenciam infecção prévia de corrente, assim como não diferenciam espécies, além da produção de antígenos específicos ser de alto custo (Ferreira e Borges, 2002; Cox et al, 2005; Sandhu et al, 2006).

Assim sendo, métodos moleculares têm sido desenvolvidos para detecção e diferenciação de diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, tanto em amostras clínicas como ambientais (Caccio, 2003; Dillingham et al, 2002; Jiang J, Xiao, 2003; Chalmers et al, 2004; Xiao e Ryan, 2004b), auxiliando na determinação do estado da doença, seus padrões de transmissão e de fontes de infecção deste parasito (Morgan et al, 2000; Thompson et al, 2005).

A PCR, um dos primeiros sistemas de amplificação do ácido nucléico, é a mais utilizada, baseia-se na natureza polimórfica do *Cryptosporidium* como: β - tubulina, proteína de parede do oocisto (COWP), dihidrofolatoredutase (DHFR), proteína adesiva 1 relacionada a trombospondina (TRAP-C1), proteína adesiva 2 relacionada a trombospondina (TRAP-C2), espaço interno transcrito (ITS1), cadeia politimina (Poli – T), subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA), além de seqüências genômicas indefinidas (Johnson et al, 1995; Bornay_Llinares et al, 1999; da Silva et al, 1999; Pieniazek et al, 1999; Spano et al, 1997; Pedraza-Diaz et al, 2001; Gonçalves et al, 2002; 2006a; Gatei et al, 2003; Nichols et al, 2006; Sunnotel et al, 2006b; Muthusamy et al, 2006; Xiao et al, 2006).

Fragmentos de gene da subunidade menor do ribossomo (SSUrRNA) parece estar presente em maior número de espécies de *Cryptosporidium*, de acordo com a positividade de amplificações apresentadas na literatura (Bornay_Llinares et al, 1999; Gonçalves, 2002; Carvalho-Almeida, 2004;

Chalmers et al, 2004; Tanriverdi et al, 2006; Xiao et al, 1999; 2000; 2001; 2002; 2004a; 2004b; 2006).

A presença de inibidores em amostras fecais pode afetar a sensibilidade da PCR (Lantz et al, 1997; Koonjul et al, 1999; Gonçalves, 2002; Carvalho-Almeida, 2004; Nsubuga et al, 2004; Piggott, 2004; Silva, 2004; Araújo et al, 2006), mas pode ser minimizada com protocolo de extração adequado (da Silva et al, 1999; Ward e Wang, 2001; Higgins et al, 2001; Chalmers et al, 2004).

A PCR é requerida para detecção de menor número de oocistos, por ser mais sensível, fornecendo informações adicionais à microscopia e tendo grande impacto na elucidação dos agentes causadores de criptosporidiose, particularmente na taxonomia, biologia, patogenia, epidemiologia, transmissão e tratamento, auxiliando os epidemiologistas na vigilância e determinação de fontes de infecção (Morgan et al, 2000; McLauchlin et al, 2000; Morgan-Ryan et al, 2002; Caccio, 2003; Egyed et al, 2003; Leav et al, 2003; Xiao et al, 2004b; Gonçalves, 2006a; Nichols et al, 2006; Ramirez e Sreevatsan, 2006; Slapeta, 2006; Soba et al, 2006; Soldan et al, 2006; Smith et al, 2006).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a frequência de *enteroparasitos* em diferentes comunidades brasileiras e identificar genótipos de *Cryptosporidium* spp. nestas amostras.

Específicos

Correlacionar as infecções por *Cryptosporidium* spp. com dados clínicos e laboratoriais.

Identificar os possíveis fatores de risco que podem favorecer a distribuição dos isolados em determinada população.

Relacionar os isolados com possíveis rotas de transmissão no homem.

Aprimorar e implementar métodos que identifiquem espécies de *Cryptosporidium* e seus genótipos.

Padronizar a caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium* spp.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Local de Estudo

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), criado em 1943, é um hospital público, altamente especializado, associado à Universidade de São Paulo, com 2.200 leitos e 9.888 servidores ativos, está vinculado à Secretaria de Estado da Saúde como autarquia estadual. É constituído pelo: Instituto Central, Instituto de Ortopedia e Traumatologia, Instituto de Psiquiatria, Prédio da Administração, Instituto do Coração, Laboratórios de Investigação Médica, Instituto da Criança, Prédio dos Ambulatórios, Instituto de Medicina Nuclear e Instituto de Radiologia. Possui hospitais auxiliares de retaguarda, o Hospital Auxiliar de Suzano e o Hospital Auxiliar de Cotoxó; o Hospital Estadual Sapopemba; além da Divisão de Medicina e Reabilitação situada no bairro da Vila Mariana, e a Casa da AIDS. Ocupa posição de destaque como instituição de assistência, ensino e pesquisa, sendo um avançado centro de excelência e referência no desenvolvimento de tecnologia para a saúde, sem paralelo na América Latina. Atende pacientes provenientes de convênios com a rede pública, e uma pequena parcela de pacientes procedentes da rede privada através das empresas de medicina, e empresas seguradoras de saúde ou particulares (Hospital das Clínicas, 2006).

A Divisão de Laboratório Central – HCFMUSP (DLC-HCFMUSP) situado no 2º andar do Prédio dos Ambulatórios responde pela execução dos exames laboratoriais do Complexo HCFMUSP, SUS externo, convênios e particulares, oferecendo mais de 600 tipos diferentes de exames, com atendimento diário de 2.500 pacientes. A certificação ISO 9002 obtida em 1997 e confirmada pela re-certificação obtida em 2002, com a nova norma ISO 9001:2000, assim como sua acreditação pelo PALC em 2006, atestam a qualidade dos exames realizados (Hospital das Clínicas, 2006).

O Serviço de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central ocupa uma área de 100m² e realiza cerca de 14.000 exames/mês, graças à sua capacidade operacional e à excelente qualidade de seu quadro funcional (Hospital das Clínicas, 2006). Tem a pesquisa de protozoários emergentes (*Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, *Blastocystis hominis* e microsporidio) estabelecida como rotina, sendo que a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. é feita por coloração e por imunoensaio – ELISA – desde 1987 e 2006, respectivamente.

3.2 Obtenção de Amostras

Amostras fecais, provenientes de pacientes com solicitação para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e/ou pertencentes a grupos de riscos para protozoários emergentes, foram selecionadas da rotina diagnóstica do Serviço de Parasitologia da DLC-HCFMUSP, desde fevereiro

de 2000. Todas as amostras fecais foram aliqüotadas em tubos tipo “eppendorf” nomeados como:

Tubo A: contendo amostra fecal “in natura” e congelada (20°C negativos);

Tubo B: contendo amostra fecal em formalina tamponada 10%, proporção 1:3; sob refrigeração (4°C).

Tubo C: contendo amostra fecal em dicromato de potássio 2,5%, proporção 1:3, sob refrigeração (4°C).

Foram armazenadas no acervo do Serviço de Parasitologia - DLC-HCFMUSP, e os ensaios laboratoriais foram realizados no Serviço de Parasitologia da DLC - HC FMUSP, no Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas da FMUSP e no Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP.

3.3 Obtenção de dados

As amostras fecais selecionadas foram catalogadas e identificadas em fichas coleta de dados (Anexo B), onde os dados relativos a cada uma eram registrados. Todas foram avaliadas quanto à consistência em: líquida, pastosa ou formada. Os dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos foram obtidos de prontuários, registros e/ou consulta ao sistema informatizado (HCLAB e/ou SIGHLAB). Os endereços foram utilizados para distribuição das amostras, de acordo com Regiões de Saúde estabelecidas pelo Ministério da Saúde, nos estados da Federação (Brasil, Ministério da Saúde, 2002; Souza, 2001). Para o Estado de São Paulo esta distribuição

obedeceu a divisão das Diretorias Regionais de Saúde (DIRs) (Guimarães, 2005)

3.4 Análise Microscópica

3.4.1 Detecção de enteroparasitos

O diagnóstico das doenças parasitárias foi feito pela demonstração morfológica de parasitos intestinais, rotineiramente realizado no Serviço de Parasitologia da DLC_HCFMUSP, pela interação dos métodos de: Hoffman, Pons e Janer (Lutz) (Hoffman et al, 1934), Faust e cols. (Faust et al, 1939) e Rugai modificado (Rugai et al, 1954).

Para detecção de protozoários emergentes, esfregaços de amostras fecais, conservadas em formalina tamponada 10%, foram submetidos a métodos de colorações complementares e examinados ao microscópio ótico comum em objetiva de 100X. Assim foram realizados: método de Kinyoun modificado (Moura e Oliveira, 1985; Gonçalves, 2002; 2005a) para detecção de *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*; de Gram-Chromotrope (Gonçalves et al, 2006b) para microsporídio, e de Leishman (De Carli, 2001) para *Blastocystis hominis*.

3.4.2 Detecção, morfometria e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Os esfregaços foram realizados com 10 µl de amostra fecal, conservada em formalina tamponada, em lâminas de vidro para microscopia, 76 x 26 mm, e fixados com metanol PA.

Para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., foi realizado o método de Kinyoun modificado (Moura e Oliveira, 1985; Gonçalves, 2002; 2005a). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram oocistos, com tamanho e estruturas internas características (Figura 5).

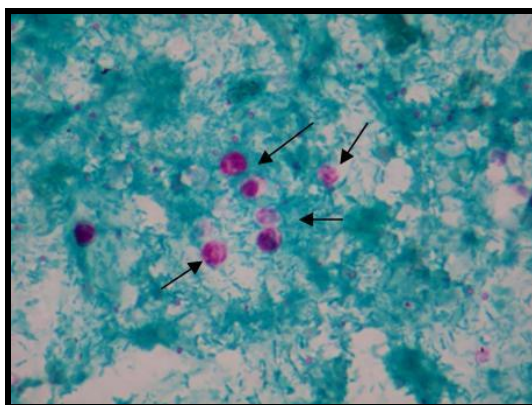


Figura 5: Micrografia de *Cryptosporidium* spp. Método de Kinyoun modificado. Aumento de 1.000 vezes. Pesquisa, 2007.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp., quando detectados, foram medidos com auxílio de micrômetro ocular, durante a leitura realizada em microscópio ótico comum. Foi calculada média para cada lâmina.

Para estimar a quantidade de oocistos foram contados 100 campos na objetiva de 100X. Quando nenhum oocisto era encontrado nos 100 campos examinados, todo o esfregaço era observado ($\cong$ 200 campos). As quantificações foram feitas em cruces, conforme tabela 2.

Tabela 2: Critério utilizado para estimativa da quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp., utilizando objetiva de 100 X em microscópio ótico comum. Pesquisa, 2007.

<i>Cryptosporidium</i> spp.			
Estimativa de Quantidade	+	++	+++
Oocistos / todo o esfregaço	1 a 10	—	—
Oocistos / 100 campos do esfregaço	—	10 ≤ 50	> 50

3.5 Análise Molecular

3.5.1 Recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Amostras fecais “in natura” (20°C negativos), positivas para *Cryptosporidium* spp., foram descongeladas a temperatura ambiente e diluídas em água deionizada, na proporção de 1:1, em tubos de 2ml, para um volume final de 300 µl.

3.5.2 Extração de DNA

A extração do DNA genômico de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi realizada em volume de 200 µl da amostra, baseada em protocolo descrito por Araújo et al, 2006 (in press).

Em suma, 200 µl de amostra de fezes foram acrescida de 500 µl de tampão de lise [50 µl de Tris – HCl 100mM (pH=8.0); 50 µl de EDTA 50 mM (pH=8.0); 50 µl de SDS 10%; 3,5 µl de β-mercaptoetanol 70 mM; 1 µl of polivinilpirrolidona (PVP) 1%; 345,5 µl de água ultra-pura (Milli-Q)], e incubado por 90 minutos em banho 65°C. Após incubação foram

adicionados, em cada tubo, 20µl de proteinase K (20 mg/mL), e novamente incubado por um período de 120 minutos na mesma temperatura. O DNA foi extraído com 500 µl fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), os tubos foram homogeneizados e a mistura foi transferida para tubos Phase Lock Gel light (Eppendorf®, Germany), os quais foram centrifugados por 15 minutos a 4°C. Foi removida a fase aquosa, presente na superfície do tubo, para um microtubo e precipitada com 700µL de álcool isopropílico gelado. Após a precipitação o DNA foi lavado com álcool etílico a 70%, seco sob vácuo, eluído em 50 µl de tampão TE, e conservado a 4°C até a utilização para amplificação do PCR.

3.5.3 Amplificação do DNA pela Reação de Cadeia de Polimerase Dupla (Nested Polymerase Chain Reaction) – PCR Dupla

3.5.3.1 Amplificação do fragmento de 1035 pb da região SSUrRNA

Para detecção molecular de *Cryptosporidium* spp. foi utilizado PCR dupla para ampliação de regiões variáveis do SSUrRNA: uma região hipervariável e três regiões polimórficas situadas entre nucleotídeos 615 – 850 e 179 - 271, respectivamente (Coupe et al, 2005) (Figura 6).

Para a primeira reação foi utilizado o par de iniciadores: SCL1 e CPBDIAGR. O iniciador SCL1 (5'-CTGGTTGATCCTGCCAGTAG-3') correspondente aos nucleotídeos de 4 a 23 e seu reverso CPBDIAGR (5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3') correspondente aos nucleotídeos de 1.016 a 1.036, que produz um fragmento de cerca de 1.032 pares de base (pb).

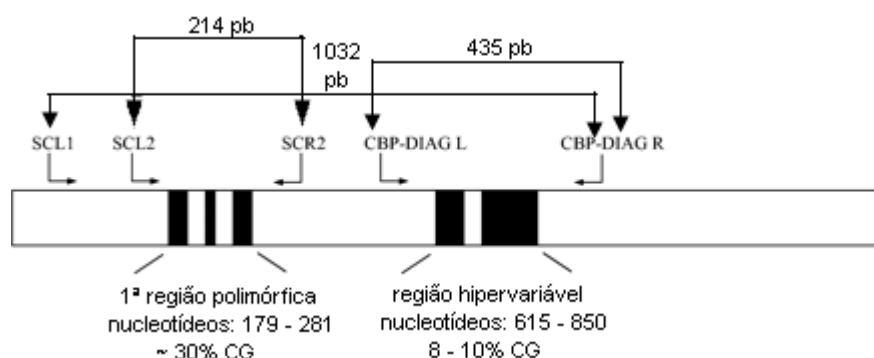


Figura 6: Esquema da localização das regiões variáveis e posições relativas dos iniciadores dentro do gen 18 SSUrRNA, com respectivos tamanhos de seus produtos amplificados. Adaptado de Coupe et al, 2005. Pesquisa, 2007.

Para cada reação foi feita uma mistura de PCR (“master mix”) para um volume final de 25 µl contendo: 5,0 µl de DNA, 14,2 µl de água ultrapura (Milli-Q), 2,5 µl de tampão de reação 10X, 1 µl de PVP 1%, 1,25 µl $MgCl_2$ 50 mM, 0,2 µl de dNTP 25 mM, 0,3 µl de cada iniciador, e 1,25 U (0,3µM) de TaqDNA polymerase (Taq Gen Biosystem).

As reações foram incubadas em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf), no seguinte ciclo de tempo e temperatura: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 39 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos originários da amplificação inicial foram utilizados como alvos para a segunda reação de PCR (Nested) utilizando os iniciadores internos SCL2 (5'-CAGTTATAGTTTACTTGATAATC-3') e SCR2 (5'-AATACCCTACCGTCTAAAG-3'), correspondentes aos nucleotídeos de 106 a 128 e de 299 a 318, respectivamente, que produzem um fragmento de 214

pb, decorrente da amplificação das duas primeiras regiões polimórficas situadas entre nucleotídeos 179 e 271, que podem ser utilizadas para diferenciação das diferentes espécies de *Cryptosporidium* (Figura 7).

Para esta reação foi feita uma mistura de PCR (“master mix”) semelhante à descrita para a 1ª etapa, exceções feitas à não inclusão de PVP e concentração de 0,4 µM de cada iniciador.

As reações foram incubadas em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf), no seguinte ciclo de tempo e temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 39 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todas as reações incluíram controle negativo {componentes mistura de PCR (“master mix”) sem DNA} e positivo (amostra sabidamente positiva).

3.5.3.2 Eletroforese em gel de agarose

A cada tubo contendo o produto amplificado foi adicionado 5 µl de Tampão Carregador de Amostra (glicerina + azul de bromofenol). Foi aplicado 10 µl desta mistura em cada posição do gel de agarose 1,8 % contendo brometo de etídio. A eletroforese foi realizada em Tampão TAE 1X sob tensão de corrente de 6V/cm por 1 hora. Em cada gel de agarose foi adicionado um marcador de peso molecular (50 pb - Anresco). A presença dos fragmentos foi visualizada sob fonte de luz ultravioleta a 362 nm, e foto documentado por meio do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

Espécies de <i>Cryptosporidium</i>	Posição do Nucleotídeo		
	179 a 195	224 a 232	255 a 271
<i>hominis</i>	AAAACCTCGACTTTTATGGA	ATATA - - - - ATTG	ATCACAATTA - - - - - ATGTGAC
<i>parvum rh monkey</i>	AAAACCTCGACTTTTATGGA	ATATA - - - - ATTG	ATCACAATTA - - - - - ATGTGAC
<i>parvum</i>	AAAACCTCGACTTTTATGGA	ATATA - - - - ATTG	ATCACATTAA - - - - - ATGTGAC
<i>canis</i>	AAAACCTGACTTTTTTGGGA	ATATT - - - - TTTG	ATCACATTTT - - - - - ATGTGAC
<i>parvum pig</i>	AAAACCTAACTTTTATGGA	ATATAA - - - TTTG	ATCACATTTTTA - - - - ATGTGAC
<i>meleagridis</i>	AAAACCTGACTTAATGGA	ATATA - - - - ATTG	ATCACAATTT - - - - - ATGTGAC
<i>parvum ferret</i>	AAGGCCTGACTTAATGGA	ATATA - - - - ATTG	ATCACATAAAT - - - - - TGTGAC
<i>wrairi</i>	AAGGCCCGACTTTTATGGA	ATATA - - - - ATTG	ATCACATAAAT - - - - - TGTGAC
<i>parvum kangaroo</i>	AAGACCTGACTTTTTTGGGA	ATATT - - - - TTTG	ATCACATAAATA - - - - ATGTGAC
<i>felis</i>	AAGACCCTACTTTTATGGA	ATATTTTTTTTTTG	ATCACAATAATTTATTTTGTGAC
<i>baileyi</i>	AAGACCCGACTTCTCGGA	ATACT - - - - CTTG	ATCACATTTA - - - - - TGTGAC
<i>andersoni</i>	AAAACCCAACTTCGCGGA	ATGAG - - - - CTTG	ATCGCATCTCTG - - - - ATGCGAC
<i>muris</i>	AAAACCCAACTTTGCGGA	ATGAG - - - - CTTG	ATCGCATCTCTG - - - - ATGCGAC
<i>serpentis</i>	AAGGCCCGACTTTTTTGGGA	ATATT - - - - TTTG	ATCGCATCTCTG - - - - ATGCGAC
	* * * * *	* * * * *	* * * * *

* indica nucleotídeos idênticos em todas as sequências

- indica intervalos

Figura 7: Alinhamento de espécies contidas na região polimórfica. Adaptado de Coupe et al, 2005.

3.5.4 Análise do DNA pela RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Perfil de digestão com enzimas de restrição

A análise dos produtos da amplificação (amplicons) da PCR – Dupla foi feita após digestão pelas enzimas de restrição: *TaqI* e *AseI* (NewEngland), que discriminam *Cryptosporidium parvum* de *Cryptosporidium hominis* e das demais espécies de *Cryptosporidium* spp.

Uma porção de 5 µl de amplicon, de 214 pb, foi digerida com 2U de cada enzima de restrição e tampão apropriado fornecido pelo fabricante para um volume final de 15 µl. A digestão foi realizada a 37°C para a enzima *AseI*, e a 65°C para a *TaqI*, por um período de 2 horas. Após o período de incubação, as reações foram mantidas a 65°C e a 80°C, para as enzimas *AseI* e *TaqI*, respectivamente, por 20 minutos, para inativação das enzimas.

Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, em intensidade de corrente de 6 V/cm, por uma hora em tampão TAE 1X e, em seguida visualizados sob fonte de luz ultravioleta a 362 nm, e foto documentado por meio do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

3.6 Análise Estatística

Todos os dados laboratoriais, clínicos e epidemiológicos foram registrados no programa MS Office Excell versão 2000. Foi calculada

freqüência relativa e absoluta de cada variável. Para CD4 foi feita análise de variância pelo teste ANOVA, com média e mediana para padronização de erros, desvios, valores mínimo e máximo. A correlação de *Cryptosporidium* spp. com todos os protozoários e helmintos detectados, assim como com as variáveis estabelecidas foi realizado pelo Teste Qui-quadrado. O Teste exato de Fisher foi utilizado quando os valores esperados foram menores que cinco. O nível de significância adotado foi o de valor de até 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Características do local de estudo

O Estado de São Paulo é subdividido em 24 regiões de saúde e representa 21,95% da população brasileira (São Paulo - Estado, 2006). São Paulo, São Paulo, tem uma média de 3,43 moradores por domicílio; servidos por rede de abastecimento de água (98,62%); rede de esgoto (87,23%); e coleta de lixo (97,20%) (São Paulo - Município, 2004).

O complexo HCFMUSP se localiza no núcleo I da DIR 1, região onde 99,88% dos domicílios tem rede de distribuição de água; 98,92% tem rede de esgoto; 99,99% tem coleta de lixo (São Paulo - Município, 2004); e pelo processo de reformulação no atendimento ambulatorial ocorrido em 2004, junto às Secretarias Estadual e Municipal de Saúde, esta é sua principal área de atendimento, exceção feita aos casos graves e complicados (Fundação Faculdade de Medicina, 2004).

Obtenção de amostras

Foram selecionadas da rotina diagnóstica do Serviço de Parasitologia da DLC-HCFMUSP, 2.410 amostras fecais de pacientes pertencentes a grupos de

riscos e/ou com solicitação para protozoários emergentes. A seleção foi feita nos anos de 2000 a 2006, com distribuição discriminada na Tabela 3. Em 2000 e 2001 a seleção objetivava amostras fecais para a dissertação de mestrado (Gonçalves, 2002), que culminou com amostras fecais derivadas de um surto diarréico nas crianças da Creche do HCFMUSP. Em 2002 e 2003 a seleção foi derivada de amostras positivas quando solicitada pesquisa de *Cryptosporidium* spp. Em 2004, foi retomada a busca ativa para a execução deste trabalho, com complementações em 2005 e 2006, justificadas pela necessidade de adequação da técnica de PCR desenvolvida.

Tabela 3: Distribuição de amostras fecais selecionadas de acordo com o ano de coleta. Pesquisa, 2007.

Ano de coleta	Número de amostras (N)	Porcentagem (%)
2000	376	15,6
2001	493	20,5
2002	4	0,2
2003	4	0,2
2004	1414	58,7
2005	37	1,5
2006	82	3,4
Total	2410	100

Características da população estudada

Foram considerados pacientes pertencentes a grupos de riscos para protozoários emergentes: crianças de até dez anos de idade (949), imunodeprimidos (382), idosos (544), funcionários em controle de saúde (244) e quaisquer outros apresentando diarreia (838). Foram considerados imunodeprimidos os pacientes portadores de HIV/AIDS, transplante, leucemias e imunodeficiências congênitas ou adquiridas. No grupo de imunodeficiências congênitas ou adquiridas foram incluídos todos os imunossuprimidos por terapia com drogas imunossupressivas ou com hipo ou agamaglobulinemia, síndrome de hiperimmunoglobulinemia M, deficiência seletiva de IgA e deficiência de IFN γ .

Os dados clínicos obtidos (71,4%) foram distribuídos em: controles de saúde (“check-up”), doenças e sintomas como mostrados na Tabela 4. Os registros apontavam variação de um (60,5%) a seis (0,05%) dados clínicos informados por paciente. As associações mais frequentes foram: diarreia e HIV/AIDS (2,6% = 45/1712), transplante e diarreia (1,9% = 33/1712), imunodeficiência congênita ou adquirida e diarreia (0,9% = 15/1712), diarreia e vômito (0,5% = 8/1712) e diarreia com anemia (0,4% = 6/1712). Em 28,6 % (698/2410) os dados clínicos não foram informados.

O marcador imunológico CD4, cujo valor referência varia de 493 a 1666 células por microlitro de sangue, foi recuperado em 7,7% (18/233) dos registros consultados, em que 55,6% (10/18) apresentavam imunodeficiência e 66,7% (12/18) diarreia, sendo que deste total 94,4% (17/18) apresentaram valores variando de 4 a 215 células por microlitros de sangue (média de 57).

Esta população era composta de 54 % (1.302/2.410) do sexo feminino e 46% (1.108/2.410) do sexo masculino.

Tabela 4: Distribuição de dados clínicos como controle de saúde, doenças e sintomas por registros recuperados em meios físicos e/ou informatizados. Pesquisa, 2007.

Dados clínicos	Frequência (N)	Porcentagem (%)
Controle da Saúde	244	10,1
Gestação	27	1,1
Controle de Verminose	72	3
HIV / AIDS	153	6,3
Hemoparasitose	9	0,4
Imunodeficiência (adquirida ou congênita)	99	4,1
Transplantes	117	4,9
Diabetes	8	0,3
Anemia	60	2,5
Leucemia	13	0,5
Hemofilia	8	0,3
Hipertensão Arterial	23	1
Hepatite	20	0,8
Hepatopatia	19	0,8
Asma	38	1,6
Bronquite / Pneumonia	22	0,9
Rinite	24	1
Insuficiência renal	10	0,4
Síndrome nefrótica	9	0,4
Infecção urinária	31	1,3
Artrite/ Artralgia/ reumatismo	18	0,7
Mialgia/ Fibromialgia/ Distrofia muscular	11	0,5
Dores generalizadas	13	0,5
Eosinofilia	25	1
Alteração do hábito intestinal	7	0,3
Diarréia	838	34,8
Dor abdominal	31	1,3
Dispepsia/ epigastria	7	0,3
Vômito	10	0,4
Febre	11	0,5
Cefaléia	2	0,1
Desnutrição	16	0,7
Obesidade	10	0,4
Total	1.721	71,4
Não Informado	689	28,6
Total	2410	100

Dados sobre a idade foram recuperados em 2.385 (99%) dos registros e variou de um mês a 93 anos de idade, apresentando idade média de 33 anos e cinco meses. A tabela 5 mostra a distribuição destas idades em faixas etárias, assim como a quantidade de amostras selecionadas em cada uma.

Tabela 5: Distribuição de amostras fecais selecionadas de acordo com diferentes faixas etárias. Pesquisa, 2007.

Faixa etária	Número de amostras (N)	Porcentagem (%)
≤ 2 anos	390	16,3
3 - 5 anos	288	12,1
6 - 10 anos	271	11,4
11 - 15 anos	33	1,4
16 - 20 anos	34	1,4
21 - 40 anos	411	17,2
41 - 60 anos	414	17,4
≥ 61 anos	544	22,8
Total	2385	100

Em relação ao estado civil a amostragem foi composta por 47,04% (852/1.811) de solteiros, 33,68% (610/1.811) de casados, 11,15% (202/1.811) de viúvos, 2,60% (47/1.811) de amasiados e 5,52% (100/1.811) de desquitados, em 1.811 registros recuperados.

O item ocupações foi recuperado em 1.182 (49%) dos registros. Pela diversidade apresentada o dividimos por atividades setoriais. As proporções incluídas nestas atividades são mostradas na tabela 6.

Para raça encontramos uma relação de 1.801 (74,7%) registros, composta de 85,5% (1.539/1.801) de branca; 2,0% (36/1.801) de negra; 0,4% (7/1.801) de amarela; e 12,2% (219/1.801) de mulatos.

Tabela 6: Distribuição de amostras fecais selecionadas em diversas atividades setoriais. Pesquisa, 2007.

Atividade	Número de amostras (N)	Porcentagem (%)
Estudante	150	6,2
Administrativo	54	2,2
Doméstica	310	12,9
Saúde	91	3,8
Agrícola	10	0,4
Comércio	83	3,4
Artes	10	0,4
Indústria	31	1,3
Gerais	97	4
Desempregado	34	1,4
Aposentado	312	12,9
Total	1.182	49
Não informada	1.228	51
Total	2.410	100

Com a recuperação de 2.042 (84,73%) endereços registrados distribuímos as amostras fecais, por Regiões de Saúde estabelecidas pelo Ministério da Saúde, nos Estados da Federação (Tabela 7). Para o Estado de São Paulo esta distribuição obedeceu a divisão das Diretorias Regionais de Saúde (DIRs) (Tabela 8). Foi verificado que deste total, 96,82% das amostras fecais advinham do Estado de São Paulo e 3,18% do restante do Brasil, exceção feita aos Estados de Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Roraima. O Município de São Paulo contribuiu com 56,18% deste total, e quando acrescido dos municípios da Grande São Paulo esta taxa foi de 79,54%.

Tabela 7: Distribuição de amostras fecais de acordo com as Regiões de Saúde estabelecidas pelo Ministério da Saúde, nos estados do Brasil. Pesquisa, 2007.

Estado da Federação	Número de amostras	
	(N)	(%)
São Paulo	1.977	82,03
Rio de Janeiro	3	0,12
Espírito Santo	2	0,08
Minas Gerais	6	0,25
Pará	3	0,12
Rondônia	3	0,12
Acre	1	0,04
Amazonas	2	0,08
Piauí	1	0,04
Bahia	9	0,37
Pernambuco	7	0,29
Maranhão	5	0,21
Ceará	1	0,04
Paraíba	4	0,17
Alagoas	1	0,04
Goiás	3	0,12
Mato Grosso do Sul	5	0,21
Tocantins	1	0,04
Distrito Federal	7	0,29
Paraná	1	0,04
Total do Brasil	2.042	84,73
Não informado	368	15,27
Total	2.410	100,00

Tabela 8: Distribuição de amostras fecais de acordo com as Diretorias Regionais de Saúde (DIRs), no Estado de São Paulo. Pesquisa, 2007.

Estado da Federação	Diretoria Regional de Saúde DIR	Núcleo	Número de amostras	
			(N)	(%)
São Paulo	1 – Capital São Paulo	I	410	17,01
		II	222	9,21
		III	183	7,59
		IV	327	13,57
		V	212	8,80
	2 – Santo André		80	3,32
	3 – Mogi das Cruzes		106	4,40
	4 – Franco da Rocha		34	1,41
	5 - Osasco		343	14,23
	6 – Araçatuba		1	0,04
	7 – Araraquara		2	0,08
	8 - Assis		1	0,04
	10 - Bauru		2	0,08
	12 - Campinas		10	0,41
	15 – Piracicaba		1	0,04
	16 – Presidente Prudente		2	0,08
	17 – Registro		1	0,04
	18 – Ribeirão Preto		2	0,08
	19 - Santos		12	0,50
	20 – São João da Boa Vista		1	0,04
	21 – São José dos Campos		1	0,04
	22 – São José do Rio Preto		2	0,08
	23 – Sorocaba		9	0,37
	24 – Taubaté		13	0,54
	Total do Estado de São Paulo		1.977	82,03

Quanto à consistência das fezes, verificada durante os ensaios laboratoriais, estas foram classificadas em: líquidas (30,7%), pastosas (67,1%) e formadas (2,2%).

4.4 Análise microscópica

4.4.1 Detecção de enteroparasitos

A detecção morfológica, de ovos e larvas de helmintos assim como de cistos, oocistos e trofozoitos de protozoários, realizada através da interação de métodos de concentração e de colorações específicas para protozoários emergentes, revelou positividade de 4,6% (111/2.410) para helmintos e de 27,8% (671/2.410) para protozoários.

Em amostras fecais positivas para helmintos foi observado que 3,8% (92) apresentavam apenas um; 0,7% (18) apresentavam dois associados; e 0,1% (1) apresentavam três associações.

Os helmintos encontrados foram: *Ascaris lumbricoides* (1,45%), *Strongyloides stercoralis* (1,74%), *Ancilostomideo* (0,33%), *Trichuris trichiura* (1,08%), *Hymenolepis nana* (0,16%), *Enterobius vermicularis* (0,16%) e *Schistosoma mansoni* (0,50%), como observado na figura 8.

A Figura 9 mostra que a maioria (21,2% = 511) das amostras fecais examinadas apresentava apenas um tipo de protozoário, embora fossem observadas associações de dois protozoários para 5,1% (122), de três para 1,2% (28) e de quatro para 0,4% (10) do total de amostras fecais positivas (27,8%) para estes parasitos.

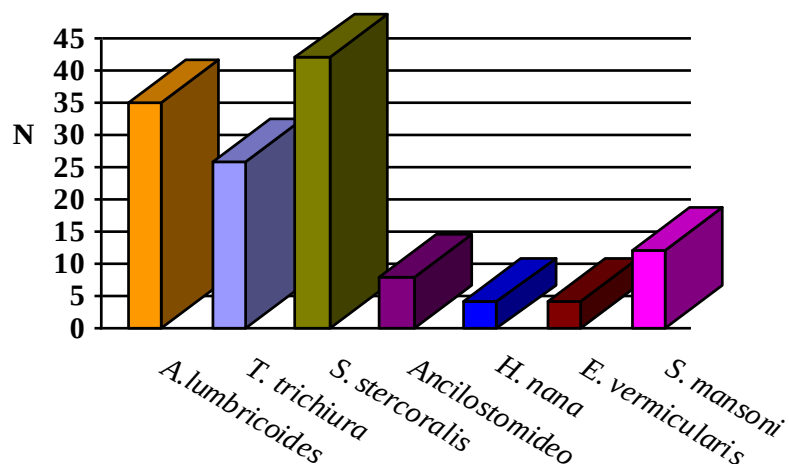


Figura 8: Frequência de helmintos detectados em 2.410 amostras fecais submetidas a diferentes métodos de concentração. Pesquisa, 2007.

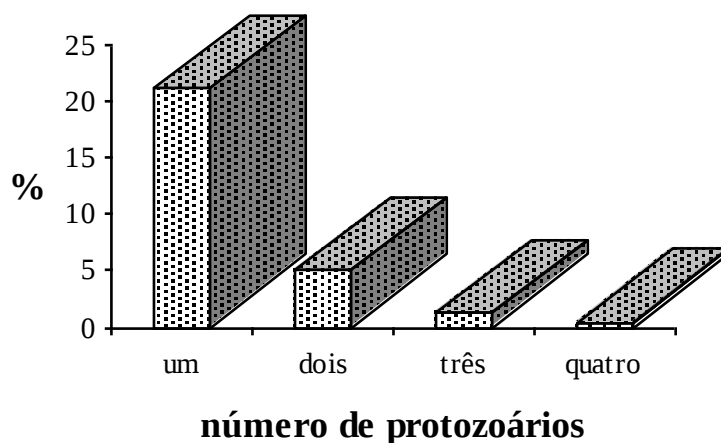


Figura 9: Frequência de número de protozoários associados em 671 amostras fecais com positividade para estes parasitos. Pesquisa, 2007.

Os protozoários detectados foram: *Endolimax nana* (7,47%), *Entamoeba coli* (5,77%), *Entamoeba hartmanni* (0,25%), *Iodamoeba butschlii* (0,29%), *Dientamoeba fragilis* (0,08%), *Entamoeba histolytica / dispar* (1,20%), *Giardia lamblia* (3,90%), *Blastocystis hominis* (2,95%), Microsporidio (2,41%),

Sarcocystis hominis (0,04%), *Cyclospora cayetanensis* (0,08%), *Isospora belli* (2,37%) e *Cryptosporidium* spp. (9,67%), como apresentados na figura 10.

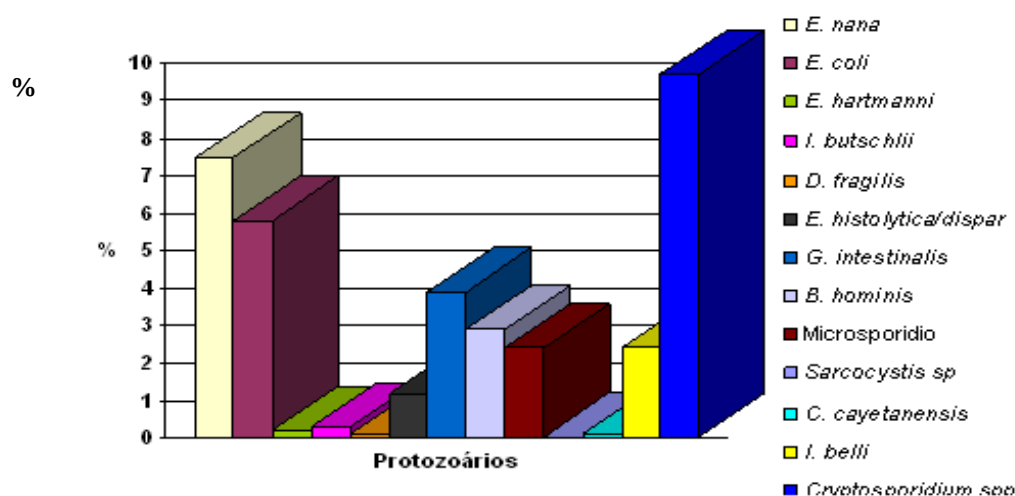


Figura 10: Frequência de protozoários detectados em 2.410 amostras fecais submetidas a diferentes métodos de concentração e de colorações. Pesquisa, 2007.

4.4.2 Detecção, quantificação e mensuração morfológica de *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. foi positivo em 9,7% (233/2410) das amostras fecais analisadas pela microscopia, após coloração pelo método de Kinyoun modificado.

Em relação à quantidade estimada de oocistos de *Cryptosporidium* spp., do total de lâminas examinadas, foi observada que 58,4% (136/233) apresentavam máximo de 10 oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 10 µl de amostra fecal por lâmina ($\cong$ 200 campos); 21,0% (49/233) e 20,6% (48/233)

apresentavam até 50, e acima de 50 oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 100 campos observados, respectivamente.

A mensuração dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. mostrou tamanhos que variavam de 3,9 µm a 7,9 µm. Devido a esta variabilidade, os tamanhos foram categorizados em: menor que 4,5 µm, entre 4,5 µm e 6,0 µm, e acima de 6,0 µm, distribuídos em 20, 212 e 13 do total de lâminas examinadas. Em 12 lâminas examinadas encontramos associações de tamanhos diferentes.

4.5 Análise molecular

4.5.1 Detecção molecular de *Cryptosporidium* spp. através da PCR – Dupla

Das 233 amostras fecais com oocistos de *Cryptosporidium* spp. detectados pela microscopia, preservadas a 20°C negativos, e respeitando o critério de exclusão, 223 foram utilizadas para PCR – Dupla, com amplificação de fragmentos de 214 pb em 37,2% (83/223). A figura 11 apresenta a amplificação do fragmento de 214pb para diferentes amostras testadas.

4.5.2 Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. através da RFLP

A restrição dos fragmentos de 214pb obtidos pela PCR – Dupla foram digeridos pela enzima de restrição *TaqI* que fornece duas bandas: de 76pb e 138pb, características em se tratando de *C. hominis* ou *C. parvum*. Os

fragmentos não digeridos foram considerados *Cryptosporidium* spp. (PCR positiva). A figura 12 apresenta a digestão do fragmento de 214pb pela enzima de restrição *TaqI* para diferentes amostras testadas.

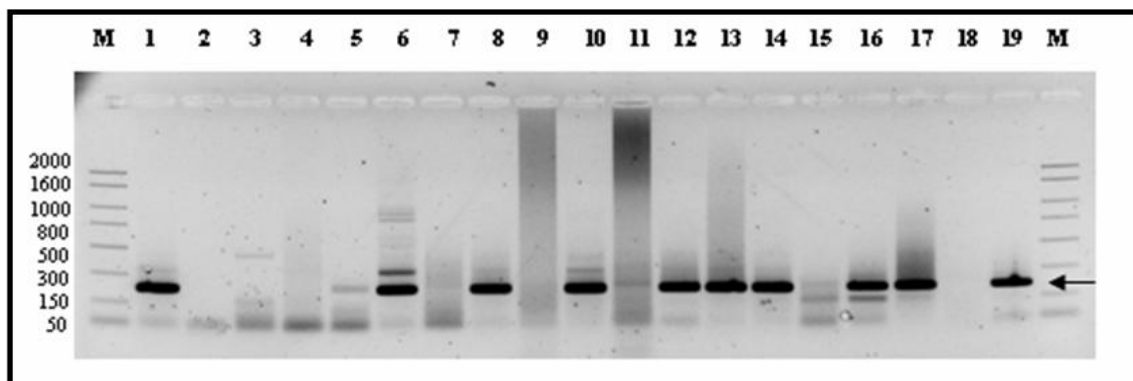


Figura 11: Imagem do gel de agarose apresentando os fragmentos amplificados de 214 pb de diferentes amostras fecais submetidas à PCR - Dupla. M - marcador de peso molecular 50pb; linhas 1, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 19 - amostras positivas; linhas 2, 3, 4, 7, 9 e 18 – amostras negativas. Pesquisa, 2007.

A digestão com a enzima *AseI* diferenciou *C. hominis* de *C. parvum*. Para *C. hominis* foram obtidas duas bandas: de 58 e 156 pb, enquanto que para *C. parvum*, foi verificado uma única banda de 214pb do fragmento não digerido. Estes padrões são característicos de digestão pelas enzimas utilizadas. Os negativos foram denominados *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis*. A Figura 13 apresenta digestão do fragmento de 214pb para diferentes amostras testadas e preliminarmente digeridas pela *TaqI*.

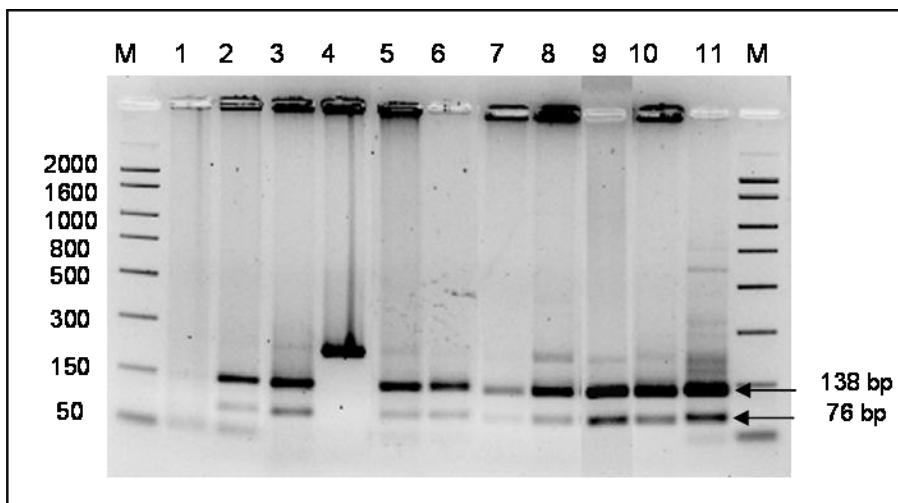


Figura 12: Resultado da digestão do fragmento de 214 pb com a enzima de restrição *TaqI* de diferentes amostras clínicas. Linhas M – marcador de peso molecular 50 bp; linhas 1-3, 5-11 – fragmento digerido com bandas características de *C. hominis* / *C. parvum*; linha 4 - fragmento não digerido pela enzima (*C. não parvum não hominis*). Pesquisa, 2007.

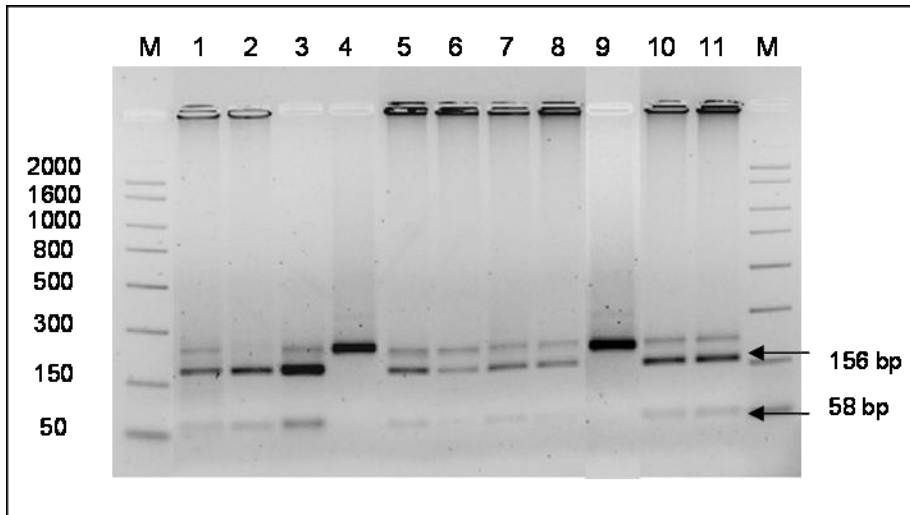


Figura 13: Resultado da digestão do fragmento de 214 pb com a enzima de restrição *AseI* de diferentes amostras clínicas. Linhas M – marcador de peso molecular 50 bp; linhas 1-3, 5-8 e 10-11 – fragmento digerido com bandas características de *C. hominis*; linha 4 - fragmento não digerido pela enzima (*C. não parvum não hominis*); linha 9 – fragmento não digerido pela enzima (*C. parvum*). Pesquisa, 2007.

A digestão do produto amplificado (214pb) pela PCR em 83 amostras fecais (PCR positivas) com as enzimas de restrição citadas (*TaqI* e *AseI*), forneceu caracterização de *C. hominis*, *C. parvum* e de *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis* em 62,7 % (52/83). Deste total, obtivemos perfis característicos com genótipos de *C. hominis* em 88,5% (46), de *C. parvum* em 3,8% (2), de *Cryptosporidium* não *hominis* não *parvum* em 34,9% (18) e de padrão misto em 27,2% (14) com *C. hominis*. Os não caracterizados foram considerados *Cryptosporidium* spp.

4.7 Análise epidemiológica

Cryptosporidium spp. foi detectado em 9,7% (233 / 2.410) das amostras fecais analisadas por microscopia e esteve associado com presença de: *Ascaris lumbricoides* (0,25%), *Strongyloides stercoralis* (0,21%), *Ancilostomideo* (0,08%), *Trichuris trichiura* (0,12%), *Enterobius vermicularis* (0,08%), *Endolimax nana* (0,54%), *Entamoeba coli* (0,33%), *Entamoeba hartmanni* (0,08%), *Iodamoeba butschlii* (0,40%), *Giardia lamblia* (0,78%), *Blastocystis hominis* (0,37%), *Microsporidia* (0,08%) e *Isospora belli* (0,37%). Foram observadas associações estatisticamente significativas com *Enterobius vermicularis* e *Endolimax nana*.

A associação entre *Cryptosporidium* spp. e *Enterobius vermicularis*, estatisticamente significativa ($p = 0,006$), envolveu duas crianças do sexo

feminino, de dois e sete anos de idade, uma da Creche HCFMUSP apresentando diarreia, e outra do ICR _ HCFMUSP com infecção urinária e bronquite.

A associação entre *Cryptosporidium* spp. e *Endolimax nana* ($p = 0,018$), foi percebida em 13 casos, quatro imunossuprimidos e oito com diarreia. A idade média foi de 22,8 anos de idade, e nove apresentaram co-infecção com outros protozoários e ou helmintos.

Em relação aos dados clínicos, as associações com *Cryptosporidium* spp. foram significativas para: controle de saúde ($p < 0,001$), HIV/AIDS ($p < 0,001$), imunodeficiência congênita ou adquirida ($p = 0,005$), leucemia ($p = 0,002$), transplante ($p = 0,006$) e diarreia ($p < 0,001$).

As 2,87% (7/237) do grupo de controle de saúde, composto por funcionários saudáveis do Complexo HCFMUSP (Divisão de Nutrição e Dietética) submetidos a monitoramento periódico, que apresentaram *Cryptosporidium* spp. ($p < 0,001$), tinham idade média de 38 anos e fezes pastosas.

O grupo HIV/AIDS que apresentou associação significativa com *Cryptosporidium* spp. ($p < 0,001$), era composto de 40 amostras e apresentou quatorze co-infecções: *Isospora belli* (3); *Giardia lamblia* (4), *Iodamoeba butschlii* e *Giardia lamblia* (1); *Entamoeba coli* (1); *Endolimax nana* (1); *Ascaris lumbricoides* e *Entamoeba coli* (1); *Strongyloides stercoralis* (1); *Isospora belli*,

Strongyloides stercoralis e *Trichuris trichiura* (1); e *Ascaris lumbricoides*, *Ancilostomideo*, *Endolimax nana* e *Entamoeba coli* (1).

Em 20 associações entre *Cryptosporidium* spp. e o grupo de imunodeficiências congênitas ou adquiridas, estatisticamente significativa ($p = 0,005$), dezenove eram crianças, doze apresentavam diarreia e as seguintes co-infecções: *Giardia lamblia* (1); *Endolimax nana* e *Giardia lamblia* (1); e *Isospora belli*, *Entamoeba coli* e *Blastocystis hominis* (1).

A associação de *Cryptosporidium* spp. com leucemia ($p = 0,002$) foi acusada em seis crianças, onde cinco apresentavam diarreia, três tinham deficiências de imunoglobulinas e uma apresentava co-infecção com *Blastocystis hominis*.

Para o grupo de transplantes ($p = 0,006$), *Cryptosporidium* spp. foi detectado em cinco casos, três adultos e duas crianças, dois (40%) apresentavam diarreia e uma co-infecção com *Endolimax nana*.

Dados de diarreia foram recuperados em 48,7% (838/1721) do total de registros e mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,001$). *Cryptosporidium* spp. foi detectado em 5,7% (50/883) dos casos sem e em 17,2% (144/838) dos casos com diarreia. Nos casos com diarreia foi observada maior concentração em crianças de até cinco anos de idade (3,45 %) e em imunossuprimidos (3,29%). As co-infecções apresentadas foram: *Ascaris lumbricoides* e *Entamoeba coli* (1); *Enterobius vermicularis* (1); *Strongyloides stercoralis* (1); *Strongyloides stercoralis*, *Trichuris trichiura* e *Isospora belli* (1); *Ascaris*

lumbricoides, *Ancilostomideo*, *Endolimax nana* e *Entamoeba coli* (1); *Endolimax nana*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba hartmanni* (1); *Endolimax nana* e *Giardia lamblia* (2); *Endolimax nana* (3); *Giardia lamblia* e *Iodamoeba butschlii* (1); *Giardia lamblia* e *Isospora belli* (1); *Giardia lamblia* (9); *Isospora belli* (3); *Blastocystis hominis* (5); *Blastocystis hominis* e *Microsporidio* (1); e *Microsporidio* (1).

Cryptosporidium spp., *C. hominis*, *C. parvum* e *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis* não apresentaram associações significativas com outros dados clínicos relacionados.

Em relação a variável quantitativa CD4, quando aplicado o teste ANOVA, não foi observado correlação estatisticamente significativa com os genótipos caracterizados de *Cryptosporidium* (Tabela 9).

Tabela 9: Correlação de amostras fecais com perfis característicos dos genótipos de *C. hominis*, de *C. parvum* e de *Cryptosporidium* não *hominis* não *parvum*, caracterizados pela análise molecular, com marcador imunológico – CD4. Pesquisa, 2007.

	CD4	N	Média (cél/μl)	Desvio padrão	Valor de p (ANOVA)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Negativo	11	215,91	393,72	0,315
	Positivo	7	29,43	11,31	
<i>C. hominis</i>	Negativo	13	185,62	435,05	0,586
	Positivo	5	33,6	37,09	
<i>C. parvum</i>	Negativo	17	146,59	383,82	0,886
	Positivo	1	89	0	
<i>C. não parvum não hominis</i>	Negativo	18	143,39	372,6	Não possível
	Positivo	0			

A distribuição de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp., quando analisadas por microscopia, por sexo e faixa etária é mostrada na Tabela 10. Estas associações se mostraram estatisticamente significativas ($p < 0,001$) quando aplicado o teste do Qui-quadrado.

Tabela 10: Distribuição de amostras fecais microscopicamente positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. de acordo com sexo e idade na população estudada. Pesquisa, 2007.

		<i>Cryptosporidium</i> spp.					
		Positivo		Negativo		Total	
		N	%	N	%	N	%
Sexo	Feminino	99	4,11	1203	49,92	1302	54,02
	masculino	134	5,56	974	40,41	1108	45,98
Total		233	9,67	2177	90,33	2410	100,00
Faixa etária (anos)	≤ 5	96	4,02	582	24,40	678	28,42
	6 - 10	32	1,34	239	10,02	271	11,36
	11 – 15	2	0,08	31	1,30	33	1,38
	16 – 20	1	0,04	33	1,38	34	1,42
	21 – 40	52	2,18	359	15,05	411	17,23
	41 – 60	44	1,84	370	15,52	414	17,36
	> 60	4	0,17	540	22,64	544	22,81
Total		231	9,69	2154	90,31	2385	100,00

Não foram observadas correlações estatisticamente significativas de *Cryptosporidium* spp., *C. hominis*, *C. parvum* e *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis* com estado civil, raça e tempo de preservação da amostra fecal.

Foi observada correlação estatisticamente significativa entre *C. parvum* ($p < 0,001$) e *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis* ($p = 0,017$) com atividades setoriais.

Cryptosporidium spp. foi estatisticamente significativo para fezes líquidas e pastosas ($p < 0,001$), além de *C. hominis* que também o foi para fezes formadas ($p = 0,035$), quando aplicado o teste de Qui-quadrado.

Quando correlacionamos os tamanhos diferenciados de oocistos observados durante a microscopia, obtivemos correlações estatisticamente significativas entre *C. hominis* com oocistos de até 6 µm de diâmetro ($p=0,003$) e entre *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis* com os que apresentam diâmetro maior que 6 µm ($p<0,001$). Estas correlações estatisticamente significativas não foram observadas para *C. parvum* e *Cryptosporidium* spp.

Foi observada correlação estatisticamente significativa entre *C. hominis* ($p = 0,025$) e quantidade de oocistos detectados e estimados durante a microscopia. Não foram observadas para *C. parvum* ($p = 0,526$), *C. hominis* não *parvum* não *hominis* ($p = 0,297$) e *Cryptosporidium* spp. ($p = 0,133$).

Do total de 9,7% (233 / 2.410) amostras fecais analisadas por microscopia, 91,6% pertenciam ao estado de São Paulo; 1,2% a outros estados da Federação, e 7,2% não tiveram informação resgatada, conforme mostrado na Figura 14. No Estado de São Paulo, a grande maioria se concentrou na capital (56,18%) e região da Grande São Paulo (23,36%), embora não tenha tido associação estatisticamente significativa ($p = 0,711$).

Do total de amostras fecais, com positividade microscópica para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e endereços recuperados através de registros, caracterizados pela análise molecular, a distribuição final dos perfis característicos de *C. hominis* (95,7% = 44/46), de *C. parvum* (100,0% = 2/2) e de *Cryptosporidium* não *hominis* não *parvum* (88,8% = 16/18) obtidos se

concentraram no Estado de São Paulo, uma vez que não foi possível sua caracterização em outras regiões do Brasil, como mostra a Tabela 11.

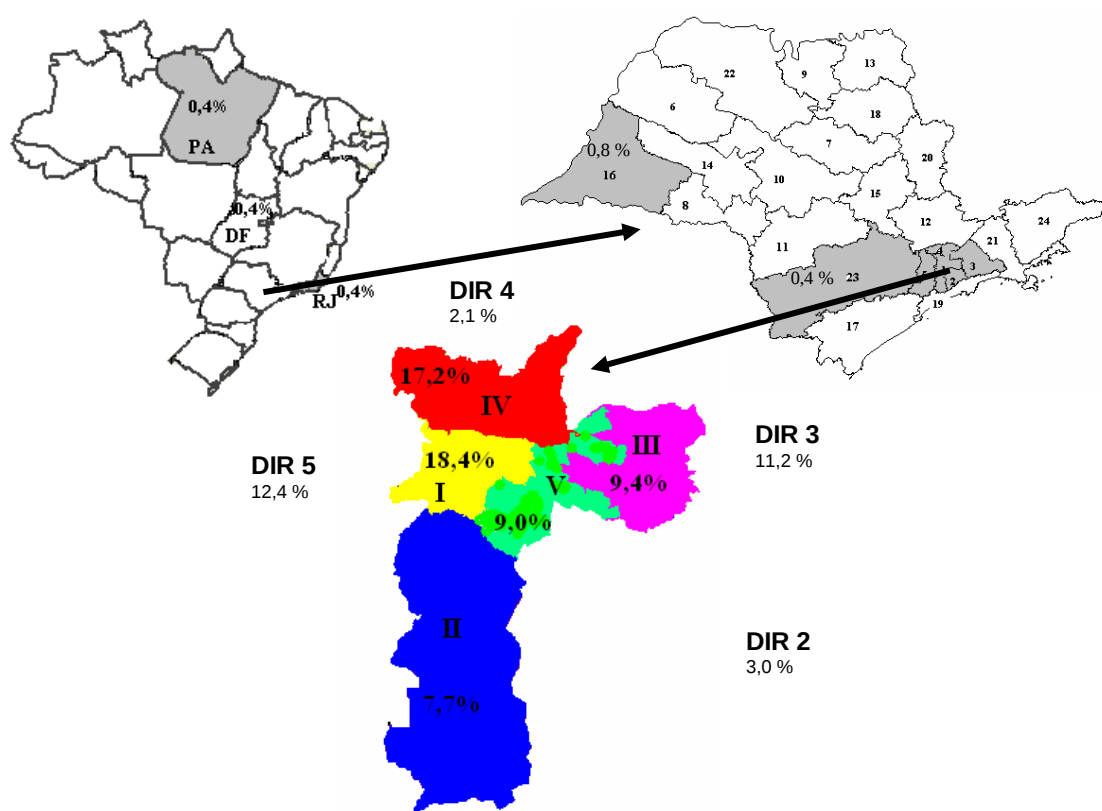


Figura 14: Distribuição de amostras fecais com positividade microscópica para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em diferentes regiões do Brasil. Pesquisa, 2007.

Tabela 11: Distribuição de amostras fecais com perfis característicos dos genótipos de *C. hominis*, de *C. parvum* e de *Cryptosporidium* não *hominis* não *parvum*, caracterizados pela análise molecular, de acordo com as Diretorias Regionais de Saúde (DIRs), no estado de São Paulo, Brasil. Pesquisa, 2007.

Estado da Federação	Diretoria Regional de Saúde DIR	Núcleo	<i>C. hominis</i>		<i>C. parvum</i>		<i>Cryptosporidium</i> não <i>hominis</i> não <i>parvum</i>	
			N	%	N	%	N	%
SP	1 – Capital São Paulo		12	26,1	0	0	7	38,9
		I						
		II	4	8,7	0	0	1	5,5
		III	3	6,5	0	0	1	5,5
		IV	9	19,6	0	0	3	16,7
		V	6	13,0	0	0	1	5,5
	2 – Santo André		1	2,2	0	0	0	0
	3 – Mogi das Cruzes		5	10,9	1	50,0	2	11,2
	4 – Franco da Rocha		1	2,2	0	0	0	0
	5 - Osasco		3	6,5	1	50,0	1	5,5
	16 – Presidente Prudente		0	0	0	0	0	0
	23 - Sorocaba		0	0	0	0	0	0
Total			44	95,7	2	100	16	88,8
Não informada			2	4,3	0	0	2	11,2
Total			46	100	2	100	18	100

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido com o intuito de detectar e caracterizar *Cryptosporidium* spp. em um hospital universitário, avaliando sua relação com outros enteroparasitos, com dados clínicos e localização geográfica. Ele é continuidade de outro estudo, neste mesmo hospital, onde foi verificada a presença de surto diarréico com detecção e caracterização de *Cryptosporidium hominis*.

A escolha do HCFMUSP se justifica por ser um hospital universitário, que atende pacientes provenientes de todas as regiões do país. Também, porque o Serviço de Parasitologia da DLC-HCFMUSP utiliza vários métodos de concentração e coloração para detecção de parasitos, inclusive de protozoários emergentes; e conta com equipe altamente capacitada para diagnóstico parasitológico.

A maioria (96,82%) das amostras analisadas pertencia ao Estado de São Paulo (DIR 1 a DIR 24), sendo que 56,18% se localizavam no Município de São Paulo (DIR 1), maior cidade do Brasil com saneamento básico e nível sócio econômico cultural diferenciados. Após reformulação no atendimento ambulatorial do HCFMUSP em 2004, a região metropolitana de São Paulo tem atendimento prioritário (São Paulo - Município, 2004; Fundação Faculdade de Medicina, 2004).

Em relação aos enteroparasitos detectados a positividade observada foi de 4,6% e 27,8% para helmintos e protozoários, respectivamente. Estes dados mostram padrão compatível com áreas com adequado saneamento básico, o que explica a semelhança, também, com os dados encontrados nos Estados Unidos da América (Ribes, 2004), na República da Coréia (Guk et al, 2005), na Colômbia (Botero et al, 2003), na Venezuela (Devera et al, 2003), e na Nigéria (Ikeh et al, 2006).

Quanto à frequência encontrada para cada parasito detectado, esta é menor do que as relatadas por inúmeros trabalhos realizados durante as duas últimas décadas no Brasil (Anexo A), que apresentam taxas de positividade variando de 7,8% (Wainstein e Petrillo, 1987) a 93% (Ferreira MR et al, 1998). Estes valores, entretanto, mostram a diversidade na seleção da amostragem das populações estudadas, da falta de padronização dos métodos de coleta, da conservação e da análise das amostras fecais. Independentemente da heterogeneidade apresentada, que dificulta a comparação destes estudos, é notório que a prevalência é diretamente proporcional às condições sociais, econômicas e culturais da população.

Assim sendo, entre os helmintos detectados destacamos o declínio dos geohelmintos: *Ascaris lumbricoides*, *Ancilostomideos* e *Trichuris trichiura*, provavelmente, decorrente da melhoria das condições sociais, econômicas e sanitárias, justificando a mudança na tendência histórica relatada por outros pesquisadores (Waldman et al, 1999; Ludwig et al, 1999; Ferreira MU et al,

2000). A taxa maior de *Strongyloides stercoralis* (1,74%) é semelhante a outros estudos realizados com populações de risco (Silva CV et al, 2005; Botero et al, 2003; Cimerman et al, 2002; 1999a; 1999b; Moura et al, 1989) mostrando a importância de seu diagnóstico. O encontro de ovos de *Enterobius vermicularis* (0,16%) foi ocasional, uma vez que para sua detecção é necessário o emprego de técnica específica (Carvalho et al, 2006). A sua associação com *Cryptosporidium* spp., estatisticamente significativa, pode ser devida à sua maior detecção em crianças, grupo que apresentaria maior suscetibilidade (Carvalho et al, 2006).

Em relação aos protozoários, a presença da *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba bustchlii*, indica a exposição do hospedeiro a fontes de infecção (Melo et al, 2004; Graczyk et al, 2005).

A detecção de *Cryptosporidium* spp. em 9,7% (233/2410) das amostras submetidas à coloração de Kinyoun modificado, observadas em microscopia de luz, era esperada, já que este estudo selecionou pacientes considerados grupos de risco para protozoários emergentes (Curry e Smith, 1988; Botero et al, 2003; Ferreira e Borges, 2002; Wilson, 2005; Guk et al, 2005).

Durante o período de junho de 1996 a dezembro de 2001, um levantamento retrospectivo de 7.050 exames com solicitação de pesquisa de *Cryptosporidium* spp. teve positividade de 4,6% (325/7050) distribuída em 36% para pacientes HIV positivos; 16,3% para crianças menores de dois anos e 48,2% em adultos (Oliveira, 2002). Durante o período de fevereiro de 2000 a

maio de 2001, 429 amostras fecais foram submetidas à coloração de esfregaço pelo método de Kinyoun e avaliadas por microscopia óptica comum. Como resultado, 15,6% (67/429) foram positivas para *Cryptosporidium* sp, com significativa predominância em fezes líquidas e pastosas ($p < 0,0001$), além de que sorologia positiva para HIV foi considerada um fator de risco ($p < 0,0001$; OR: 9,0; IC95% 3,9 – 20,8) (dados não publicados).

A observação de associações estatisticamente significativas de *Cryptosporidium* spp. com grupos: HIV/AIDS ($p < 0,001$), leucemia ($p = 0,002$), transplantes ($p = 0,006$), e de imunodeficiências congênitas ou adquiridas ($p = 0,005$), confirmam a suscetibilidade de pacientes imunocomprometidos à criptosporidiose, já relatada na literatura (Hunter e Nichols, 2002; Leav et al, 2003; Guk et al, 2005; Cimerman et al, 1999a).

As correlações de amostras fecais com perfis característicos dos genótipos de *C. hominis*, de *C. parvum* e de *Cryptosporidium* não *hominis* não *parvum*, caracterizados pela análise molecular, com contagem sangüínea de linfócitos T-CD4 não foram estatisticamente significantes, contrariando a literatura (Casemore, 1990; Current e Garcia, 1991; Hunter e Nichols, 2002), provavelmente pelo baixo número de registros recuperados (7,7%).

Dentre os sintomas correlacionados, a correlação estatisticamente significativa com diarreia foi concordante com a literatura, uma vez que faz parte da patogenia desta infecção (Agnew et al, 1998; Dillingham, 2002; Leav et al, 2003; Ramirez et al, 2004; Chalmers et al, 2005; Sunnotel et al, 2006b).

As co-associações de outros protozoários como: *Entamoeba coli*; *Endolimax nana*; *Entamoeba hartmanni*; *Giardia lamblia*; *Iodamoeba butschlii*; *Isospora belli*; *Blastocystis hominis* e Microsporidio indicam a importância da rota fecal – oral na transmissão desta infecção, assim como a exposição do hospedeiro a freqüentes fontes de infecção. (Chalmers et al, 2005; Casemore, 1990). Fato enfatizado pela correlação estatisticamente significativa entre *Cryptosporidium* spp. e *Endolimax nana*.

A correlação significativa de *Cryptosporidium* spp. com sexo ($p < 0,001$) e faixa etária ($p < 0,001$) teve taxas maiores para o sexo masculino e para crianças menores de cinco anos, dados semelhantes aos obtidos por Agnew et al (1998), seguida da faixa de 21 a 40 anos. Considerando que a detecção destes oocistos foi observada em todas as faixas etárias, tanto do sexo masculino como feminino, o que mostra condições semelhantes de exposição à infecção, parece que esta concentração se deva, principalmente à atividades diárias desenvolvidas pelos diferentes segmentos analisados (Devera et al, 2003; Leav et al, 2003; Ikeh et al, 2006). Importante ressaltar que neste estudo foi observada correlação significativa entre atividades setoriais desenvolvidas pelos hospedeiros com *C. parvum* e *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis*.

Embora amostras fecais líquidas ($p < 0,001$) e pastosas ($p < 0,001$) foram estatisticamente significativas à presença de *Cryptosporidium* spp., este foi detectado também em fezes formadas, denotando a importância destes hospedeiros no ciclo de transmissão dos oocistos e ainda, potenciais fontes de

contaminações ambientais (Chalmers et al, 2005; Ramirez et al, 2004; Gracenea et al, 2002; Casemore, 1990), assim como a detecção, estatisticamente significativa ($p < 0,001$), de oocistos em funcionários saudáveis submetidos a controle periódico.

A detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em portadores sãos é muito mais comum do que já relatado, haja vista estudos realizados em populações hígdas, tais como o de 298 crianças do município de Itanhomi, Minas Gerais, que revelaram positividade de 5,8% para *Cryptosporidium* spp. (Gonçalves et al, 2003); o de 344 amostras fecais advindas de amostragem da população geral de Serra dos Aimorés, Minas Gerais, em 2002, com 3,5% (Gonçalves et al, 2005b); ou o de 195 crianças e adolescentes quilombolas do Vale do Ribeira, São Paulo, em 2003, com positividade de 3,6% (dados não publicados).

A prevalência deste parasito em populações aparentemente saudáveis confirma o grau de morbidade e mortalidade associado àqueles em que o sistema imune está comprometido, além de sua contaminação ambiental (Leoni et al, 2006; Savioli et al, 2006; Chalmers et al, 2005; Thompson e Chalmers, 2002). Neste estudo, *Cryptosporidium hominis* foi o único que apresentou associação significativa ($p = 0,035$) com fezes formadas, mostrando a importância da investigação também neste segmento.

Embora o método de coloração seja considerado padrão ouro para o diagnóstico, este só pode ser realizado por microscopista treinado, e não

permite diferenciação de espécies ou genótipos, assim como os métodos imunológicos (Morgan et al, 1996; Singh, 1997; Sturbaum, 2001, Gonçalves, 2002; Sulaiman et al, 2005; Feltus et al, 2006; Savioli et al, 2006). Assim sendo, os métodos moleculares, como PCR, são necessários para detecção de pequeno número de oocistos (Johnson et al, 1995, Morgan et al, 1998a; Zhu et al, 1998; da Silva et al, 1999; Xiao et al, 2006), fornecendo informações adicionais à microscopia e auxiliando os epidemiologistas na vigilância de agentes infecciosos e determinação de fontes de infecção (Morgan et al, 2000; Chalmers et al, 2005; Sunnotel et al, 2006b).

Considerando-se que, no Brasil, muitos laboratórios ainda não detectam oocistos de *Cryptosporidium* spp. como rotina (Castilho, 2002; Sodré e Franco, 2001), há falta de informações sobre espécies e genótipos circulantes em nosso país. O número de amostras positivas detectadas em nossos estudos nos leva a propor padronização de técnicas moleculares nos laboratórios brasileiros, visando à caracterização genotípica do *Cryptosporidium* spp., em amostras isoladas de material fecal. Estes resultados poderão ser úteis para determinar as fontes de infecção durante surtos e estudar a dinâmica de transmissão nos focos endêmicos, sem depender de centros de referências externos como tem ocorrido (Gonçalves, 2002; Gomes, 2003; Brantley et al, 2003; Gatei et al, 2003; Araújo, 2004; Bushen et al, 2007).

De acordo com a literatura, a conservação de amostras fecais para análise molecular pode ser feita em dicromato de potássio 2,5 % a 4°C (Jonhson et al,

1995; Morgan e Thompson, 1998b; da Silva et al, 1999; Gatei et al, 2003; Gonçalves et al, 2006a; Zhou et al, 2006), em etanol absoluto na temperatura ambiente (Jongwutiwes et al, 2002; Tiangtip e Jongwutiwes, 2002; Nsubuga et al, 2004), em formalina a 10% (Jonhson et al, 1995; Zhu et al, 1998), sob refrigeração a 4°C (McLauchlin et al, 2000; Pedraza-Dias et al, 2001; Leoni et al, 2006; Morse et al, 2007), a 20°C negativos (Xiao et al, 2001; Nsubuga et al, 2004) ou a 80°C negativos (Pieniazek et al, 1999), ou ainda, após processo de dissecação com sílica (Nsubuga et al, 2004).

Jonhson et al (1995), Pieniazek et al (1999) e Jongwutiwes et al (2002) relatam efeito inibidor do dicromato de potássio e da formalina na PCR. O uso de formalina resulta em reações negativas. Amostras em dicromato de potássio podem ser utilizadas por até um ano sem comprometer a sensibilidade, necessitando que seja removido por lavagem da amostra antes do processo de lise. Zhu et al (1998) contestam o efeito inibitório da formalina, e afirmam que a inibição é causada pela extração inadequada do DNA.

Higgins et al (2001) utilizaram amostras conservadas, pelo tempo máximo de três meses, em formalina e em dicromato de potássio, após extração de DNA com Mo Bio UltraClean™ Soil DNA kit e Qiagen QIAamp™ DNA Stool kit, para reação de PCR em tempo real, com sensibilidade diminuída para as conservadas em formalina. Por outro lado, Limor et al (2002) realizaram reação de PCR em tempo real, com amostras conservadas em dicromato de potássio

pelo período de até um ano, com identificação de cinco espécies patogênicas para o homem.

Em 2002, foram caracterizados *C. hominis* em amostras fecais obtidas em surto diarréico ocorrido na Creche do complexo HC. Para isto, 61 amostras positivas, conservadas em dicromato de potássio 2,5%, foram encaminhadas ao Centers for Disease Control and Prevention (CDC), de Atlanta, USA, para análise molecular. A extração de DNA foi feita com a utilização de reagentes do FastDNA[®] kit e QIAquick PCR purification kit (da Siva et al, 1999). Foram utilizados dois diferentes pares de iniciadores, CRY12/CRY14 e CRY15/CRY9, que geram dois fragmentos independentes dos domínios C e N terminal do gen COWP, respectivamente (Spano et al, 1997) e um par de iniciadores CPBDIAGF/CPBDIAGR que amplificam fragmento da região de codificação do SSUrRNA (Johnson et al, 1995). A genotipagem do *Cryptosporidium* spp. foi baseada no seqüenciamento de todos os três fragmentos, fornecendo maior consistência para a análise. O fragmento esperado foi amplificado em 49,2% das amostras positivas testadas e o seqüenciamento com base nos três fragmentos para 73,3%; com base em pelo menos um par de iniciadores usado em 20% e o restante não seqüenciado devido à quantidade insuficiente de DNA. Em 19,3% das amostras a amplificação resultou em fragmento de tamanho diferente do esperado, não seqüenciado e em 31,5% foram negativas (Gonçalves, 2002).

Entre agosto e outubro de 2004, com a vinda de Cox MJ e Whitehead M, pesquisadores da Universidade de Coventry, Inglaterra, ensaiamos no Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas da FMUSP, 153 amostras fecais conservadas em dicromato de potássio 2,5%. A extração do DNA foi feita com o “QIAMP DNA stool mini kit” (Qiagen Inc, Santa Clarita, CA) de acordo com o fabricante. Foram desenvolvidas duas PCR para amplificação do DNA. Para um fragmento da região de codificação do SSUrRNA foi utilizada a PCR dupla, com os iniciadores CP 1325 A / CP 1325 B para a primeira reação e CP 826 A / CP 826 B para a segunda reação (Xiao et al, 1999). O par de iniciadores CRY15/CRY9 foi utilizado para gerar fragmento do gene COWP (Spano et al, 1997). A genotipagem do *Cryptosporidium* spp. foi baseada na digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição *SspI* e *VspI* para região SSUrRNA, e *Rsa* para gen COWP (Jiang & Xiao, 2003). O fragmento esperado foi amplificado em 10,46% (16/153) e 20,91% (32/153) das amostras positivas testadas para fragmento da região de codificação do SSUrRNA e fragmento do gen COWP, respectivamente. A digestão com enzimas de restrição foi negativa para a totalidade de amostras, provavelmente por não reprodutibilidade dos ensaios realizados (dados não publicados).

Em março de 2005, começamos a testar as amostras positivas pela microscopia, de acordo com o protocolo desenvolvido anteriormente (Carvalho-Almeida, 2004) no Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP.

É sabido que não existe padronização de técnica de PCR para identificação de *Cryptosporidium* spp., do mesmo modo que o desenvolvimento desta metodologia depende da recuperação eficiente de oocistos, da lise de sua parede celular, da prevenção de contaminantes, da escolha do marcador genético e de seus iniciadores (Chalmers et al, 2005).

Para a lise da parede dos oocistos e extração do DNA, amostras fecais armazenadas a 20°C negativos, por esta razão foram excluídas dez amostras, sofreram duas incubações seguidas: uma para rompimento e outra para digestão da parede celular do oocisto. Primeiramente, foram incubadas com solução de lise (Tris-HCl + EDTA + SDS 10% + β mercaptoetanol). O EDTA inicia a ruptura da parede celular, o Tris-HCl equilibra o pH (= 8,0) assegurando a lise, o SDS atua na camada lipídica da membrana, e o β mercaptoetanol retarda a oxidação do DNA facilitando sua recuperação. Outra incubação foi realizada com proteinase K, provocando a digestão da parede celular. Para extração do DNA foi utilizado fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O composto fenol-clorofórmio desnatura proteínas, que formam uma camada de interface entre as fases aquosa e orgânica, ficando o DNA retido na fase aquosa. O álcool isoamílico remove resíduos orgânicos e precipita o DNA na solução aquosa.

A etapa de remoção da fase aquosa era um ponto crítico durante o ensaio, pois a camada de interface não podia ser transferida, porque em contato com o álcool formava um precipitado permanente do DNA que impossibilitava sua

posterior amplificação. Este problema foi eliminado com a introdução do tubo Phase Lock Gel light (Eppendorf®, Germany) (Araújo et al, 2006; in press).

Este protocolo (Carvalho-Almeida, 2005) está implantado no local de estudo e é de baixo custo, fornece DNA em boa quantidade e qualidade, em detrimento de vários protocolos relatados pela literatura (Nichols et al, 2006b).

Dentre os vários protocolos, podemos citar como poucos exemplos: fervura de oocistos em PBS e PVP seguida de extração com perolas de vidro e QIAamp DNA (Morgan et al, 1998a), fervura em tampão de lise seguida de choque térmico e purificação com QIAamp DNA stool mini kit (Bialek et al, 2002), separação imunomagnética seguida de choque térmico e QIAamp DNA stool mini kit (Jiang et al, 2005), separação imunomagnética seguida de QIAamp DNA stool mini kit (Xiao et al, 2006), choque térmico e QIAamp DNA stool mini kit (Bushen et al, 2007), choque térmico em tampão de lise contendo proteinase K e sarkosyl seguido de extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e extração com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (Peng et al, 1997), choque térmico em tampão de lise contendo proteinase K (Nichols et al, 2006a), choque térmico em fenol-clorofórmio e purificação com Gene-Clean (Feng et al, 2000), choque térmico seguida de extração com QIAamp DNA stool kit (Gatei et al, 2003; Houpt et al, 2005; Neira-Otero et al, 2005; Ramirez e Sreevatsan, 2006), choque térmico seguido de tratamento com SDS e extração com Wizard DNA Clean-up System (Zhou et al, 2006), incubação com tampão de lise contendo proteinase K seguida de extração com QIAMP

DNA stool kit (Chalmers et al, 2005), incubação com KOH e HCl seguida de extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e purificação com QIAMP DNA stool kit (Xiao et al, 2002; Peng et al, 2003; Sulaiman et al, 2005; Feltus et al, 2006), incubação com KOH e HCl seguida de purificação com QIAMP DNA stool kit (Samie et al, 2006), extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e purificação com QIAMP DNA stool kit (Thompson et al, 2007), extração com QIAMP DNA stool kit (Gatei et al, 2006; Das et al, 2006; Magi et al, 2006; Soba et al, 2006; Soldan et al, 2006; Trotz-Williams et al, 2006), uso de tiocianato de guanidina associado a pérolas de vidro e PVP (Silva S, 2004), uso de tiocianato de guanidina associado a pérolas de zircônio e PVP (Leoni et al, 2006), incubação com KOH seguida de extração com QIAMP DNA stool kit (Alves et al, 2003), FastDNA kit e QIAquick PCR purification kit (da Silva et al, 1999; Gonçalves, 2002; Scorza et al, 2003) .

A sensibilidade da PCR é afetada pela presença de inibidores orgânicos e inorgânicos presentes em amostras fecais (Ramirez e Sreevatsan, 2006). Preliminarmente, todos os DNA alvos eram diluídos para amplificação, e os que resultavam negativos eram refeitos sem diluição. Este procedimento dilui substâncias inibidoras sem mascarar o DNA, ao mesmo tempo em que pode comprometer a sensibilidade (Scorza et al, 2003). A introdução de PVP, que assegura remoção eficiente de inibidores que podem coprecipitar o DNA duante sua extração, e após posterior tratamento com uma solução de lise, melhorou a

amplificação final, tanto para amostras clínicas como para ambientais (Araújo et al, 2006; in press).

Vários marcadores genéticos podem ser utilizados para detecção de isolados de *Cryptosporidium* spp. (Widmer et al, 2002; Egyed et al, 2003; Ramirez et al, 2004; Sunnotel et al, 2006a) e o gene 18 SSUrRNA foi selecionado pelas características apresentadas.

Em particular, muitos estudos (Jonhson et al, 1995, Xiao et al, 1999, 2000, 2002; Gatei et al, 2002, 2003, Coupe et al, 2005) demonstram que um fragmento da pequena subunidade ribossomal do gene RNA (SSUrRNA), região altamente conservada, é capaz de amplificar todas as espécies de *Cryptosporidium* comumente relacionadas às infecções humanas, devido ao alto grau de homologia na seqüência presente em diferentes isolados e espécies deste parasito.

O gene em questão é naturalmente presente, em cinco cópias, no genoma inteiro do *Cryptosporidium*. Suas regiões ITS (espaço interno transcrito) são ricas em AT, repetitivas e altamente variáveis, permitindo que exibam diferenças significativas entre os genótipos, mas variação mínima entre isolados de algumas espécies de hospedeiros (Jiang e Xiao, 2003; Chalmers et al, 2005; Sunnotel et al, 2006a; Trotz-Williams et al, 2006), indicando inferências filogenéticas em atuais estudos de alinhamento de seqüências de DNA com outras registradas em bancos de dados especializados (Coupe et al, 2005; Zhou et al, 2006).

Algumas vezes, a PCR é dificultada por componentes que atuam como inibidores, e da dificuldade de padronização da quantidade dos componentes (DNA, Taq DNA polimerase e dNTPs) usados na reação, que em excesso ou deficiência comprometem a sensibilidade do método, assim como as condições em que a reação é submetida.

Em princípio, foi utilizado o protocolo desenvolvido anteriormente (Carvalho-Almeida, 2004), resultando em grande quantidade de não amplificação do produto pela PCR (dados não apresentados), necessitando de ajustes de temperaturas, quantidade de componentes da reação, assim como avaliação dos fornecedores de insumos.

Em agosto de 2006, começamos a trabalhar com PCR dupla e restrição de seus produtos amplificados (amplicons) por digestão enzimática (RFLP), baseados no protocolo de Coupe et al (2005), aliada à introdução do PVP e do tubo Phase Lock Gel light durante a extração do DNA, como citado anteriormente. Para testar a reprodutibilidade da técnica, amostras clínicas e ambientais, sabidamente positivas, foram ensaiadas diversas vezes com adequações necessárias.

A vantagem da PCR dupla, que envolve duas amplificações seguidas com diferentes pares de iniciadores, é o aumento da sensibilidade e especificidade (Morgan e Thompson, 1998b). É útil na detecção de pequeno número de organismos presentes em matriz diversa, como amostra fecal e ambiental (Amar et al, 2004).

Coupe et al (2005) elegeram o gene 18 SSUrRNA pelas características apresentadas acima e determinaram sítios de restrição, entre os nucleotídeos 179 e 271, apropriados para identificação de espécies e subespécies de *Cryptosporidium*. Devido à diversidade genética de isolados de *Cryptosporidium* registrada, a caracterização destes parasitos por digestão de produtos amplificados com enzimas de restrição (RFLP), apesar das limitações, permite, no mínimo, a identificação de *C. parvum* e *C. hominis*, responsáveis pela maioria das infecções humanas.

A confirmação de *Cryptosporidium* por PCR dupla em 37,2% (83/223) das amostras detectadas pela microscopia nos fez avaliar diversos fatores responsáveis por esta ocorrência.

Dentre os fatores que podem resultar em PCR negativa está a amostra fecal contendo concentrações variáveis de substâncias inibidoras, tais como: sais biliares, proteínas, complexos polissacarídeos, bilirrubina e compostos fenólicos, dependentes da dieta, da flora intestinal e das condições de saúde do hospedeiro; ou, ainda, conter número baixo de oocistos, não distribuídos uniformemente na amostra fecal, ou não presentes na alíquota separada para a extração, implicando em ausência ou deficiência do DNA alvo; também, a não preservação adequada ou degradação do DNA durante o tempo de armazenamento.

As amostras fecais utilizadas estavam armazenadas a 20°C negativos, eliminando possíveis efeitos inibidores do dicromato de potássio e da formalina

na PCR (Jonhson et al, 1995; Pieniazek et al, 1999; Jongwutiwes et al, 2002). Para minimizar os inibidores intrínsecos utilizamos o PVP, como já descrito anteriormente.

Embora, a literatura relate a relação inversa entre tempo de armazenamento da amostra fecal e qualidade de DNA extraído com conseqüente perda da sensibilidade da PCR (Piggott, 2004), não foi obtida correlação estatisticamente significativa ($p>0,05$) para ano de coleta, dado concordante com os de Nsubuga et al (2004), que, também, não observaram interferência sobre seus resultados analisando amostras coletadas há 33 meses. Diferentemente de Limor et al (2002), Higgins et al (2001), que utilizaram amostras conservadas por um período de três e doze meses, respectivamente.

A detecção morfológica foi feita por microscopistas treinados, e a maioria das amostras examinadas apresentava pequena quantidade de oocistos (máximo de 10 oocistos/10 μ l de amostra fecal). Diante deste fato fizemos testes adicionais, com replicação de amostras durante a extração de DNA, que implicou em concentração de material e garantiu amplificação do produto (dados não apresentados). Esta estratégia foi utilizada por Xiao et al (2006) aumentando a eficácia da PCR de 62% para 86%, em amostras ambientais, com baixo número de oocistos presentes, aumentando, também, a possibilidade de detecção de genótipos múltiplos em água de superfície. Este processo implica em maior demanda de tempo e de insumos, inviabilizando a

metodologia como ferramenta diagnóstica para amostras clínicas, mas será objeto de estudos posteriores.

Embora Coupe et al (2005) afirmarem a alta sensibilidade da PCR-RFLP, acreditamos que o número baixo de oocistos de *Cryptosporidium* detectado pela microscopia influencia o resultado, provavelmente pela distribuição heterogênea na amostra ou mesmo por preservar alíquotas isentas do DNA alvo. Esta correlação foi estatisticamente significativa para o *C. hominis* ($p = 0,025$).

Resultados discordantes entre a microscopia e a PCR foram relatados por Magi et al (2006) que detectaram pela PCR, positividade de 20% nas suas amostras, pela presença de poucos oocistos distribuídos de forma não homogênea no material fecal analisado, assim como por Peng et al (2003), com 35,3% de positividade sugerindo longo tempo de armazenamento das dezessete amostras fecais em formalina. Neste estudo Peng et al (2003) analisaram, ainda, 248 amostras fecais de bezerros e 17 amostras de água, com positivities de 24,2% e 68,8%, respectivamente.

Em contra partida, os dados gerais obtidos pela PCR (37,23%), neste estudo, resultou em um dado extremamente positivo, quando comparado com os derivados de parcerias anteriores, ou seja, da amplificação de 49,2% das amostras positivas testadas pelo CDC e de no máximo de 20,9% com os pesquisadores da Universidade de Coventry, Inglaterra. Considerando que, estes dois estudos foram desenvolvidos por pesquisadores inseridos na

pesquisa diagnóstica por biologia molecular, com protocolos sedimentados para PCR, além do uso de reagentes comerciais para extração de DNA (kits), neste trabalho foi padronizado por técnica manual e uso de reagentes caseiros.

A restrição dos “amplicons” obtidos pelas enzimas de restrição forneceu caracterização de *C. hominis*, *C. parvum* e de *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis* em 62,7% (52/83) das amostras positivas pela PCR. Apesar da simplicidade da metodologia, esta apresenta limitações, como já discutido anteriormente, permitindo falhas de resolução, necessitando de seqüenciamento ou até mesmo o uso de micro satélites para maior consistência na caracterização (Feng et al, 2000; Widmer et al, 2002; Monis e Thompson; 2003; Gonçalves et al, 2006a).

Tiangtip et al (2002) comparando dimensões de oocistos durante a análise microscópica com caracterização molecular observaram que *C. muris* e *C. felis* diferiram das outras espécies de *Cryptosporidium* responsáveis pelas infecções humanas ($p < 0,001$), *C. muris* varia de $> 5,5 \times 7,5 \mu\text{m}$, enquanto que *C. felis* é extremamente pequeno. Diferentemente de Silva (2004) e Fall et al (2003) que afirmam a impossibilidade de distinção entre as diferentes espécies por apresentarem similaridades morfológicas.

Neste estudo, identificamos tamanhos diferentes de oocistos e correlações significativas foram observadas entre *C. hominis* com oocistos de até $6 \mu\text{m}$ de diâmetro ($p = 0,003$), enquanto que para *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis* foi com os que apresentam diâmetro maior que $6 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$).

Maior prevalência de *C. hominis* (88,5%) foi indicativa de que a transmissão antroponótica contribui também para os casos esporádicos de criptosporidiose na cidade de São Paulo, detectado anteriormente em surto (Gonçalves, 2002; 2006a). Este dado é concordante com a literatura que relata maior taxa de *C. hominis* em áreas urbanas, indicando que, provavelmente, a infecção é adquirida pelo contato direto pessoa a pessoa, ou indiretamente através de água ou alimento contaminado (Ramirez et al, 2004; Cacciò et al, 2005b; Feltus et al, 2006; Das et al, 2006).

Estudos realizados com isolados humanos brasileiros caracterizam *C. hominis* como o mais prevalente no Brasil (Gonçalves, 2002; Gatei et al, 2003; Araújo, 2004; Silva, 2004; Bushen et al, 2007; Gonçalves, 2006a); assim como nos Estados Unidos, Austrália, Guatemala, Peru, Haiti, Kênia, Tailândia e África do Sul, e diferentemente de Inglaterra, Portugal, França, Alemanha e provavelmente no restante da Europa onde a prevalência maior é de *C. parvum* (Raccurt et al, 2006; Gatei et al, 2006; Samie et al, 2006; Soba et al, 2006; Soldan et al, 2006; Cacciò, 2005a; Houpt et al, 2005; Joachim, 2004; Ramirez et al, 2004, Xiao et al, 2004a; Alves M et al, 2003), ou ainda no Chile onde a distribuição é eqüitativa (Neira-Otero et al, 2006), entretanto o pequeno número de isolados estudados não permite afirmar a existência de alguma variação geográfica. Neste estudo não foi observada nenhuma correlação significativa entre os genótipos e o local de origem dos isolados.

Por outro lado, *C. parvum* é resultante de isolados coletados em 2000, um na região de Mogi das Cruzes e outro na região de Osasco. Os dois eram do sexo masculino, com 34 e 47 anos de idade, sem associação de outros enteroparasitos e com diarreia. Sua baixa taxa (3,8%) e não caracterização nos isolados mais recentes parece indicar transmissão zoonótica minimizada em nosso meio.

A digestão dos produtos amplificados (RFLP) com as enzimas de restrição utilizadas neste estudo não permitiu a caracterização de outras espécies, aqui denominadas por *Cryptosporidium* não *parvum* não *hominis* (34,9%), indicando a necessidade de seqüenciamento, assim como para confirmação e elucidação de prováveis infecções mistas com *C. hominis* (27,2%). Mas este dado é indicativo da presença de diferentes espécies de *Cryptosporidium* em fontes ambientais e da adaptação humana, podendo resultar em infecções menos severas que o *C. hominis* e o *C. parvum*, sem correlação significativa com imunossupressão, idade, sexo e sintomas.

Interessante é a detecção de *C. hominis* na maioria dos surtos causados por água, mesmo em regiões em que prevalecem criptosporidiose causada por *C. parvum*, ou mesmo a presença mista destes parasitos, indicando contaminação por múltiplas fontes e esgoto humano (Smith et al, 2006).

Estudos de genotipagem em isolados humanos brasileiros têm relatado presença de *C. não parvum* (Ortega et al, 1991); de *C. hominis* em São Paulo, São Paulo (Gonçalves, 2002; 2006a) de *C. hominis* em Aracaju, Sergipe (Gatei

et al, 2003), de *C. parvum*, *C. hominis* e *C. não parvum* em Fortaleza, Ceará (Brantley et al, 2003) e em São Paulo, São Paulo (Carvalho-Almeida, 2004); de *C. parvum* e *C. hominis* em São Paulo e Taubaté, São Paulo, e de *C. hominis* e *C. meleagridis* em Sorocaba, São Paulo (Araújo, 2004), de *C. parvum* e *C. hominis* no Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Silva, 2004) e em Fortaleza, Ceará (Bushen et al, 2007), mostrando que múltiplos genótipos podem ocorrer em uma mesma região geográfica.

Em São Paulo, São Paulo, a alta soropositividade em crianças de até 10 anos de idade (Cox et al, 2005), assim como detecção de oocistos em indivíduos hígidos (Gonçalves, 2002; 2003; 2005b), em águas de superfície (Farias et al, 2002; Muller, 2000; Espindola, 2001; Hachich et al, 2004), em amostras de esgotos (Farias et al, 2002), em pombos (Carvalho-Almeida, 2004), em animais silvestres (Dall'Olio e Franco, 2004) e em cães (Lallo e Bondan, 2006), sugerem um complexo de reservatórios e de padrão de fontes de contaminação para o ambiente, que contribuem para a manutenção desta infecção na zona urbana.

A caracterização de *C. meleagridis* em Sorocaba, São Paulo (Araujo, 2004), de *Cryptosporidium* spp., em pacientes com Aids, em Fortaleza, Ceará (Brantley et al, 2003) e de *Cryptosporidium* spp. (PCR) e de *C. não hominis não parvum* (RFLP) neste estudo, parece indicar a suscetibilidade deste fragmento da população à infecção por diferentes espécies de *Cryptosporidium*, podendo inclusive determinar um padrão misto de infecção como os 27,2% suspeitos

deste estudo e os detectados por Silva (2004). Assim como, Raccurt et al (2006) caracterizaram *C. felis* em pacientes com Aids no Haiti mostrando a suscetibilidade de indivíduos imunocomprometidos a uma ampla faixa de *Cryptosporidium* spp.

A detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras clínicas e ambientais, assim como em animais urbanos e silvestres, mostra que diferentes rotas de transmissão podem ocorrer significando um desafio à saúde pública, e a caracterização molecular destes isolados é necessária como suporte para estudos epidemiológicos e para tomada de medidas preventivas.

É essencial a necessidade de técnicas moleculares, como a PCR, para estudos adicionais de epidemiologia molecular de *Cryptosporidium* spp., e a técnica aqui empregada demonstra sua utilização neste contexto, uma vez que associada a RFLP utilizando apenas duas enzimas de restrição, é capaz de diferenciar *C. hominis* e *C. parvum*, responsáveis pela maioria das infecções humanas de outras espécies relacionadas, a despeito de falhas observadas em isolados com baixo número de oocistos, durante a triagem microscópica, e que pode ser suprido com réplica de extrações.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A frequência de *Cryptosporidium* spp. na amostra estudada foi de 9,7%.
2. Foram obtidos perfis característicos com genótipos de *C. hominis* em 88,5%, de *C. parvum* em 3,8%, de *Cryptosporidium* não *hominis* não *parvum* em 34,9% e de padrão misto em 27,2%. Os não caracterizados foram considerados *Cryptosporidium* spp.
3. A presença de diarreia foi significativa ($p < 0,001$) para pacientes infectados por *Cryptosporidium* spp.
4. Foi verificada a presença de outros parasitos intestinais além de *Cryptosporidium* spp. na população, com frequências menores que as relatadas na maioria dos estudos publicados.
5. Foram observadas associações significativas para *Cryptosporidium* spp. com *Endolimax nana* (1) ($p = 0,018$) e *Enterobius vermicularis* (1) ($p = 0,006$). Assim como não significativas com *Blastocystis hominis* (1), *Isospora belli* (2), *Ascaris lumbricoides* (3).
6. *Cryptosporidium* spp. apresentou associações significativas com todos os grupos de riscos avaliados.
7. A presença de múltiplos genótipos sugere um complexo padrão de reservatórios e de fontes de contaminação, assim como a maior frequência de *C. hominis* denota a importância da rota fecal – oral na transmissão desta

infecção, seja pelo contato direto pessoa a pessoa, ou indiretamente através de água ou alimento contaminado.

8. A metodologia padronizada da PCR-Dupla seguida de RFLP é capaz de diferenciar *C. hominis* e *C. parvum* de *C. não hominis não parvum*.
8. A metodologia utilizada para extração de DNA em amostras fecais, conservadas a 20°C negativos por até seis anos é viável e de baixo custo.
9. Existe correlação estatisticamente significativa entre tamanho dos oocistos detectados na microscopia e os genótipos *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium não hominis não parvum*.
10. A caracterização dos genótipos por metodologias similares a aqui empregada associada à microscopia é útil para estudos epidemiológicos.

ANEXOS

Anexo A: Levantamento de trabalhos realizados no Brasil sobre parasitos intestinais, entre 1987 e 2006.

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Wainstein & Petrillo, 1987	Porto Alegre, RS	600 laudos: nível sócio econômico Baixo Alto	29% de positividade 7,8% de positividade
Cantalice Neto et al, 1988	Porto Alegre, RS	70 crianças, < 2 anos, com diarreia persistente.	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 14,0%
Chieffi et al, 1988	Guarulhos, SP	913 escolares de 6 e 16 anos de idade	<i>A. lumbricoides</i> : 40,8% <i>T. trichiura</i> : 31,2% Ancilostomidio: 1,3% <i>S. stercoralis</i> : 0,4% <i>E. vermicularis</i> : 1,9% <i>S. mansoni</i> : 0,2 <i>Taenia</i> sp: 0,2% <i>H. nana</i> : 3,4% <i>E. histolytica</i> : 4,4% <i>E. coli</i> : 17,5% <i>G. lamblia</i> : 13,0% <i>I. butschlii</i> : 1,2% <i>E. nana</i> : 14,7%
Dias et al, 1988	São Paulo, SP	157 pacientes com AIDS	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 12,1%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Monteiro et al, 1988	São Paulo, SP	695 crianças < 5 anos de idade	30,9 % de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 16,4% <i>G. lamblia</i> : 14,5% <i>T. trichiura</i> : 12,5%
Alves et al, 1989	Recife, PE	90 crianças desnutridas (III), 3-24 meses	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 15,5%
Gross et al, 1989	Belo Horizonte, MG	254 crianças de comunidades de baixo nível sócio econômico	70,7 % de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 55,4% <i>T. trichiura</i> : 19,6% <i>G. lamblia</i> : 17,4%
Loureiro et al, 1989	Belém, PA	61 crianças < 5 anos 115 amostras diarréicas 86 amostras não diarréicas	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 5,2% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 0%
Moura et al, 1989	Rio de Janeiro, RJ	99 pacientes HIV	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 15,2% <i>E. coli</i> : 15,2% <i>G. lamblia</i> : 15,2% <i>E. histolytica</i> : 13,1% <i>A. lumbricoides</i> : 11,1% <i>I. belli</i> : 10,1%
Soares et al, 1989	Porto alegre, RS	120 crianças 80 com diarréia 40 sem diarréia	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 3,75% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 0,0%
Pedrazzani et al, 1990	Santa Eudóxia, São Carlos, SP	254 crianças	37,8 % de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 12,1% <i>T. trichiura</i> : 4,8% Ancilostomideo: 3,7%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
			<i>H. nana</i> : 3,7 %
Ferreira et al, 1991	Aldeia Iaulapiti, Parque Xingu, MT	69 índios	89,9% de positividade <i>Ancilostomideo</i> : 82,6% <i>E. vermicularis</i> : 26,1% <i>A. lumbricoides</i> : 20,3% <i>E.coli</i> : 68,1%
Guerra et al, 1991	Butantã, Paulo, SP	São 481 usuárias grávidas de Centros de Saúde	45,1% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 19,0% <i>Ancilostomideo</i> : 16,7% <i>T. trichiura</i> : 15,9%
Rodrigues et al, 1991	São Paulo, SP	271 pacientes HIV 98 com diarreia 173 sem diarreia	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 14,3% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 0%
Torres et al, 1991	São Paulo, SP	3.076 crianças de creches municipais, < 7 anos 52 manipuladores de alimentos destas creches	<i>G. lamblia</i> : 32,8% <i>G. lamblia</i> : 4,0%
Ferrari et al, 1992	Aldeia Karitiana, RO	111 índios	38,7% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 18,9%
Gioia, 1992	Sousa, Campinas, SP	770 prontuários de Centro de Saúde	48,2% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 48,2% <i>G. lamblia</i> : 30,7% <i>T. trichiura</i> : 18,4% <i>E. vermicularis</i> : 9,6%
Guizelini &	São Paulo, SP	Pacientes HIV e crianças com diarreia	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 10,4%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Amato Neto, 1992			
Lima et al, 1992	Fortaleza, PE	37 crianças com diarreia	<i>Cryptosporidium</i> spp.:13%
Mangini et al, 1992	São Paulo, SP	241 crianças ≤ 48 meses	<i>Cryptosporidium</i> spp.:17,43%
Lomazi et al, 1993	Paulínia, SP	288 crianças com diarreia aguda	<i>G. lamblia</i> : 11,1%
Saúda et al, 1993	Santos, SP	131 pacientes com AIDS em centro de referência	<i>I. belli</i> : 9,9 % <i>Cryptosporidium</i> spp.:19,1%
Ferreira et al, 1994	São Paulo, SP	407 moradores de favela	45,7 % de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 23,8% <i>T. trichiura</i> : 17,2% <i>G. lamblia</i> : 4,2% <i>E. histolytica</i> : 1,5%
Newman et al, 1993	Fortaleza, CE	Crianças Animais	<i>Cryptosporidium</i> spp.: + <i>Cryptosporidium</i> spp.: +
Newman et al, 1994	Fortaleza, CE	189 crianças em favela sorodiagnóstico	<i>Cryptosporidium</i> spp.:95%
Santana et al, 1994	Fortaleza, CE	215 crianças < 2 anos moradoras de favela Controle 90 dias após tratamento	15% poliparasitismo 40% reincidentes
Silva AC & Hirschfeld, 1994	Alfenas, MG	896 moradores	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 2,80%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Silva GAP et al, 1994	Recife, PE	Lactentes 156 com diarreia 80 sem diarreia	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 6,4% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 0%
Wuhib et al, 1994	Fortaleza, CE	166 pacientes HIV Com diarreia (85%)	<i>Cryptosporidium</i> spp.: + Microsporidio: +
Zu et al, 1994	Fortaleza, Brasil Anhui, China Virginia, EUA	Sorologia (Ig G e Ig M)	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 95% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 57,5% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 16,9%
Costa-Cruz et al, 1995	Uberlândia, MG	104 manipuladoras de alimentos em escolas	47,1% de positividade <i>G. lamblia</i> : 21,1% <i>E. coli</i> : 21,1% Ancilostomideo: 9,6% <i>A. lumbricoides</i> : 5,8% <i>E. histolytica</i> : 2,9% <i>H. nana</i> : 1,9% <i>S. stercoralis</i> : 1,0%
Garlipp et al, 1995	Campinas, SP	111 pacientes 92 HIV 19 controle	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 16,2% <i>I. belli</i> : 6,5% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 1,8%
Kobayashi et al, 1995	Holambra, SP	222 habitantes	70% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 5,4% <i>T. trichiura</i> : 8,6% Ancilostomideo: 19,8% <i>S. stercoralis</i> : 10,4% <i>E. vermicularis</i> : 1,4%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
			<i>H. nana</i> : 0,9% <i>E. histolytica</i> : 3,2% <i>E. hartmanni</i> : 2,7% <i>E. coli</i> : 9,9% <i>E. nana</i> : 14,0% <i>I. butschlii</i> : 2,3% <i>G. lamblia</i> : 10,4% <i>B. hominis</i> : 37,8 %
Dorea et al, 1996	Botucatu, SP	219 estudantes de 7 a 18 anos de idade	56,1% de positividade
Franco, 1996	Campinas, SP	13 creches 307 crianças (2-42 meses)	17,91% de positividade <i>G. lamblia</i> : 10,09% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 5,53% Outros protozoários: 1,61%
		134 funcionários	16,41% de positividade
Gennari-Cardoso et al, 1996	Uberlândia, MG	94 crianças	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 4,26%
Costa-Macedo & Rey, 1997	Rio de Janeiro, RJ	402 crianças	11% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 5,7% <i>G. lamblia</i> : 4,2%
Ferreira & Marçal Junior, 1997	Martinésia, Uberlândia, MG	103 estudantes	22,3% de positividade
Rezende et al,	Uberlândia, MG	264 manipuladores de alimentos de 20 a	

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
1997		66 anos em 57 escolas Setembro de 1989	17% de positividade <i>G. lamblia</i> : 8,0 % <i>A. lumbricoides</i> : 3,0% <i>E. histolytica</i> : 2,0%
		Abril de 1990	10% de positividade Ancilostomideo: 5,0% <i>G. lamblia</i> : 2,0% <i>A. lumbricoides</i> : 1,0%
		Setembro de 1990	10% de positividade Ancilostomideo: 5,0% <i>G. lamblia</i> : 3,0% <i>A. lumbricoides</i> : 2,0%
da Costa- Macedo et al, 1998	Rio de Janeiro, RJ	1.381 crianças < 5 anos, em favelas	54,5% de positividade
Ferreira et al, 1998	São Lourenço da Mata, PE	Habitantes de 4 a 18 anos de idade	93% de positividade
Machado & Costa-Cruz, 1998	Uberlândia, MG	300 crianças de 4 meses a 7 anos de idade	88,4% de positividade <i>G. lamblia</i> : 78,3% <i>A. lumbricoides</i> : 15,3% <i>S. stercoralis</i> : 13,0% <i>H. nana</i> : 6,7% Ancilostomideo: 6,0% <i>E. vermicularis</i> : 4,0% <i>H. diminuta</i> : 4,0%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Miranda et al, 1998	Aldeia Parakana, PA	126 índios em 1992	<i>T. trichiura</i> : 0,7% 80,2% de positividade Ancilostomideo: 33,3% <i>A. lumbricoides</i> : 42,8% <i>T. trichiura</i> : 0,8% <i>S. stercoralis</i> : 5,6% <i>E. histolytica</i> : 65,0% <i>G. lamblia</i> : 46,8%
Tomps, 1998	Perus, SP	174 índios em 1995 75 pacientes Água de poços Água de rede pública	88,5 % de positividade <i>Cryptosporidium</i> spp.: 14% <i>Cryptosporidium</i> spp.: + <i>Cryptosporidium</i> spp.: +
Baraldi et al, 1999	Campinas, SP	172 pacientes	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 18,6% <i>Isospora belli</i> : 15,7% Co-infecção: 31,98%
Cimerman et al, 1999	São Paulo, SP	200 pacientes AIDS	40 % de positividade <i>G. lamblia</i> : 16% <i>E. coli</i> : 13% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 7% <i>E. nana</i> : 3,5% <i>A. lumbricoides</i> : 2,5% <i>S. stercoralis</i> : 2,5% <i>I. belli</i> : 2% <i>B. hominis</i> : 0,5%
Dias Junior, 1999	Araras, SP	Água de esgoto Rio (efluente de esgoto)	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 100% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 100%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Ludwig et al, 1999.	Assis, SP	18.366 exames de Centros de Saúde	23,3% de positividade <i>G. lamblia</i> : 8,7% <i>A. lumbricoides</i> : 5,5% <i>T. trichiura</i> : 2,4%
Machado et al, 1999	Mirassol, SP	Estudantes 2 a 6 anos 31: Escolas privadas 36: Escolas públicas 36 estudantes 7 a 15 anos 72: Escolas privadas 60: Escolas públicas	<i>G. lamblia</i> : 9,7% <i>G. lamblia</i> : 61,1% <i>G. lamblia</i> : 5,6% <i>G. lamblia</i> : 10,0%
Miranda et al, 1999	Tribo Tembe, AM	93 índios	Ancilostomideo: 29,0% <i>A. lumbricoides</i> : 34,4% <i>E. histolytica</i> : 12,9% <i>G. lamblia</i> : 4,3%
Moitinho et al, 1999	Maringá, PR	136 crianças < 12 anos	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 6,6% Outros parasitos: 16,2%
Newman et al, 1999	Fortaleza, CE	189 crianças em favela	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 31,2%
Saldiva et al, 1999	São Paulo, SP	Crianças de 1 a 12 anos de idade	<i>G. lamblia</i> : 44,0% <i>E. nana</i> : 43,0% <i>A. lumbricoides</i> : 41,0% <i>T. trichiura</i> : 40,0%
Tavares-Dias et al, 1999	São José da Bela Vista, SP	habitantes	44,4% de positividade
Tsuyuoka et al, 1999	Aracaju, SE	360 escolares, de 4 a 24 anos de idade	42% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 28,7%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Costa-Macedo & Rey, 2000	Rio de Janeiro, RJ	260 crianças $\leq$ 2 anos em centro de saúde	<i>T. trichiura</i> : 15,6%
			Ancilostomídeo: 1,7%
			12,7% de positividade
			crianças < 1ano 8,1% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 4,3% <i>G. lamblia</i> : 3,2%
Ferreira et al, 2000	São Paulo, SP	1.016 crianças $\leq$ 59 meses $\rightarrow$ 1984/1985	crianças 1 $\leq$ 2 anos 24% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 6,7% <i>G. lamblia</i> : 14,7%
			Sem parasitoses
			8,1% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 12,7% <i>G. lamblia</i> : 5,0% <i>T. trichiura</i> : 3,6%
			30,9% de positividade Helmintos: 22,3% <i>G. lamblia</i> : 14,5%
Gamba et al, 2000	Itaquaquecetuba, SP	10 poços 2 fossas sépticas	10,7% de positividade Helmintos: 4,8% <i>G. lamblia</i> : 5,5%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.: 80,0% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 100,0%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Lima et al, 2000	Fortaleza, CE	1091 crianças	
		528 com diarreia aguda	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 11,4% <i>G. lamblia</i> : 7,7% Microsporidio: 0% <i>S. stercoralis</i> : 0,4% <i>A. lumbricoides</i> : 8,3% <i>T. trichiura</i> : 7,1% <i>E. histolytica/dispar</i> : 0,8%
		120 com diarreia persistente	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 23,9% <i>G. lamblia</i> : 20,5% Microsporidio: 0% <i>S. stercoralis</i> : 1,1% <i>A. lumbricoides</i> : 10,2% <i>T. trichiura</i> : 9,1% <i>E. histolytica/dispar</i> : 0%
		443 controle	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 5,2% <i>G. lamblia</i> : 7,9% Microsporidio: 4,0% <i>S. stercoralis</i> : 0,5% <i>A. lumbricoides</i> : 13,8% <i>T. trichiura</i> : 7,7% <i>E. histolytica/dispar</i> : 1,1%
Muller, 2000	São Paulo, SP	Estações de tratamento de água (2): 24 amostras	
		Bruta	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 75,0%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
		Tratamento químico	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 12,5%
		Bruta	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 73,91%
		Tratamento por membrana filtrante	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 33,33%
Oshiro et al, 2000	Campo Grande, MS	1.051 crianças < 5 anos	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 1,1%
Rocha et al, 2000	BambuÍ, MG	2.091 escolares	20,1 % de positividade <i>G. lamblia</i> : 6,2% <i>E. coli</i> : 6,2% <i>A. lumbricoides</i> : 4,8% Ancilostomideo: 1,4% <i>T. trichiura</i> : 0,8% <i>E. vermicularis</i> : 1,0% <i>H. nana</i> : 0,2% <i>Taenia</i> sp: 0,2% <i>S. stercoralis</i> : 0,3% <i>S. mansoni</i> : 0,1% <i>E. histolytica</i> : 1,0% <i>E. nana</i> : 0,2%
Arcoverde, 2001	Recife, PE	Pacientes HIV	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 21,8%
Capuano et al, 2001	Ribeirão Preto, SP	3.340 amostras fecais de pacientes HIV (1990-1997)	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 5,3% <i>I. belli</i> : 3,6% Coinfecção: 1,1%
Espindola, 2001	Itaquaquecetuba, SP	15 poços de água 2 fossas rasas	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 33,3% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 100,0%
Feitosa et al,	Salvador, BA	Pacientes	

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
2001		365 com HIV	55,9% de positividade <i>E. nana</i> : 18,9% <i>E. coli</i> : 7,9% <i>A. lumbricoides</i> : 11,8% <i>T. trichiuris</i> : 5,2% <i>E. histolytica</i> : 5,5% <i>A. duodenalis</i> : 4,4% <i>G. lamblia</i> : 4,9% <i>I. butschlii</i> : 1,1% <i>S. mansoni</i> : 2,5% <i>S. stercoralis</i> : 5,5% <i>E. vermicularis</i> : 0,5% <i>H. nana</i> : 0,3%
		5.243 sem HIV	52,7% de positividade <i>E. nana</i> : 25,7% <i>E. coli</i> : 15,3% <i>A. lumbricoides</i> : 94,0% <i>T. trichiuris</i> : 5,5% <i>E. histolytica</i> : 4,1% <i>A. duodenalis</i> : 3,8% <i>G. lamblia</i> : 2,4% <i>I. butschlii</i> : 1,8% <i>S. mansoni</i> : 1,5% <i>S. stercoralis</i> : 0,74% <i>E. vermicularis</i> : 1,1% <i>H. nana</i> : 0,3%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Franco et al, 2001	Campinas, SP	Rio Atibaia	<i>Cryptosporidium</i> spp.: + <i>Giardia</i> sp: +
Giraldi et al, 2001	Rolandia, PR	191 crianças de creche 434 crianças de ensino fundamental	15,2% de positividade 52,5% de positividade
Machado et al, 2001	Belém, PA	49 crianças assintomáticas de 7 ≤ 15 anos de idade	80,5% de positividade <i>T. trichiura</i> : 57,6% <i>A. lumbricoides</i> : 36,4% Ancilostomideo: 24,3% <i>G. lamblia</i> : 31,7% <i>E. histolytica</i> : 12,2% <i>E. coli</i> : 21,2% <i>B. hominis</i> : 39,4% <i>I. butschlii</i> : 9,1%
Medeiros al, 2001	Ribeirão Preto, SP	1.836 crianças < 10 anos Coprocultura Kinyoun	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 1,8%
Prado et al, 2001	Salvador, BA	1.131 escolares 7 ≤ 14 anos de idade	66,1% de positividade <i>T. trichiura</i> : 38,6% <i>A. lumbricoides</i> : 31,2% Ancilostomideo: 8,4% <i>S. mansoni</i> : 2,2% <i>G. lamblia</i> : 8,9% <i>E. histolytica</i> : 5,5%
Takayanagui et al, 2001	Ribeirão Preto, SP	Verduras (172 pontos)	33,3% de positividade <i>Entamoeba</i> sp: 25,58% <i>Ascaris</i> sp: 1,74%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
			Ancilostomideo: 15,70% <i>H. nana</i> : 1,16% <i>Giardia</i> sp: 2,33% <i>Toxocara</i> sp: 0,58% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 1,16%
Uchôa et al, 2001	Niterói, RJ	5 creches comunitárias 218 crianças ≤ 11 anos de idade 43 funcionários	55,0% de positividade <i>T. trichiura</i> : 26,6% <i>A. lumbricoides</i> : 30,0% <i>H. nana</i> : 0,8% <i>E. vermicularis</i> : 0,8% <i>G. lamblia</i> : 38,3% <i>E. coli</i> : 26,6% <i>E. nana</i> : 17,5% <i>E. histolytica</i> : 5,5% <i>B. hominis</i> : 2,5%
Capuano et al, 2002	Ribeirão Preto, SP	341 manipuladores de alimentos de 14 a 68 anos	31,3% de positividade
Carneiro et al, 2002	Caparaó e Alto Caparaó, MG	1171 crianças ≤ 14 anos 11 comunidades rurais	<i>A. lumbricoides</i> : 12,2% <i>A. duodenale</i> : 5% <i>T. trichiura</i> : 5% <i>S. mansoni</i> : 2,2% <i>E. vermicularis</i> : 1,8%
Cimerman et al, 2002	São Paulo, SP	146 pacientes HIV de 2 a 75 anos	<i>E. nana</i> : 27,4% <i>E. coli</i> : 22,6% <i>S. stercoralis</i> : 21,9% <i>G. lamblia</i> : 13,0%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
			<i>I. belli</i> : 12,3% <i>A. lumbricoides</i> : 8,2% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 6,8%
Farias et al, 2002	São Paulo, SP	Esgoto não tratado Estação elevatória (12) Córrego receptor (12)	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 100% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 100%
Franco & Cantusio Neto, 2002	Campinas, SP	(13) água mineral	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 23,08%
Gomes et al, 2002	Rio de Janeiro, RJ	82 moradores de rua	<i>A. lumbricoides</i> : 48,85% <i>T. trichiura</i> : 32,9 % Ancilostomideo: 8,5%
Gonçalves, 2002	São Paulo, SP	224 crianças ≤ 4 anos de idade	32,1% de positividade <i>Cryptosporidium</i> spp.: 22,3% <i>G. lamblia</i> : 11,6% <i>E. nana</i> : 3,1% <i>E. coli</i> : 0,9% <i>E. hartmanni</i> : 0,4% <i>B. hominis</i> : 0,9% <i>I. belli</i> : 0,9% <i>A. lumbricoides</i> : 3,1% <i>T. trichiura</i> : 0,4% <i>E. vermicularis</i> : 0,9% PCR (49,2%) <i>C. hominis</i> :
		61 amostras	
Muniz et al, 2002	São Paulo	1.044 crianças < 5 anos	10,7% de positividade

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
2002			<i>G. lamblia</i> : 5,5% <i>A. lumbricoides</i> : 4,4% <i>T. trichiura</i> : 1,0%
Muniz- Junqueira & Queiroz, 2002	Brasília, DF	124 crianças	75% de positividade
Pereira et al, 2002	Goiânia, GO	445 crianças ≤ 10 anos	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 18,7%
Alves et al, 2003	Raimundo Nonato, PI	265 habitantes	57,0% de positividade <i>E.coli</i> : 35,8% <i>E. nana</i> : 13,6% <i>H. nana</i> : 9,4% Ancilostomideo: 9,4%
Brantley et al, 2003	Fortaleza, CE	12 pacientes HIV PCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 41,7% <i>C. parvum</i> : 60% Não <i>C. parvum</i> : 40%
Brito et al, 2003	Jequié, BA	1.709 habitantes de 7 a 17 anos	<i>T. trichiura</i> : 74,8% <i>A. lumbricoides</i> : 63,0% <i>S. mansoni</i> : 55,5% Ancilostomideo: 15,7%
Ferreira et al, 2003	Campo Florido, MG	72 estudantes de área rural	59,7% de positividade
Gatei et al, 2003	Aracaju, SE	7 crianças	<i>C. hominis</i> : 100% (PCR)

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Gonçalves et al, 2003	Itanhomi, MG	298 escolares 5 a 13 anos	46% de positividade <i>E. nana</i> : 46,7% <i>E. coli</i> : 37,2% <i>G. lamblia</i> : 20,4% <i>B. hominis</i> : 11,7% <i>E. histolytica</i> : 6,6% <i>Cryptosporidium</i> spp: 5,8% <i>S. mansoni</i> : 9,5% <i>E. vermicularis</i> : 9,5% Ancilostomideo: 9,5% <i>A. lumbricoides</i> : 5,1% <i>T. trichiura</i> : 4,4% <i>S. stercoralis</i> : 2,9%
Schnack et al, 2003	Criciúma, SC	94 crianças 5 anos	<i>Cryptosporidium</i> spp: 85,1% <i>E. histolytica</i> : 56,4% <i>G. lamblia</i> : 4,3%
Silva S et al, 2003	Rio de Janeiro, RJ	485 crianças	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 6,8% Rotavírus: 3,3%
Dall'Olio & Franco, 2004	Mata Atlântica do Sudeste, Brasil	240 mamíferos silvestres (Itatiaia, RJ; São José do Barreiro, SP; São João da Boa Vista, SP)	<i>Cryptosporidium</i> : 10,3% <i>C. parvum</i> : 5,1% <i>C. parvum</i> + <i>C. muris</i> : 5,1%
Hachich et al, 2004	Estado de São Paulo	278 amostras de água 28 pontos	<i>G. lamblia</i> : 27,0% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 2,5%
Iacovski et al, 2004	Florianópolis, SC	27 amostras de esgoto não tratado	<i>Cryptosporidium</i> spp: 74,07%
Quadros et al,	Lages, SC	200 crianças de escolas infantis, de 2 a	70,5% de positividade

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
2004		6 anos de idade	<i>A. lumbricoides</i> : 35% <i>T. trichiura</i> : 13% <i>G. lamblia</i> : 14%
Morrone et al, 2004	Porto Alegre, RS	96 pré-escolares da periferia	82,3% de positividade <i>A. lumbricoides</i> <i>T. trichiura</i> <i>G. lamblia</i>
Ribeiro et al, 2004	Rio de Janeiro, RJ	75 pacientes HIV+	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 9,33%
Tashima & Simões, 2004	Presidente Prudente, SP	1.000 crianças	<i>G. lamblia</i> : 7,3% <i>E. coli</i> : 3,9% <i>E. vermicularis</i> : 1,9%
Zani et al, 2004	Covas, PE	119 habitantes	<i>A. lumbricoides</i> : 47,7% <i>T. trichiura</i> : 45,7% Ancilostomideo: 47,7%
Araújo et al, 2005	Eirunepe, AM	413 habitantes	64,4% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 35,6% <i>T. trichiura</i> : 18,6% Ancilostomideo: 9,9% <i>S. stercoralis</i> : 1,0% <i>E. vermicularis</i> : 0,5% <i>E. histolytica</i> : 13,3% <i>G. lamblia</i> : 1,0%
Chieffi et al, 2005	São Paulo, SP	Pacientes da Santa Casa de Misericórdia 60 hematológicos imunossuprimidos	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 10%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Ferreira & Andrade, 2005	Estiva Gerbi, SP	59 controle estudantes	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 0% 11,5% de positividade
Gurgel et al, 2005	Aracaju, SE	219 crianças em creches 249 crianças controle	63,0% de positividade 41,4% de positividade
Hurtado-Guerrero et al, 2005	Nova Olinda do Norte, AM	Idosos ribeirinhos	72,8% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 35,2% <i>T. trichiura</i> : 16,0% Ancilostomideo: 9,0% <i>S. stercoralis</i> : 9,0% <i>E. coli</i> : 18,2% <i>G. lamblia</i> : 7,0% <i>E. histolytica</i> : 4,5%
Marques et al, 2005	Concórdia, SC	9.024 laudos Ano: 2000 Ano: 2001 Ano: 2002	12,6% de positividade 14,5% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 21,3% <i>S. stercoralis</i> : 17,6% <i>G. lamblia</i> : 15,9% 11,6% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 23,7% <i>S. stercoralis</i> : 17,0% <i>G. lamblia</i> : 15,2% 6,7% de positividade <i>S. stercoralis</i> : 28,3% <i>E. coli</i> : 18,3%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
Nascimento & Monteiro, 2005	Pitanga, PR	181 habitantes	70,7% de positividade <i>E. nana</i> : 33,7% <i>B. hominis</i> : 26,5% <i>G. lamblia</i> : 18,2% <i>E. coli</i> : 17,1% <i>A. lumbricoides</i> : 16,6% <i>I. butschlii</i> : 9,4% Ancilostomideo: 7,7%
Nolla & Cantos, 2005	Florianópolis, SC	238 manipuladores de alimentos	42,85% de positividade
Santos et al, 2005	Campinas, SP	Tratamento de esgoto Clarificação com éter Flutuação em sacarose	Método de concentração <i>Giardia</i> sp: 54,5% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 9,6% <i>Giardia</i> sp: 10,5% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 3,2%
Silva CV et al, 2005	Uberlândia, MG	100 pacientes HIV+ 85 pacientes controle	27% de positividade <i>S. stercoralis</i> : 12% <i>I. belli</i> : 7% <i>Cryptosporidium</i> sp: 4% Ancilostomideo: 4% 17,6% de positividade <i>S. stercoralis</i> : 7,1% <i>G. lamblia</i> : 3,5% Ancilostomideo: 7,1%
Tashima & Simões, 2005	Presidente Prudente, SP	1000 crianças de 0-12 anos	21,3% de positividade <i>G. lamblia</i> : 7,3%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
			<i>E. coli</i> : 3,9% <i>E. vermicularis</i> : 1,9% <i>H. nana</i> : 0,5%
Brito et al, 2006	Jequié, BA	1709 crianças zona rural	Ancilostomideo: 15,7% <i>T. trichiura</i> : 74,8% <i>A. lumbricoides</i> : 63,0% <i>S. mansoni</i> : 44,5%
Brooker et al, 2006	Americaninhas, MG	1249 habitantes de 0 a 86 anos de idade	81,9% de positividade Ancilostomideo: 66,9% <i>A. lumbricoides</i> : 48,8% <i>S. mansoni</i> : 48,8%
Bushen et al, 2007	Fortaleza, PE	58 crianças	PCR: 42 (72,4%) <i>C. hominis</i> : 57% (24/42) <i>C. parvum</i> : 43% (18/42)
Carvalho-Almeida et al, 2006	São Paulo, SP	64 crianças de creche, ≤ 7 anos 23 adultos	<i>Cryptosporidium</i> spp.: 20,3% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 4,3%
Carvalho et al, 2006	Botucatu, SP	279 crianças de creche	53,4% de positividade <i>A. lumbricoides</i> : 6,09% <i>T. trichiuris</i> : 5,73% <i>S. stercoralis</i> : 0,72% <i>E. vermicularis</i> : 10,04% <i>H. nana</i> : 1,08% <i>G. lamblia</i> : 26,88% <i>B. hominis</i> : 14,34%

REFERÊNCIA	LOCAL	POPULAÇÃO ESTUDADA	OCORRÊNCIA
			<i>E. coli</i> : 6,81% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 15,05% <i>E. nana</i> : 2,15%
Cantusio Neto et al, 2006	Campinas, SP	Estação de tratamento de lodo ativado (Samambaia) Influente Efluente tratado Efluente tratado com UV	<i>Giardia</i> sp: 98,9% (redução) <i>Cryptosporidium</i> spp.: 99,7% (redução) <i>Giardia</i> sp: + (3/3) <i>Cryptosporidium</i> spp.: + (2/3) <i>Giardia</i> sp: + (3/3) <i>Cryptosporidium</i> spp.: - (0/3) <i>Giardia</i> sp: + (3/3) <i>Cryptosporidium</i> spp.: + (1/3)
Gonçalves et al, 2006	São Paulo, SP	29 crianças	PCR: 29 <i>C. hominis</i> (ML I): 100%
Lallo et al, 2006	São Paulo, SP	450 cães 200 de hospital veterinário 250 de canis particulares	PCR: <i>C. parvum</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.: 11,5% <i>Cryptosporidium</i> spp.: 8,0%
Teixeira & Heller, 2006	Juiz de Fora, MG	753 crianças de 1-5 anos 29 áreas municipais	42,36% de positividade para parasitos (fecal-oral)

ANEXO B: FICHA COLETA DE DADOS

[illegible]

* = nº, nome, RGHC, raça, estado civil, ocupação, endereço, data de coleta

**= 1 (líquida); 2 (pastosa); 3 (formada)

***= 1(*B. hominis*); 2(*Microsporidio*); 3(*Sarcocystis* sp); 4(*C. cayetanensis*); 5 (*I. belli*); 6(*Cryptosporidium* spp.)

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Abreu VJS. Avaliação da eficácia do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvum* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.

Agnew DG, Lima AA, Newman RD, Wuhib T, Moore RD, Guerrant RL, Sears CL. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increased diarrhea morbidity. J Infect Dis. 1998;177(3):754-60.

Alves JR, Macedo HW, Ramos NA Jr, Ferreira LF, Gonçalves ML, Araújo A. Intestinal parasite infections in a semiarid area of Northeast Brazil: preliminary findings differ from expected prevalences rates. Cad Saude Publica. 2003;19(2):667-70.

Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle and zôo ruminants in Portugal. J Clin Microbiol. 2003;41(6):2744-7.

Amadi B, Mwiya M, Musuku J, Watuka A, Sianongo S, Ayoub A, Kelly P. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomized controlled trial. Lancet. 2002;360(9343):1375-80.

Amar CF, Dear PH, McLauchlin J. Detection and indentification by real time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. Lett Appl Microbiol. 2004;38(3):217-22.

Araujo AJUS. Estudo da ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) entre crianças do município de Taubaté-SP e caracterização genotípica de isolados clínicos do parasita [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2004.

Araújo CF, Fernandez CL. Prevalence of intestinal parasitosis in the city of Eirunepe, Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(1):69.

Araújo RS, Carvalho RTT, Matte GR, Fernandes LN, Balsalobre LC, Matte MH. Modified method for detection of *Cryptosporidium* oocysts using DNA templates extracted from environmental samples. Rev Vigil San. In press 2006.

Arcoverde CAC. Enteroparasitoses em pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2001.

Awasthi S, Bundy DAP, Savioli L. Helminthic infections. Clinical review. BMJ. 2003;327(7412):431-3.

Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. Lancet. 2002;359(9306):564-71.

Bialek R, Binder N, Dietz K, Joachim A, Knobloch J, Zelck UE. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. Diagn Micr Infec Dis. 2002;43:283-8.

Bornay_Llinares FJ, da Silva AJ, Moura INS, Myjak P, Pietkiewicz H, Krumininis-Lozowska W, Graczyck TK, Pieniazek NJ. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. Appl Environ Microbiol. 1999;65(4):1455-8.

Botero JH, Castaño A, Montoya MN, Ocampo NE, Hurtado MI, Lopera MM. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestation. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2003;45(4):197-200.

Bowman DD. What's in a name? Trends Parasitol. 2005;21(6):267-9.

Brantley RK, Williams KR, Silva TMJ, Siström M, Thielman NM, Ward H, Lima AAM, Guerrant RL. AIDS-associated diarrhea and wasting in northeast Brazil is associated with subtherapeutic plasma levels of antiretroviral medications and with both bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum*. *Braz J Infect Dis*. 2003;7(1):16-22.

Brasil. Ministério da Saúde – MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses, Brasília, DF; 2005a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral da Vigilância em Saúde Ambiental. Comentários sobre a Portaria MS nº 518/2004: subsídios para implementação / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral da Vigilância em Saúde Ambiental. Brasília: Ministério da Saúde; 2005b.

Brasil. Ministério da Saúde - Norma Operacional da Assistência à Saúde NOAS-SUS 01/2002, Portaria nº 373, de 27 de fevereiro de 2002.

Brito LL, Barreto ML, Silva R de C, Assis AM, Reis MG, Parraja I, Blanton RE. Risk factors for iron-deficiency anemia in children and adolescents helminthic infections. *Rev Panam Salud Publica*. 2003;14(6):422-31.

Brooker S, Alexander N, Geiger S, Moyeed RA, Stander J, Fleming F, Hotez PJ, Correa-Oliveira R, Bethony J. Contrasting patterns in the small-scale heterogeneity of human helminth infections in urban and rural environments in Brazil. *Int J Parasitol*. 2006;36(10-11):1143-51.

Bundy D, Sher A, Michael E. Good worms or bad worms: do worm infections affect the epidemiological patterns of others diseases. *Parasitol Today*. 2000;16(7):273-4.

Bushen OY, Kohli A, Pinkerton RC, Dupnik K, Newman RD, Sears CL, Fayer R, Lima AAM, Guerrant RL. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(4):378-84.

Bushen OY, Davenport JA, Lima AB, Piscitelli SC, Uzgis AJ, Silva TM, Leite R, Kosek M, Dillingham RA, Girao A, Lima AA, Guerrant RL. Diarrhea and reduced level of antiretroviral drugs: improvement with glutamine or alanyl-glutamine in a randomized controlled trial a northeast Brazil. *Clin Infect Dis*. 2004;38(2):1764-70.

Caccio SM, Pozio E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006;4(3):429-43.

Cacciò SM. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*. 2005a;47(2):185-92.

Cacciò SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*. 2005b;21(9):430-7.

Caccio SM. Molecular techniques to detect and identify protozoan parasites in the environment. *Acta Microbiol Pol*. 2003;52(S):23-4.

Cacciò S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*. 2000;120:237-44.

Calderaro A, Gorrini C, Bommezzadri S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100(5):450-7.

Cantalice Neto AF, Zim MCA, Machado RS, Fratini FG, Silva AP. Criptosporidiose e diarréia persistente. *J. Pediat*. 1998;74:143-8.

Capuano DM, Okino MHT, Bettini MJCB, Takayanagui OM, Lazzarini MPT, Castro e Silva AAMC, Ferreira FLF, Takayanagui AMM. Active surveillance of taeniasis and other enteroparasitoses among food handlers in Ribeirão Preto, SP, Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2002;61(1):33-8.

Capuano DM, Okino MHT, Bettini MJCB. Frequency of *Cryptosporidium* sp and *Isospora belli* in HIV seropositive patients in the region of Ribeirão Preto, SP, Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2001;60(1):11-5.

Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res*. 2004;38:818-62.

Carneiro FF, Cifuentes E, Tellez-Rojo MM, Romieu I. The risk of *Ascaris lumbricoides* infection in children as an enviromental health indicator to guide preventive activities in Caparaó and Alto Caparaó, Brazil. *B World Health Organ Genebra*. 2002;80(1):40-6.

Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res*. 1999;85(11):899-904.

Carvalho-Almeida TT. Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase) [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2004.

Carvalho-Almeida TT, Casimiro AM, Matté GV, Matté MH. An improved method for extracting *Cryptosporidium* sp. DNA from preserved faeces and potential application for cryptosporidiosis surveillance. REVISA. 2005;1(3):208-214.

Carvalho TB, Carvalho LR, Mascarini LM. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2006;48(5):269-73.

Casemore DP. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. Epidemiol Infect. 1990;104(1):1-28.

Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J Clin Pathol. 1985;38(1):1337-41.

Castilho VLP. Laboratórios de Parasitologia Clínica na cidade de São Paulo: análise de fatores que influenciam seu desempenho [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.

Chalmers RM, Ferguson C, Caccio S, Gasser RB, Abs EL-Osta YG, Heijnen L, Xiao L, Elwin K, Hadfield S, Sinclair M, Stevens M. Direct comparison of selected methods for genetic categorization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. Int J Parasitol. 2005;35:397-410.

Chieffi PP, Paschoalotti MA, Vergueiro CS, Chiattoni CS. Infection by *Cryptosporidium* sp. in immunocompromised haematological patients. Rev Inst Med Trop S. Paulo. 2005;47(5):301-2.

Chieffi PP, Sens YA, Paschoalotti MA, Miorin LA, Silva HG, Jabur P. Infection by *Cryptosporidium parvum* in renal patients submitted to renal transplant or hemodialysis. Rev Soc Bras Med Trop. 1990;31(4):333-7.

Cimerman S, Castañedo CG, Iuliano WA, Palacios R. Profile of intestinal parasitosis diagnosed in HIV infected patients in the HAART era at a reference center in São Paulo, Brazil. Parasitol Latinoam. 2002;57(3-4):111-9.

Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Evaluation of the relationship between of intestinal parasitoses and risk factors for HIV infection in AIDS patients. Rev Soc Bras Med Trop. 1999a;32(2):181-5.

Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. Int J Infect Dis. 1999b;3(4):203-6.

Clemente CM, Caramori CA, Padula P, Rodrigues MAM. Gastric cryptosporidiosis as a clue for the diagnosis of the acquired immunodeficiency syndrome. Arq Gastroenterol. 2000;37(3):180-2.

Colley DG. Parasitic diseases: opportunities and challenges in the 21st century. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(supl 1):79-87.

Corso OS, Kramer MH, Blair KA, Addiss DG, Davis JP, Haddix AC. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. Emerg Infect Dis. 2003;9(4):426-31.

Costa-Cruz JM, Cardoso ML, Marques DE. Intestinal parasites in school food handlers in the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1995;37(3):191-6.

Costa-Macedo LM, Rey L. Maternal and child intestinal parasitism and breast - feeding. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(4):371-5.

Costa-Macedo, LM; Rey, L. Frequency e precocity of human intestinal parasitism in a group of infants from Rio de Janeiro, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1997;39:305-6.

Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium* and Identification to the Species Level by Nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism. JCM. 2005;3(43):1017-23.

Cox MJ, Elwin K, Massad E, Azevedo RS. Age-specific seroprevalence to an immunodominant *Cryptosporidium* sporozoite antigen in a Brazilian population. Epidemiol Infect. 2005;133(5):951-6.

Current WL, Garcia L. Cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev. 1991;4(3):325-58.

Curry A, Smith HV. Emerging pathogens: *Isospora*, *Cyclospora* and microsporidia. Parasitology. 1988;117(S):147-59.

da Costa- Macedo LM, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R, Oliveira LM, Vianna MS. Intestinal parasitoses in preschool children of the slum

communities of the city of Rio de Janeiro, Brasil. Cad Saude Publica. 1998;14(4):851-5.

Dall'Olio AJ, Franco RMB. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in small wildlife mammals from three mountainous areas in the Brazilian Southeastern region. Arq Bras Med Vet Zootec. 2004;56(1):25-31.

da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Moura INS, Slemenda SB, Tuttle JL, Pieniazek NJ. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. Mol Diag. 1999;4(1):57-64.

da Silva GAP, Magalhães M, Oliveira AMA, Melo VM. Diarréia aguda do lactente associada ao *Cryptosporidium* sp., na cidade de Recife. J. Pediat. 1994;70:44-7

Das P, Roy SS, MitraDhar K, Dutta P, Bhattacharya MK, Sen A, Ganguly S, Bhattacharya SK, Lal AA, Xiao L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp from children in Kolkata, Índia. J Clin Microbiol. 2006;44(11):4246-9.

De Carli GA. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas. 1a ed. São Paulo: Atheneu; 2001:301-2.

Devera R, Cermeño JR, Blanco Y, Morales MCB, Guerra X, Sousa M, Maitan E. Prevalence of blastocistosis and others intestinal parasitoses in a rural community from Anzoátegui state, Venezuela. *Parasitol Latinoam.* 2003;58:95-100.

Dias Junior O. Ocorrência de cistos de *Giardia* sp e oocistos de *Cryptosporidium* sp em águas superficiais e esgoto do município de Araras-São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade Presbiteriana Mackenzie;1999.

Dias RM, Mangini AC, Torres DM, Correa MO, Lupetti N, Correa FM. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in the county of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1988;30(4):310-2

Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect.* 2002;4:1059–66.

Dorea RC, Salata E, Padovani CR, dos Anjos CL. Control of parasitic infections among school children in the periurban área of Botucatu, São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Tropl.* 1996;29(5):425-30.

Egyed Z, Sréter T, Széll Z, Varga I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. – recent developments and future needs. Vet Parasitol. 2003;111:103-14.

Espindola RS. Impactos dos sistemas de saneamento “in situ” nas águas subterrâneas, município de Itaquaquecetuba (SP) [dissertação]. São Paulo: Instituto de Geociências Universidade de São Paulo; 2001.

Fall A, Thompson RC, Hobbs RP, Morgan-Ryan U. Morphology is not a reliable tool for delineating within *Cryptosporidium*. J Parasitol. 2003;89(2):399-402.

Farias EWC, Gamba RC & Pellizari VH. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. Braz J Microbiol. 2002;33(1):41-3.

Faust EC; Sawitz W; Tobie J; Odom V; Peres C; Lincicome DR. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. J Parasitol. 1939;25:241–62.

Fayer R, Santin M, Xiao L. *Cryptosporidium* bovis n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). J Parasitol. 2005;91(3):624-9.

Fayer, R; Morgan, U; Upton S. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol. 2000;30(12-13):1305-22.

Fayer R, Ungar BLP. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. Microbiol Rev. 1986;50(4):458-83.

Feitosa G, Bandeira AC, Sampaio DP, Badaró R, Brites C. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. Braz J Infect Dis. 2001;5(6):339-44.

Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, McEvoy JM. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp in Wisconsin. J Clin Microbiol. 2006;44(12):4303-8.

Feng X, Rich SM, Akyoshi D, Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Tzipori S, Widmer G. Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. Appl Environ Microbiol. 2000;66(8):3344-9.

Ferrari JO, Ferreira MU, Camargo LM, Ferreira CS. Intestinal parasites among Karitiana Indians from Rondônia State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1992;34(3):323-5.

Ferreira CB, Marçal Junior O. Intestinal parasitoses in schoolchildren of Martinesia District, Uberlândia, Minas Gerais: pilot study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30(5):373-7.

Ferreira, CS; Ferreira, MU; Nogueira, MR. The prevalence of infection by intestinal parasites in an urban slum in São Paulo, Brazil. *J Trop Med Hyg.* 1994;97(2):121-7.

Ferreira CS, Camargo LM, Martinho ML, de Azevedo RA. Intestinal parasites em Iaulapiti Indians from Xingu Park, Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86(4):441-2.

Ferreira MR, Souza W, Perez EP, Lapa T, Carvalho AB, Furtado A, Coutinho HB, Wakelin D. Intestinal helminthiasis and anaemia in youngsters from Matriz da Luz, district of São Lourenço da Mata, state of Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(3):289-93.

Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(4):443-57.

Ferreira MU, Ferreira CS, Monteiro CA. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). Rev Saude Publica. 2000;34(6):73-82.

Ferreira P, Lima MR, Oliveira FB, Pereira ML, Ramos LB, Marçal MG, Costa-Cruz JM. Occurrence of intestinal parasites and comensal organisms among schoolchildren living in a "landless farm Workers" settlement in Campo Florido, Minas Gerais, State Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(1):109-11.

Franco RM, Cantusio Neto R. Occurrence of cryptosporidial oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(2):205-7.

Franco RMB, Rocha-Eberhardt R & Cantusio Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2001;42(2):109-11.

Franco RM, Cordeiro NS. Giardiasis and cryptosporidiosis in child care settings in the municipality of Campinas, São Paulo state. Rev Soc Bras Med Trop. 1996;29(6):585-91.

Fundação Faculdade de Medicina. Hospital das Clínicas reformula atendimento ambulatorial. Jornal da FFM. 2004; ano III (11):6.

Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. Doenças Infecciosas e Parasitárias. Aspectos Clínicos, Vigilância Epidemiológica e Medidas de Controle. 2000;21-22.

Gamba RC, Ciapina EM, Espindola RS, Pacheco A, Pellizari VH. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo-Brazil. Braz J Microbiol. 2000;31:151-3.

Garcia LS, Shimizu RY, Novak S, Carol M, Chan F. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigen in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. J Clin Microbiol. 2003;41(1):209-12.

Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kit (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J Clin Microbiol. 1997;35(6):1526-9.

Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. J Clin Microbiol. 1983;18:185-90.

Gatei W, Greesill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA, Beeching NJ, Hart CA. Molecular analysis of the 18 SrRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infection living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1458-62.

Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, Gatika SM, Kamwathi SK, Revathi G, Hart CA. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. Am J Trop Med Hyg. 2006;75(1):78-82.

Gennari-Cardoso ML, Costa-Cruz JM, de Castro E, Lima LM, Prudente DV. *Cryptosporidium* sp in children suffering from acute diarrhea at Uberlandia City, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91(5):551-4.

Gioia I. The prevalence of intestinal parasitoses – among the users of the Health Center of Sousa District, Campinas, São Paulo (1986-1990). Rev Soc Bras Med Trop. 1992;25(3):177-82.

Giraldi N, Vidotto O, Navarro IT, Garcia J. Enteroparasites prevalence among daycare and elementary school children of municipal schools, Rolândia, PR, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(4):385-7.

Gomes AH. Estudo comparativo entre métodos morfológico, imunológico e molecular aplicados ao diagnóstico da criptosporidiose em amostras fecais de pacientes portadores de HIV e AIDS [dissertação]. São Paulo: Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde; 2003.

Gomes TC, Almeida MF, Miura LA, Granja J, Santos DV, Oliveira RM, Lopes A, Sequeira BP, Rolemberg AA, Moraes AL, Santos CS. Intestinal helminthiasis in street population of Rio de Janeiro city. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35(5):531-2.

Gonçalves EMN. *Cryptosporidium parvum*: avaliação de métodos diagnósticos e aspectos epidemiológicos [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, USP; 2002.

Gonçalves EMN; Cunha AGJ; Orban M; Santos WR; Castilho VLP; Corbett CEP. Incidência de enteroparasitoses em Itanhomi – MG. Tema livre. In: 37o. Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial; de

24 a 27 de setembro de 2003; Rio de Janeiro - RJ. Anais. Rio de Janeiro; 2003, res 333;p.176.

Gonçalves EMN, Uemura IH, Castilho VLP, Corbett CEP. Retrospective study of the occurrence of *Cyclospora cayetanensis* at Clinical Hospital of the University of São Paulo Medical School, SP, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2005a;38(4):326-30.

Gonçalves EMN, Orban M, Uemura IH, Santos WR, Castilho VLP, Corbett CEP. Ocorrência de enteroparasitas em Serra dos Aimorés, Minas Gerais, Brasil [CD-ROOM]. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia; 1 a 4 de novembro de 2005; Porto Alegre, RS, Brasil; 2005b.

Gonçalves EMN, da Silva AJ, Eduardo MB, Uemura IH, Moura IN, Castilho VLP, Corbett CEP. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. Clinics. 2006a;61(2):119-26.

Gonçalves EMN, Uemura IH, Orban M, Castilho VLP, Corbett CEP. Microsporidiosis in a Brazilian University Hospital: case report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006b;48(6):351-2.

Goodgame RW. Understanding intestinal spore – forming protozoa: *Cryptosporidia*, *Microsporidia*, *Isospora* and *Cyclospora*. Ann Intern Med. 1996;124(4):429-41.

Gracenea M, Gomez MS, Torres J, Carne E, Fernandez-Moran J. Transmission dynamics of *Cryptosporidium* in primates and herbivores at the Barcelona zoo: a long-term study. Vet Parasitol. 2002;104(1):19-26.

Graczyk TK, Shiff CK, Tamang L, Munsaka F, Beitin AM, Moss WJ. The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. Parasitol Res. 2005;9(1):38-43.

Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, da Silva AJ, Pieniazek NJ, Beal DA. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent *in situ* hybridization and a monoclonal antibody. Am J Med Hyg. 2003;68(2):228-32.

Grisi SJFE. Contribuição ao estudo da doença diarreica aguda em crianças com idade inferior a 5 anos e recuperação fecal de *Cryptosporidium* sp [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1993.

Gross, R; Schell, B; Molina, MCB; Leão, MAC; Strack, U. The impact of improvement of water supply and sanitation facilities on diarrhea and intestinal parasites: a Brazilian experience with children in two low-income urban communities. *Rev Saude Publica* 1989;23:214-20.

Guerra EM, Vaz AJ, de Toledo LA, Quadros CM, Dias RM, Barreto OC. Helminth and protozoan intestinal infectiona in pregnant women in their firstly consultation at Health Centers of the State in the Butantã Subdistrict, São Paulo city. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991;3(4):303-8.

Guimarães RB. Health regions and geographic scales. *Cad Saúde Publica*. 2005;21(4):1017-25.

Guizelini E, Amato Neto V. Isolation of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in loose stools of patients with AIDS and of immunocompetent children and adults in São Paulo, Brazil. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*; 1992;47(3):150-2.

Guk SM, Park YK, Oh MD, Choe KW, Kim JL, Choi MH, Hong ST, Chai JY. Parasitic infections in HIV-infected patients who visited Seoul National University Hospital during the period 1995-2003. *Korean J Parasitol*. 2005;43(1):1-5.

Gurgel RQ, Cardoso GS, Silva AM, Santos LN, Oliveira RCV. Children day care center: exposition or protection environment to intestinal parasites infestation in Aracajú, SE. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(3):267-9.

Hachich EM, Sato MI, Galvani AT, Menegon JR, Mucci JL. . *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. Water Sci Technol. 2004;50(1):239-45.

Hachich EM. Avaliação da presença dos protozoários *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em águas captadas para consumo humano no Estado de São Paulo [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo; 2002.

Hashim A, Mulcahy G, Bourke B, Clyne M. Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. Infect Immun. 2006;74(1):99-107.

Health Canada - Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation - Protozoa: *Giardia* and *Cryptosporidium*. Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario. 2004.

Heller L, Bastos RKX, Vieira MBCM, Bevilacqua PD, Brito LLA, Mota Smm, Oliveira AA, Machado PM, Salvador DP, Cardoso AB. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidem Serviços Saúde*. 2004;13(2):79-92.

Higgins JA, Jenkins MC, Shelton DR, Fayer R, Karns JS. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(11):5321-4.

Hijawi NS, Meloni BP, Ng'anzo, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RCA. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol*. 2004;34:769-77.

Hlavsa MC; Watson JC; Beach JB. Cryptosporidiosis Surveillance – United State, 2002. *MMWR Surveill Summ*. 2005;54(1):1-8.

Hoffman WA; Pons JA; Janer JL. The sedimentation – concentration method in shistomiasis mansonii. Puerto Rico. *J Public Health*. 1934;9:281-98.

Hospital das Clínicas. 2006 [citado em 23 de novembro de 2006]. Disponível em:

<http://www.ichc.hcnet.usp.br/default.aspx?pagid=FRGCRKVJ&navid=129>

Houpt ER, Bushen OU, Sam NE, Kohli A, Asgharpour A, Ng CT, Calfee DP, Guerrant RL, MaroV, Ole-Nguyaine S, Shao JF. Short report: asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. Am J Trop Med Hyg. 2005;73(3):520-2.

Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Syed Q, Verlander NQ, Chalmers RM, Morgan K, Nichols G, Beeching N, Osborn K. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. Emerg Infect Dis. 2004a;10(7):1241-9.

Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Raj N, Syed O, Chalmers RM, Verlander NQ, Goodacre J. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. Clin Infect Dis. 2004b;39:504-510.

Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev. 2002;15(1):145-54.

Iacovski RB, Barardi CR, Simões CM. Detection and enumeration of *Cryptosporidium* sp. oocysts in sewage sludge samples from the city of Florianopolis (Brazil) by using immunomagnetic separation combined with indirect immunofluorescence assay. Waste Manag Res. 2004;22(3):171-6.

- Ikeh EI, Obadofin MO, Brindeiro B, Baugher C, Frost F, Vanderjagt D, Glew RH. Intestinal parasitism in rural and urban areas of North Central Nigeria: an update. The Internet Journal of Microbiology. 2006;2(1). [citado 22 nov 2006]. Disponível em:
<http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlPrinter=true&xmlFilePath=journals/ijmb/vol2n1/parasites.xml>.
- Jiang J, Alderisio KA, Xiao L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. Appl Environ Microbiol. 2005;71(8):4446-54.
- Jiang J, Xiao L. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. J Eukaryot Microbiol. 2003;50(S):542-7.
- Joachim A. Human cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2004;51(6):251-9.
- Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. Appl Environ Microbiol. 1995;61(11):3849-85.

Jongwutiwes S, Tiangtip R, Yentakarm S, Chantachum N. Simple method for long-term copro-preservation of *Cryptosporidium* oocysts for morphometric and molecular analysis. Trop Med Int Health. 2002;7(3):257-64.

Katsumata T, Hosea D, Ranuh IG, Uga S, Yanagi T, Kohno S. Short Report: Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. Am J Trop Med Hyg. 2000;62(1):70-2.

Kobayashi J, Hasegawa H, Forli AA, Nishimura NF, Yamanaka A, Shimabukuro T, Sato Y. Prevalence of intestinal parasite infection in five farms in Holambra, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1995;37(1):13-8.

Koonjul PK, Brandt WF, Farrant JM, Lindsey GG. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. Nucleic Acids Res. 1999;27(3):915-6.

Kosek M, Alcantara G, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: an update Lancet Infect Dis. 2001;1(4):262-9.

- Lallo MA, Bondan EF. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in institutionalized dogs in the city of São Paulo, Brazil. Rev Saude Publica. 2006;40(1):120-5.
- Lantz PG, Matsson M, Wadstrom T, Radstrom P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. J Microbiol Methods. 1997;28(3):159-67.
- Leander B S, Clopton RE, Keeling PJ. Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and β -tubulin. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53(Pt 1):345-54.
- Leav BA, Mackay M, Ward HD. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. Clin Infect Dis. 2003;36(7):903-8.
- Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Diaz S, McLauchlin J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. J Med Microbiol. 2006;55(Pt 6):703-7.
- Lima AA, Moore SR, Barboza MS, Soares AM, Schleupner MA, Newman RD, sears CL, Nataro JP, Fedorko DP, Wuhib T, Schorling JB, Guerrant RL. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea

burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. J Infect Dis. 2000;181(5):1643-51.

Lima AA, Fang G, Schorling JB, de Albuquerque L, meauliffe JF, Mota S, Leite R, Guerrant RL. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. Acta Paediatr, 1992;81(381):39-44.

Lima EC, Stamford TLM. *Cryptosporidium* spp. in aquatic environment: the principal aspects of dissemination and diagnostic methods. Ciênc. Saúde Coletiva. 2003;8(3):791-800.

Limor JR, Lal AA, Xiao L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-Time PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2335-8.

Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. J Eukaryot Microbiol. 2000;47(1):91-5.

Lomazi EA; Collares EF; Viccari MS; Castro AFP. Identification of enteropathogenic agents in the feces of children with acute diarrhea in the municipality of Paulinia-SP. J Pediatr (Rio J). 1993;69(3):159-64.

Loureiro EC, Linhares AC, Mata L. Cryptosporidiosis in children from 1 to 2 years of age, with acute diarrhea in Belém, Para, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84(1):117-22.

Ludwig KM, Frei F, Álvares Filho F, Ribeiro-Paes JT. Correlation between sanitation conditions and intestinal parasitoses in the population of Assis, state of São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(5):547-55.

Machado ER, Costa-Cruz JM. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(2):161-4.

Machado RC, Marcari EL, Cristante SFV, Cacareto CMA. Giardiasis and helminthiasis in children of both public and private day-care centers and junior and high school in the city of Mirassol, São Paulo State, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(6):697-704.

Machado RLD, Figueiredo MC, Frade AF, Kudo ME, Silva Filho MG, Pova MM. Evaluation of four techniques for diagnosis of *Giardia lamblia* in children's stool from Belém city, Para State, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(1):91-3.

Magi B, Canocchi V, Tordini G, Cellesi C, Barberi A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitol Res.* 2006;98:150-2.

Mangini AC, Dias RM, Grisi SJ, Escobar AM, Torres DM, Zuba IP, Quadros CM, Chieffi PP. *Cryptosporidium* parasitism in children with acute diarrhea. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1992;34(4):341-5.

Marques SMT, Bandeira C, Quadros RM. Prevalence of enteroparasites in inhabitants of Concórdia, Santa Catarina, Brazil. *Parasitol Latinoam.* 2005;60(1-2):78-81.

McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Diaz S, Nichols GL. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):3984-90.

Medeiros MI; Neme SN; da Silva P; Capuano DM; Errera MC; Fernandes SA; do Valle GR; de Avila FA. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto - SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2001;43(1):21-4.

Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. 1976;70(6):1151-60.

Mehta P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J Postgrad Med*. 2002;48:217.

Melo MCB, Klem VGQ, Mota JAC, Penna FJ. Parasitoses intestinais. *Rev Med Minas Gerais*. 2004;14(1S1):3-12.

Miller WA, Miller MA, Gardner IA, Atwill ER, Harris M, Ames J, Jessup D, Melli A, Paradies D, Worcester K, Olin P, Barnes N, Conrad PA. New genotypes and factors associated with *Cryptosporidium* detection in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast. *Inter J Parasitol*. 2005;35:1103-13.

Miranda R dos A, Xavier FB, Menezes RC. Intestinal parasitism in a Parakana indigeous community in southwestern Para State, Brazil. *Cader Saúde Pública*. 1998;14(3):507-11.

Miranda R dos A, Xavier FB, Nascimento JR, de Menezes RC. The prevalence of intestinal parasitism in native villages of the Tembe tribe, the Brazilian Eastern Amazons. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(4):389-93.

Moitinho MLR, Roberto ACBS, Martins MR. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp. em fezes diarréicas de crianças do Município de Maringá, PR. Acta Bioquim Clin Lat-Amer. 1999;33:249-53.

Monis PT, Thompson RCA. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? Infect Genet Evol. 2003;3:233-44.

Monteiro CA, Chieffi PP, Benicio MH, Dias RM, Torres DM, Mangini AC. Health conditions of children of the municipality of Sao Paulo (Brazil), 1984/1985. VII – Intestinal parasitosis. Rev Saude Publica. 1988;22(1):8-15.

Monteiro CA, Zuñiga HPP, Benício MHDA, Szarfacs SC. A study of children's health in São Paulo (Brazil), 1984/1985, I – Methodological aspects, socioeconomic characteristics and physical environment. Rev Saude Publica. 1986;20(6):435-45.

Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson RC, Olson M, Lal A, Xiao L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(6):433-40.

Morgan UM, Xiao L, Monis P, Sulaiman I, Pavlasek I, Blagburn B, Olson M, Upton SJ, Khramtsov NV, Lal AA, Elliot A, Thompson RCA. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. Parasitology. 2000;120:457-64.

Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson CA. Comparison of PCR na microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. J Clin Microbiol. 1998a;36(4):995-8.

Morgan UM, Thompson RC. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? Parasitol Today. 1998b;14(6):241-5.

Morgan UM, O'Brien PA, Thompson RC. The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD-PCR. Mol Biochem Parasitol. 1996;77(1):103-8.

Morrone FB, Carneiro JA, dos Reis C, Cardozo CM, Ubal C, de Carli GA. Study of enteroparasitoses infection frequency and chemotherapeutic agents used in pediatric patients in a community living in Porto Alegre, RS, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004;46(2):77-80.

Morse TD, Nichols RA, Grimason AM, Campbell BM, Tembo KC, Smith HV. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiol Infect.* 2007. [citado 17 jan. 2007]. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=644820>.

Moura H, Oliveira LM. *Cryptosporidium*: parasita de imunocomprometidos. *Rev. Bras. Patol. Clín.* 1985;21:198-202.

Moura H, Fernandes O, Viola JP, Silva SP, Passos RH, Lima DB. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989;84(4):527-33.

Muller APB. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.

Muniz-Junqueira MI, Queiroz EF. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(2):133-41.

Muniz PT, Ferreira MU, Ferreira CS, Conde WL, Monteiro CA. Intestinal parasitic infections in young children in São Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and associations with physical growth. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002;96(2):503-12.

Muthusamy D, Rao SS, Ramani S, Monica B, Banerjee I, Abraham OC, Mathai DC, Primrose B, Muliyl J, Wanke CA, Ward HD, Kang G. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):632-4.

Nascimento SA, Moitinho MLR. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga City, Parana State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005;47(4):213-7.

Neira-Otero P, Munoz-Saldias N, Sanchez-Moreno M, Rosales-Lombardo MJ. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile. *Parasitol Res*. 2005;97(1):63-7.

Neto RC, Santos JU, Franco RM. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. *Water Sci Technol*. 2006;54(3):89-94.

Newman RD, Sears CL, Moore SR, Nataro JP, Wuhib T, Agnew DA, Guerrant RL, Lima AAM. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in Northeastern Brazil. J Infect Dis. 1999;180:167-75.

Newman RD, Zu SX, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. Ann Intern Med. 1994;120(6):500-5.

Newman RD, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1993;49:270-5.

Nichols RAB, Campbell BM, Smith HV. Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during water monitoring. Appl Environ Microbiol. 2006a;72(8):5428-35.

Nichols RAB, Moore JE, Smith HV. A rapid method for extracting oocyst DNA from *Cryptosporidium*-positive human faeces for outbreak investigations. J Microbiol Methods. 2006b;65:512-24.

Niehaus MD, Moore SR, Patrick PD, Derr LL, Lorntz B, Lima AA, Guerrant RL. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive

function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(5):590-3.

Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology.* 1976;70(4):592-8.

Nolla AC, Cantos GA. Relationship between intestinal parasites in food handlers and epidemiological factors in the city of Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2005;21(2):641-5.

Nsubuga AM, Robbins MM, Roeder AD, Morin PA, Boesch C, Vigilant L. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Mol Ecol.* 2004;13:2089-94.

Oliveira, FTC; Gonçalves, EMN; Castilho, VLP; Siqueira, FS; Fornabaio, TL; Uemura, IH; Corbett, CEP. Incidência de *Cryptosporidium spp* em um hospital de São Paulo, Brasil. Estudo retrospectivo. Tema livre. In: 36º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial. São Paulo, SP, 4 a 7 de setembro de 2002. *J Bras Pat Med Lab.* Rio de Janeiro, RJ. 2002;38(3):370.

Ortega YR, Liao J. Microwave inactivation of *Cyclospora cayetanensis* sporulation and viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J Food Prot. 2006;69(8):1957-60.

Ortega YR, Sheehy RR, Cama VA, Oishi KK, Sterling CR. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovine and human origin. J Protozool. 1991;38(6):40S-1S.

Oshiro ET, Dorval MEC, Nunes VLB, Silva MAA, Said LAM. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* among children of less than 5 years of age in the urban zone of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, 1996. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(3):277-80.

Palmieri F, Cicalini S, Froio N, Rizzi EB, Goletti D, Feata A, Macri G, Petrosillo N. Pulmonary cryptosporidiosis in an AIDS patient: successful treatment with paramomycin and azithromycin. Int J STD AIDS. 2005;16(7):515-7.

Pedraza-Diaz S, Amar C, Iversen AM, Stanley PJ, Mc Lauchlin J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* "dog type" from patients in England. J Med Microbiol. 2001;50:293-296.

Pedrazzani ES, Mello DA, Pripas S, Fucci M, Barbosa CAA, Santoro MCM. Intestinal helminthiasis. II - Prevalence, correlation with income, family size, anemia and nutritional status. Rev Saúde Pública. 1988;22(5):384-9.

Peng MM, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante AA, Weltman AC, Ong CSL, MacKenzie WR, Lal AA, Beard CB. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. Emerg Infect Dis. 1997;3(4):567-73.

Pereira MGC, Atwill ER, Barbosa AP, Almeida e Silva S, Garcia-Zapata MTA. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(6):787-93.

Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Moura INS, Arrowood MJ, Ditrich O, Addiss D. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. Emerg Infect Dis. 1999;3:444-9.

Piggott MP. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. Wildl Res. 2004;31:485-93.

Prado MS, Barreto ML, Strina A, Faria JAS, Nobre AA, Jesus SR. Prevalence and intensity of infection by intestinal parasites in school-aged

children in the City of Salvador (Bahia State, Brazil). Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(1):99-101.

Quadros RM, Marques S, Arruda AA, Delfos PS, Medeiros IA. Intestinal parasites in nursery schools of Lages, Southern Brazil. Microbes Infect. 2004;37(5):422-3.

Quiroz ES, Bern C, MacArthur JR; Fletcher M; Arrowood MJ; Shay DK; Levy ME; Glass RI; Lal A. An outbreak of cryptosporidiosis linked to a food handler. J Infect Dis. 2000;181(2):695-700.

Raccurt CP, Brasseur P, Verdier RI, Li X, Eyma E, Stockman CP, Agnamey P, Guyot K, Totet A, Liautaud B, Nevez G, Dei-Cas E, Pape JW. Human cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* spp. in Haiti. Trop Med Int Health. 2006;11(6):929-34.

Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes Infect. 2004;6:773-85.

Ramirez NE, Sreevatsan S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental. Vet Parasitol. 2006;136:201-13.

- Rezende CHA, Costa-Cruz J, Genari-Cardoso ML. Enteroparasites in food handlers in public schools. *Rev Panam Salud Publica*. 1977;2(6):392-7.
- Ribes JA, Seabolt JP, Overman SB. Point prevalence of *Cryptosporidium*, *Cyclospora* and *Isospora* infections in patients being evaluated for diarrhea. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(1):28-32.
- Rodrigues JL, Leser P, Silva TM, dos Santos MI, Dalboni MA, Acceturi CA, Castelo Filho A. Prevalence of cryptosporidiosis in diarrheic syndrome in HIV positive patients. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1991;37(2):79-84.
- Rosales MJ, Cordon GP, Moreno MS, Sanchez CM. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Trop*. 2005;9(1):74-8.
- Roy SL, DeLong SM, Stenzel AS, Shiferaw B, Roberts JM, Khalakdina A, Marcus R, Segler SD, Shah DD, Thomas S, Vugia DJ, Zansky SM, Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):2944-51.
- Rugai E; Mattos T; Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes – modificação do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1954;14:5-8.

Ryan UM, Xiao L, Read C, Sulaiman IM, Monis P, Lal AA, Fayer R, Pavlasek I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. J Parasitol. 2003;89(4):809-13.

Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, Read C, Buddle R, Robertson I, Zhou L, Thompson RC, Xiao L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J Parasitol. 2004;90(4):769-73.

Samie A, Bessong PO, Obi CL, Sevilleja JEAD, Stroup S, Houpt E, Guerrant RL. *Cryptosporidium* species: preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province, South África. Exp Parasitol. 2006;114:314-22.

Sandhu SK, Priest JW, Lammie PJ, Hubbard A, Colford Jr JM, Eisenberg NS. The natural history of antibody responses to *Cryptosporidium* parasites in men at high risk of HIV infection. J Infect Dis. 2006;194:1428-37.

Santana LR, Alencar MJM, Rouquayrol MZ. Intestinal polyparasitism and recidivous enteroparasitism in low age children. Rev Bras Anál Clín. 1994;26(2):50-2.

Santos LU, Bonatti TR, Cantusio Neto R, Franco RM. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005;46(6):309-13.

São Paulo: CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos. Dados Estatísticos (Tabelas). INFORMENET [online] 2006 [acessado em 03 de Novembro, 2006]. Avaliado no site. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm

São Paulo - Estado. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e Coordenadoria de Planejamento de Saúde. Planejamento de saúde: conhecimento & ações - Norma Operacional de Assistência à Saúde (NOAS). 2006 [citado 23 nov. 2006]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/portal/05e80ea7c89b06a700bf053f0391ea50.htm>.

São Paulo - Município. Prefeitura da cidade de São Paulo. Secretaria Municipal de Governo Municipal. Sumário de Dados. 2004 [citado 23 nov. 2006]. Disponível em: http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/governo/sumario_dados/0003.

Sauda FC, Zamarioli LA, Ebner Filho W, Mello L de B. Prevalence of *Cryptosporidium* sp and *Isospora belli* among Aids patients attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. J Parasitol. 1993;79(3):454-6.

Savioli L, Smith H, Thompson A. Giardia and *Cryptosporidium* join the Neglected Diseases Initiative. Trends Parasitol. 2006;22(5):203-8.

Savioli L, Bundy D, Tomkins A. Intestinal parasitic infections: a soluble public health problem. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86(4):353-4.

Sawaya AL, Amigo H, Sigulem D. The risk approach in preschool children suffering malnutrition and intestinal parasitic infection in the city of São Paulo, Brazil. Journal of Tropical Pediatrics. 1990;36(4):184-8.

Schlundt J, Toyofuku H, Jansen J, Herbst SA. Emerging food-borne zoonoses. Rev Sci Tech. 2004;23(2):513-33.

Schnack FJ, Fontana LM, Barbosa PR, Silva LSM, Baillargeon CMM, Barichello T, Póvoa MM, Cavasini CE, Machado RLD. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants (< 5 years old) in a population sample in Greater Metropolitan Criciúma, Santa Catarina state, Brazil. Cad Saude Publica. 2003;19(4):1205-8.

Scorza AV, Brewer MM, Lappin MR. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. J Parasitol. 2003;89(2):423-6.

Silva CV, Ferreira MS, Borges AS, Costa-Cruz JM. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. Scand J Infect Dis. 2005;37(3):211-5.

Silva S. Caracterização morfométrica e avaliação da heterogeneidade molecular de *Cryptosporidium* sp de grupos populacionais no município do Rio de Janeiro [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2004.

Silva S, Silva SP, Gouveia YS, Silva NO, Melo MERM, Moura H, Neves RH, Machado-Silva JR. Occurrence of *Cryptosporidium* sp in fecal samples of children less than 10 years old with clinical indication of Rotavirus. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(3):421-3.

Singh, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. Int J Parasitol. 1997;2(10):1135-45.

Slapeta J. *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. Trends Parasitol. 2006;22(10):469-74.

Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol*. 2000;30:1379-93.

Soba B, Petrovec M, Mioc V, Logar J. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(9):918-21.

Sodré FC, Franco RMB. - Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. *Rev Bras Anal Clin*. 2001;3:97-107.

Soldan OCP, Vásquez FV, Varas AG, Córdón GP, Soto JRV, Sánchez-Moreno M, Gonzalez IR, Lombardo MJR. Intestinal parasitism in Peruvian children and molecular characterization of *Cryptosporidium* species. *Parasitol Res*. 2006;98:576-81.

Souza RR. Regionalization in the current context of health policies. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2001;6(2):451-5.

Smith HV, Cacciò SM; Tait A, McLauchlin J, Thompson RCA. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol*. 2006;22(4):160-7.

Smith HV, Nichols RAB, Grimason AM. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. Trends Parasitol. 2005;21(3):133-42.

Spano F, Putignani L, Crisanti A, Sallicandro P, Morgan UM, Lê Blancq SM, Tchack L, Tzipori S, Widmer G. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. J Clin Microbiol. 1998;36(11):3255-59.

Spano F, Putignani L, McLauchlin J, Casemore DP, Crisanti A. A PCR – RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum* isolates of human and animal origin. FEMS Microbiol Lett. 1997;150:3255-9.

Stephenson LS. Helminths parasites, a major factor in malnutrition. World Health Forum. 1994;15(2):169-72.

Sturbaum, GD; Reed, C; Hoover, PJ; Jost, BH; Marshall, MM; Sterling, CR. Species-specific, Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl Environ Microbiol. 2001;67(6):2665-8.

Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. J Clin Microbiol. 2005;43(6):2805-9.

Sunnotel O, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JSG, Xiao L, Millar BC. *Cryptosporidium*. Lett Appl Microbiol. 2006a;43(1):7-16.

Sunnotel O, Snelling WJ, Xiao L, Moule K, Moore JF, Cherie Millar B, Dooley JSG, Lowery CJ. Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. J Clin Microbiol. 2006b;44(9):3285-91.

Takayanagui OM, Oliveira CD, Bergamini AM, Capuano DM, Okino MH, Febronio LH, Castro e Silva AA, Oliveira MA, Ribeiro EG, Takayanagui AM. Monitoring of vegetables sold in Ribeirão Preto, SP, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(1):37-41.

Tanriverdi S, Markovics A, Arslan ÖM, Itik A, Shkap V, Widmer G. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. Appl Environ Microbiol. 2006;72(4):2507-13.

Tashima NT & Simões MJ. Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Western São Paulo-UNOESTE Clinical

Laboratory. Presidente Prudente, São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004;46(5):243-8.

Tavares-Dias M, Grandini AA. Prevalence and epidemiological aspects of enteroparasites in the population of São José da Bela Vista, São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(1):63-5.

Teixeira JC, Heller L. Impact of water supply, domiciliary water reservoirs and sewage on faeco-orally transmitted parasitic diseases in children residing in poor areas in Juiz de Fora, Brazil. Epidemiol Infect. 2006;134(4):694-8.

Thompson RCA, Chalmers RM. *Cryptosporidium*: from molecules to disease. Trends Parasitol. 2002;18(3):98-100.

Thompson RC, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abramsen MS, Hijjawi NS. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Adv Parasitol. 2005;59:77-158.

Thompson HP, Dooley JS, Kenny J, McCoy M, Lowery CJ, Moore JE, Xiao L. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp in neonatal calves in Northern Ireland. Parasitol Res. 2007;100(3):619-24.

Tiangtip R, Jongwutiwes S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. Trop Med Int Health. 2002;7(4):357-64.

Tomps SR. Estudo epidemiológico da criptosporidiose e sua associação com as condições de saneamento ambiental no distrito Municipal de Perus, São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade de Mackenzie; 1998.

Torres DM, Chieffi PP, Costa WA, Kudzielics E. Giardiasis in nurseries supported by the São Paulo Municipal Prefecture, 1982/1983. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991;33(2):137-42.

Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, Nydan DV, Jamieson F, Xiao L. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. Parasitol Res. 2006;99(4):346-52.

Tsuyuoka R, Bailey JW, Guimarães AMAN, Gurgel RQ, Cuevas LE. Anemia and intestinal parasitic infections in primary school students in Aracaju, Sergipe, Brazil. Cad Saúde Pública. 1999;15(2):413-21.

Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes Infect. 2002;4:1047-58.

Uchôa CMA, Lobo AGB, Bastos OMP, Matos AD. Intestinal parasitism: prevalence in day-care centers of Niterói city, Rio de Janeiro – Brazil. Rev Inst Adolfo Lutz. 2001;60(2):97-101.

Upton SJ. Basic Biology of *Cryptosporidium*. Manhattan, KS 66506: Parasitology Laboratory, Division of Biology, Kansas State University. 1999;1-6.

Wainstein, M; Petrillo, MIL. Occurrence of parasitosis: a comparative study. Pesqui Méd. 1987;21(1):18-20.

Waldman EA, Silva LJ, Monteiro CA. Infectious diseases trends: from Polio elimination to the reintroduction of Cholera. Informe Epidemiológico do SUS (IESUS). 1999;8(3):5-47.

Ward LA, Wang Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001;41:37-42.

Weber R, Bryan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 1992;30:2869-73.

Weitzel T, Dittrich S, Mohl I, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. Clin Microbiol Infect. 2006;12(7):656-9.

Widmer G. Population genetics of *Cryptosporidium parvum*. Trends Parasitol. 2004;20(1):3-6.

Widmer G, Lin L, Kapur V, Feng X, Abrahamsen MS. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. Microbes Infect. 2002;4:1081-90.

Wiebbelling AM, Mezzari A, Schenato LK, Richter VT, Bohme ES. Avaliação do conhecimento sobre criptosporidiose em uma amostra de médicos de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. J Bras Pat Med Lab. 2002;38:119-23.

Wilson ME. Diarrhea in nontravelers: risk and etiology. Clin Infect Dis. 2005;41(S8):S541-6.

WHO. Intestinal protozoan and helminthic infections: report Geneva; 1981. (WHO – Technical Report Series, 666).

WHO. Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). In: Addendum Microbiological agents in drinking water. Guidelines for Drinking-Water Quality. 2^a ed. 2002;70-118.

Wuhib T, Silva TM, Newman RD, Garcia LS, Pereira ML, Chaves CS, et al. Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency vírus-infected patients in northeastern Brazil. J Infect Dis. 1994;170(2):494-7.

Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RCA, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl Environ Microbiol. 1999;65(8):3386-91.

Xiao L, Morgan R, Fayer R, Thompson RCA, Lal AA. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. Parasitol Today. 2000; 16(7):287-92.

Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, Cabrera L, Gimán RH, Lal AA. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. J Infec Dis. 2001;183:492-7.

Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, Zhang X, Fayer R, Lal AA. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Inter J Parasitol*. 2002;32:1773-85.

Xiao L; Fayer R; Ryan U; Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev*. 2004a;17(1):72-97.

Xiao L, Ryan UM. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis*. 2004b;17(5):483-90.

Xiao L, Alderisio KA, Jiang J. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: effect of the number of samples and analytic replicates on test results. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(9):5942-7.

Zani LC, Favre TC, Pieri OS, Barbosa CS. Impact of antihelminthic treatment on infection by *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and hookworm in Covas, a rural community of Pernambuco, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004;46(2):63-71.

Zardi EM, Picardi A, Afeltra A. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised hosts. *Chemotherapy*. 2005;51:193-6

Zhu G, Keithly JS, Philippe H. What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50(Pt 4):1673-81.

Zhu G, Marchewka MJ, Ennis JG, Keithly JS. Direct isolation of DNA from patients stools for Polymerase Chain Reaction detection of *Cryptosporidium parvum*. J Infect Dis. 1998;177:1443-7.

Zhou R, Li G, Xiao S, Xia Y, Guo Y. PCR amplification and sequence analyses of ITS-1 rDNA from *Cryptosporidium andersoni* in dairy cattle. 2006 [citado 23 nov. 2006]. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/k33741n5077l8v55/>.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)