UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

**Estudo da ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp
(Apicomplexa: Cryptosporidiidae)
entre crianças do município de Taubaté-SP
e caracterização genotípica de isolados clínicos do parasito**

Ana Julia Urias dos Santos Araujo

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientadora:

Prof^a Dr^a Hermínia Yohko Kanamura

SÃO PAULO

- 2004 -

Ana Julia Urias dos Santos Araújo

Estudo da ocorrência de infecção por
Cryptosporidium spp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae)
entre crianças do município de Taubaté-SP
e caracterização genotípica de isolados clínicos do parasito

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a Dr^a Herminia Yohko Kanamura
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi
1º Examinador

Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari
2º Examinador

Prof^a Dr^a Rosario Dominguez Crespo Hirata
3º Examinador

Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto
4º Examinador

São Paulo, 30 de março de 2004.

*“O Ser Humano investiga, pesquisa.
Ao investigar/pesquisar, ele investiga também a si mesmo.
Porquê?
Porque sua subjetividade é parte do processo de criar conhecimento.
Investigar a si mesmo, neste aspecto, quer dizer:
transformar necessidades em curiosidade.
E, depois, instrumentar a curiosidade em pesquisa.
Avançando no conhecimento, o Ser Humano vai avançando também na
descoberta de seus limites, suas necessidades.
Estes limites, quando superados, se transformam em conhecimento.
E por isso mesmo provocam no Ser Humano uma certa ‘sede’ de observar
e perceber mais amplas necessidades...”*

Nogueira, Adriano (org). *Reencontrar o corpo: ciência, arte, educação e sociedade*. Taubaté: Cabral, GEIC, 1996. p. 88.

Muito obrigada
minha querida Mãe,
meu saudosos Pai
e meus afetuosos Irmãos,
pela base sólida!

Dedico este trabalho

ao Sérgio,
que me estimula a sonhar alto
sem, contudo, desperceber o chão!...

à nossa filha Carolina,
por ter a capacidade, apesar de ainda muito jovem,
de compreender a importância deste momento
para a minha vida, pessoal e profissional...

ao Rodrigo e à Andréia,
que caminham conosco e participam da nossa felicidade...

Obrigada pela sua energia positiva canalizada
em prol da minha tranquilidade,
tão necessária nos momentos de turbulência,
próprios deste desafio...

Amo vocês, meu porto seguro!

Este trabalho foi realizado nos
Laboratórios de Parasitologia e de Biologia Molecular
do Departamento de Biologia da Universidade de Taubaté.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Hermínia Yohko Kanamura, pela orientação deste trabalho, pela disposição constante em compartilhar seu conhecimento e pela amizade, nascida durante a orientação no curso de mestrado e cultivada ao longo desses anos.

Ao Prof. Mestre Sérgio de Moura Araújo, por ter me despertado o interesse na área de Parasitologia, pela confiança em mim depositada e pelo apoio e incentivo constantes na carreira profissional.

Ao Dr. Alexandre Januário Da Silva, pelos ensinamentos transmitidos e pela orientação na padronização das técnicas moleculares empregadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Eduardo de Almeida, pelo companheirismo e pelo apoio irrestrito na realização dos ensaios moleculares.

Ao Mestre José Marcio Cardoso, pela parceria e total apoio na realização das atividades que envolveram população animal.

À Bióloga Renata Trigueirinho Alarcon, pela amizade e pelo apoio na padronização das técnicas laboratoriais para o diagnóstico da criptosporidiose.

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero, pela realização do seqüenciamento de DNA de *Cryptosporidium* spp no Departamento de Biofísica da UNIFESP.

À Prof^a Dr^a Maria Stella Amorim da Costa Zöllner, pelo apoio nas atividades junto ao Centro de Vigilância Epidemiológica de Taubaté.

Às Diretoras e Atendentes das creches municipais de Taubaté, pelo auxílio na orientação aos pais das crianças e na coleta de amostras fecais para a realização do presente estudo.

À Prof^a Dr^a Rosário Dominguez Crespo Hirata e à Dr^a Maria Bernadete de Paula Eduardo, pelas críticas e sugestões na ocasião do exame geral de qualificação.

Aos companheiros de pós-graduação e amigos Terezinha Travassos C. Almeida, Aparecida Helena de Souza Gomes, Matheus Diniz Gonçalves Coelho e Angélica Maria Casemiro, pelas discussões e trocas de experiência em torno de nosso objeto de estudo.

Aos Biólogos Francine Alves da Silva e Jonas Carvalho Filho, técnicos dos laboratórios de Parasitologia e de Biologia Molecular da Universidade de Taubaté (UNITAU), pelo auxílio na organização e processamento de amostras.

À Hilda de Fátima Jesus Pena, da FMVUSP, e à Maria Nazaré de Jesus, do IAL Taubaté, pela atenção e informações técnicas a respeito do diagnóstico morfológico de *Cryptosporidium* spp.

Aos meus estagiários, que participam do meu dia a dia e que são o estímulo para a minha busca de aprimoramento profissional, especialmente a Wilza R. A. Salgado Souza, Priscila Miranda Figueira, Juliana Guimarães dos Santos, Bianca dos Santos Pinheiro, Bruno Simão Rodrigues e Fábio Leite da Silveira, pelo auxílio em atividades de campo e laboratorial.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, em especial, à Marcia Cristina Caramico, secretária da pós-graduação e à Sonia Regina Caramico Buratto, técnica do laboratório de Parasitologia e Micologia, pela presteza, dedicação e amizade.

Ao pessoal do Serviço de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima, pela paciência e prontidão no atendimento aos acadêmicos aflitos!

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este trabalho de Doutorado.

À Universidade de Taubaté, pela bolsa de estudos concedida e por possibilitar e incentivar o aprimoramento profissional de seus servidores.

RESUMO

Objetivou-se, com o presente estudo, verificar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp entre crianças do município de Taubaté-SP e realizar a genotipagem de isolados clínicos do parasito. Foram selecionadas 13 creches municipais, que atendiam crianças de 4 a 72 meses de idade, realizando-se implantação de um programa para busca ativa de casos de diarreia, com acompanhamento da população durante o ano de 2002. Para se conhecer o perfil coproparasitológico, realizou-se estudo transversal em quatro das 13 creches selecionadas. Foram examinadas 483 amostras fecais processadas pelo método de concentração em formalina-acetato de etila e, para a visualização de oocistos, esfregaços fecais foram corados pelo método de Kinyoun. No estudo prospectivo, *Cryptosporidium* spp foi encontrado em 11,1% (3/27) das amostras, não se evidenciando outras espécies parasitárias. No estudo transversal, foram detectados oocistos em 0,2% (1/456) das amostras e a frequência para outras espécies parasitárias foi de 30,5% (139/456). No estudo de genotipagem, foram analisadas 14 amostras de humanos, uma de bovino e uma de cão. Dentre os isolados de humanos, quatro eram de crianças de Taubaté-SP, cinco de crianças de uma favela de São Paulo-SP e cinco de pacientes HIV positivos, de Sorocaba-SP. O DNA extraído a partir das amostras fecais foi submetido a Nested-PCR, amplificando-se um segmento de 553pb de um gene que codifica proteína de parede de *Cryptosporidium* (COWP). Os produtos amplificados foram submetidos a processo de digestão enzimática (RPLP-PCR), e os perfis obtidos por eletroforese evidenciaram três espécies: *Cryptosporidium hominis* em oito amostras, *Cryptosporidium parvum* em quatro e *Cryptosporidium meleagridis* em duas. Dos isolados de Taubaté, dois foram correspondentes a *C. hominis* e dois a *C. parvum*. As amostras de bovino e de cão foram positivas para *C. parvum*. O genótipo dos isolados de Taubaté, humanos e de animais, foram confirmados por análise da sequência do fragmento de 553pb do gene COWP, comparando-se com as seqüências disponíveis no GenBank.

ABSTRACT

The aims of this study were to investigate the occurrence of infection by *Cryptosporidium* spp in children living in Taubaté, São Paulo, Brazil, and to realize the molecular characterization of the parasite isolates. Thirteen day-care centers were selected and 4-72 months old children were involved in prospective study to detect diarrhea, during the 2002 year. In four of these day-care centers, a transversal study was performed in the beginning of the study to know the prevalence of intestinal parasites of children's community. A total of 483 stool samples were examined by the modified formalin-ethyl acetate concentration method, and the acid-fast Kinyoun stain was used to visualize oocysts. In the prospective study *Cryptosporidium* spp were detected in 11.1% (3/27) of stool samples and no other parasites were found. In the transversal study oocysts were detected in 0.2% (1/456) of the samples and the frequency of infection by other parasites was 30.5% (139/456). In the genotyping study, 14 stool samples from humans and one sample from bovine and another from dog were analyzed. Among the human isolates, four were from children of Taubaté, five were from children living in a slum of São Paulo city and the other five from HIV-positive patients of Sorocaba, São Paulo. The animal samples were collected in Taubaté region. A DNA fragment of 553 pb of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene was amplified from stool samples by Nested-PCR, and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis identified three species: *Cryptosporidium hominis* in eight samples, *Cryptosporidium parvum* in four samples and *Cryptosporidium meleagridis* in two samples. Among samples from Taubaté, two were positive for *C. hominis* and two for *C. parvum*. The bovine and dog samples were positive for *C. parvum*. The findings from Taubaté were confirmed by sequence analysis of the 553bp amplicons and comparison of the COWP gene available in the GenBank.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos históricos	01
1.2. Taxonomia de <i>Cryptosporidium</i>	03
1.3. Aspectos gerais do genoma e filogenia de <i>Cryptosporidium</i>	05
1.4. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp	06
1.5. Aspectos clínicos da criptosporidiose e relação parasito-hospedeiro	09
1.6. Diagnóstico da criptosporidiose	13
1.7. Aspectos epidemiológicos da criptosporidiose	16
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E METODOS	21
3.1. ATIVIDADES DE CAMPO	22
3.1.1. Estudo baseado em população humana	22
3.1.1.1. Critérios de seleção do público-alvo	22
3.1.1.2. Estudo piloto	23
3.1.1.3. Estudo transversal da frequência de <i>Cryptosporidium parvum</i> em crianças de creches-berçário	24
3.1.1.4. Estudo prospectivo da criptosporidíase em população atendida em creches-berçário	25
3.1.2. Estudo baseado em população animal	26
3.2. ATIVIDADES LABORATORIAIS	27
3.2.1. Processamento de amostras fecais de origem humana	27
3.2.2. Processamento de amostras fecais de origem animal	27
3.2.3. Isolamento de oocistos de <i>C. parvum</i>	28
3.2.4. Infecção experimental em bezerro	29
3.2.5. Implantação e avaliação de técnicas parasitológicas	30
3.2.5.1. Concentração de oocistos	30
3.2.5.2. Otimização do procedimento para concentração de oocistos	30
3.2.5.3. Detecção de oocistos em esfregaços fecais	31
3.2.6. Implantação e avaliação de técnicas moleculares	32
3.2.6.1. Extração de DNA	32

3.2.6.2. Purificação do DNA extraído	33
3.2.6.3. Reações de amplificação	33
3.2.6.4. Avaliação da Nested-PCR para a detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp diretamente de fezes	36
3.2.7. Aplicação dos métodos moleculares na detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp nas amostras fecais procedentes dos estudos de campo	36
3.2.8. Genotipagem de isolados clínicos de <i>Cryptosporidium</i> spp	37
3.2.8.1. Análise por PCR-RFLP	37
3.2.8.2. Sequenciamento de DNA	37
 4. RESULTADOS	 38
4.1. Implantação e avaliação de técnicas parasitológicas	38
4.1.1. Concentração de oocistos	38
4.1.2. Implantação de técnica de coloração de oocistos	39
4.2. Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp em população humana	40
4.2.1. Condições sanitárias e de funcionamento das creches	41
4.3. Estudo envolvendo população animal	46
4.4. Implantação e avaliação de técnicas moleculares	46
4.4.1. Padronização da PCR	46
4.4.2. Amplificação de DNA de <i>Cryptosporidium</i> presente em amostras fecais	48
4.4.3. Avaliação da Nested-PCR na detecção de <i>C. parvum</i> em fezes com diferentes concentrações de oocistos	51
4.5. Aplicação dos métodos moleculares na detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp nas amostras fecais procedentes dos estudos de campo	52
4.5.1. Reações de amplificação de DNA por Nested-PCR	52
4.5.2. Genotipagem dos isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp	54
4.5.2.1. PCR-RFLP	54
4.5.2.2. Sequenciamento de DNA	54
 5. DISCUSSÃO	 58
 6. CONCLUSÃO	 68
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 69

APÊNDICES 1 A 9: quadros demonstrativos de ocorrência de diarreia em nível nacional, estadual paulista e municipal de Taubaté.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos históricos

No início do século passado, Tyzzer fez o primeiro registro da ocorrência de um protozoário freqüentemente encontrado no estômago de camundongos de laboratório, propondo a nomenclatura de um novo gênero de coccídio, *Cryptosporidium*, e da espécie tipo, *Cryptosporidium muris*. Na mesma espécie hospedeira, habitando o intestino delgado, documentou também a ocorrência de *Cryptosporidium parvum*. Ao infectar experimentalmente camundongos com essas espécies, Tyzzer comprovou sua adaptação aos diferentes habitats, estômago e intestino, e verificou a diferença de tamanho dos oocistos desses parasitos, sendo os de *C. muris* maiores que os de *C. parvum*. Além disso, descreveu o ciclo biológico desses parasitos e observou sua capacidade de produzir auto-infecção interna no hospedeiro. Em 1929, Tyzzer observou a presença de *Cryptosporidium*, que acreditava ser *C. parvum*, no epitélio cecal de galináceos (Fayer *et al.*, 1997).

Uma nova espécie, *Cryptosporidium meleagridis*, foi descrita por Slavin, em 1955, causando doença e morte em perus jovens. No entanto, o interesse veterinário pelo parasito se deu nos anos 70, quando Panciera, Thomassen e Garner verificaram que *Cryptosporidium* estava associado a doença diarréica em bezerros (Fayer *et al.*, 1997). Hoje se sabe que *Cryptosporidium* ocorre em diferentes animais vertebrados, dentre peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos (Fayer *et al.*, 2000; Dillingham *et al.*, 2002; Tzipori & Ward, 2002; Green *et al.*, 2003; Monis & Thompson, 2003).

No homem, a presença de *Cryptosporidium* foi registrada pela primeira vez em 1976, com a descrição de dois diferentes casos clínicos: um de diarréia aguda auto-limitada envolvendo uma criança imunocompetente (Nime *et al.*, 1976) e outro de diarréia persistente acometendo um indivíduo adulto submetido a tratamento imunossupressor (Meisel *et al.*, 1976). No início da década de 80 foram relatados mais oito casos de criptosporidiose

em humanos, sendo seis deles em indivíduos comprovadamente imunocomprometidos, além de um surto envolvendo estudantes de medicina veterinária expostos a fezes diarréicas de bezerro (Dillingham *et al.*, 2002). A partir de 1983, com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - SIDA, *Cryptosporidium* emergiu como um patógeno causador de doença fatal em indivíduos portadores de HIV e milhares de casos foram relatados desde então, não só nessa população, mas também em indivíduos sem imunocomprometimento, tanto de países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Newman *et al.*, 1999; Fayer *et al.*, 2000; Dillingham *et al.*, 2002). As espécies mais freqüentes no homem são *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* (anteriormente nominado *C. parvum* - genótipo 1), no entanto, em estudos recentes tem sido demonstrada a ocorrência de infecção humana com espécies zoonóticas, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto comprometidos, mas a real prevalência e o significado desses achados ainda estão por serem estabelecidos (Gatei *et al.*, 2003).

O episódio provavelmente mais marcante na história da criptosporidiose foi a ocorrência de um surto, em 1993, com transmissão do parasito por via hídrica, afetando mais de 400000 pessoas residentes em Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos (MacKenzie *et al.*, 1994; Dillingham *et al.*, 2002). Anteriormente a esse episódio já se havia documentado a ocorrência de surtos de diarreia por *Cryptosporidium* naquele país, um deles em San Antonio, Texas, comprovando-se a etiologia pelo encontro de oocistos nas fezes dos indivíduos acometidos e por teste sorológico (D'Antoni *et al.*, 1985), e um outro em Carrol County, Georgia, detectando-se os oocistos na água tratada para abastecimento público (Hayes *et al.*, 1989). Desde então, mais de cinquenta surtos de criptosporidiose foram documentados no mundo, e as investigações epidemiológicas têm apontado como principal causa a contaminação fecal da água, ou deficiência no processo de tratamento (Fayer *et al.*, 2000).

Reconhece-se hoje *Cryptosporidium* como um dos agentes etiológicos mais comumente associados à doença diarréica, portando, um

grave problema de saúde pública. Considerando-se: a) a circulação no ambiente de diferentes espécies, infectando pessoas imunocompetentes ou não; b) a possibilidade de alta morbidade e mortalidade dentre os indivíduos com algum tipo de imunodeficiência, naturalmente vivendo no seio das comunidades, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento e c) a carência de drogas e desinfetantes eficazes contra o parasito, os esforços atuais têm sido dirigidos à elucidação de aspectos relativos à detecção, identificação e dinâmica de transmissão das espécies de *Cryptosporidium*, assim como à sua biologia e genoma, buscando-se métodos de prevenção e tratamento da criptosporidiose.

1.2. Taxonomia de *Cryptosporidium*

Cryptosporidium spp são organismos PROTISTA pertencentes ao Phylum APICOMPLEXA: apresentam complexo apical, Classe SPOROZOASIDA: apresentam reprodução assexuada e sexuada, com formação de oocistos, Subclasse COCCIDIASINA: seu ciclo de vida envolve processos de merogonia, gametogonia e esporogonia, Ordem EUCCOCIDIA: apresentam formação de esquizonte, Subordem EIMERIINA: têm desenvolvimento independente de micro e macrogametas, Família CRYPTOSPORIIDAE: seus oocistos apresentam esporozoitos livres e ausência de esporocisto (Levine, 1984). Algumas características de *Cryptosporidium* facilitam seu reconhecimento, em relação a outros coccídios: sua ocorrência em diferentes espécies hospedeiras, a resistência a agentes microbicidas, a ocorrência de auto-infecção do hospedeiro e, curiosamente, a sua localização intracelular e extracitoplasmática na célula hospedeira (Tzipori & Ward, 2002).

Diversas espécies de *Cryptosporidium* foram descritas e nomeadas segundo o hospedeiro em que foram encontradas, mas estudos baseados em aspectos morfológicos dos parasitos e em ensaios de transmissão cruzada entre diferentes hospedeiros levaram a invalidação de muitas delas, tanto que de cerca de 20 espécies descritas até 1997, somente oito eram tidas como válidas (Fayer *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 1999a). Até 2000,

considerando-se características fenotípicas, genotípicas, patogênicas e epidemiológicas, eram reconhecidas dez espécies de *Cryptosporidium* (Fayer *et al.*, 2000) e, mais recentemente, mais três foram propostas (Fayer *et al.*, 2001; Alvarez-Pellitero & Sitja-Bodadilla, 2002; Morgan-Ryan *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004), sendo muito provável que mais espécies existam (Xiao *et al.*, 2002b). No Quadro 1 são mostradas as espécies atualmente aceitas pela maioria dos autores.

Quadro 1: Espécies de *Cryptosporidium* descritas e validadas com base em estudos fenotípicos e genotípicos^a

Espécie	Hospedeiro tipo	Autores
<i>Cryptosporidium andersoni</i> (A) ^b	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Linsday <i>et al.</i> , 2000
<i>Cryptosporidium baileyi</i> (B,C)	<i>Gallus gallus</i> (galináceo)	Current <i>et al.</i> , 1986
<i>Cryptosporidium canis</i> (I)	<i>Canis familiaris</i> (cão)	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>Cryptosporidium felis</i> (I)	<i>Felis catis</i> (gato)	Iseki, 1979
<i>Cryptosporidium galli</i> (I)	Várias espécies de aves	Pavlassek, 1999
<i>Cryptosporidium hominis</i> ^c (I)	<i>Homo sapiens</i> (homem)	Morgan-Ryan <i>et al.</i> , 2002
<i>Cryptosporidium meleagridis</i> (I)	<i>Meleagris gallapavo</i> (peru)	Slavin, 1955
<i>Cryptosporidium molnari</i> (I)	<i>Sparus auratus</i> e <i>Dicentrarchus labrax</i> (peixes marinhos)	Alvarez-Pellitero & Sitja-Bodadilla, 2002
<i>Cryptosporidium muris</i> (E)	<i>Mus musculus</i> (camundongo)	Tyzzer, 1910
<i>Cryptosporidium parvum</i> (I)	<i>Mus musculus</i> (camundongo)	Tyzzer, 1912
<i>Cryptosporidium saurophilum</i> (I)	<i>Eumeces schneideri</i> (lacertíleo)	Koudela & Modry, 1998
<i>Cryptosporidium serpentis</i> (E)	Várias espécies de répteis	Levine, 1980
<i>Cryptosporidium wrairi</i> (I)	<i>Cavia porcellus</i> (porquinho da índia)	Vetterlin <i>et al.</i> , 1971

^a Baseado em Fayer *et al.* (1997; 2000); Monis & Thompson (2003); Morgan *et al.* (1999a); Xiao *et al.* (2000d; 2004)

^b Principal localização do parasito no hospedeiro: A-abomasum; B-bursa; C-cloaca; E-estômago; I-intestino.

^c Espécie conhecida como *Cryptosporidium parvum* genotipo I

1.3. Aspectos gerais do genoma e filogenia de *Cryptosporidium*

Há dois projetos genoma de *Cryptosporidium*: um de *C. hominis* (cepa H – <http://www.parvum.mic.vcu.edu/>) e outro de *C. parvum* (cepa IOWA – <http://www.cbc.umn.edu/ResearchProjects/AGAC/Cp/index.htm>). Os resultados obtidos nesses projetos estão sendo unificados num banco eletrônico de dados (CryptoDB – <http://CryptoDB.org>) e disponibilizados à comunidade científica (Puiu *et al.*, 2004). Tal esforço permitirá a comparação do genoma dessas duas espécies que mais afetam o homem, e a elucidação de aspectos relativos às suas diferenças de especificidade e virulência. Além disso, já que existem certas limitações na manutenção extensiva desses organismos em laboratório (Arrowood, 2002), estudos para identificação dos genes e posteriormente de sua expressão, nas diferentes fases de desenvolvimento do parasito, possibilitarão o desenvolvimento de drogas eficazes e o entendimento da biologia básica desses protozoários (Widmer *et al.*, 2002).

O cariótipo de *Cryptosporidium* foi descrito recentemente, consistindo em oito cromossomos de tamanhos variados (em Mpb): I ~ 0,94; II ~ 1,04; III ~ 1,10; IV ~ 1,13; V ~ 1,14; VI ~ 1,5; VII ~ 1,43; VIII ~ 1,44. O tamanho total do genoma é calculado em cerca de 10,4Mpb, considerado um dos menores dentre os já descritos de protozoários parasitos (Blunt, 1997; Cacció *et al.*, 1998; Spano & Crisanti, 2000). O desenvolvimento do mapa físico dos cromossomos (Piper *et al.*, 1998; Putignani *et al.*, 1999; Bankier *et al.*, 2003), somado aos resultados dos projetos de seqüenciamento do genoma de *Cryptosporidium*, tem permitido reconhecer a localização de certas seqüências bem exploradas de seu DNA. Por exemplo, no cromossomo VI está localizado o gene que codifica para uma proteína de parede do oocisto, *COWP* (*Cryptosporidium* oocyst wall protein), que tem sido alvo em protocolos de detecção do parasito em matéria fecal ou em amostras ambientais e, também, nos estudos de genotipagem e filogenia (Spano *et al.*, 1997; Bankier *et al.*, 2003).

Além de contribuir para a elucidação dos aspectos taxonômicos do gênero *Cryptosporidium*, os estudos moleculares têm permitido demonstrar a existência de diferentes genótipos de *C. hominis* e de *C. parvum*, e a relação filogenética entre as espécies e genótipos descritos. Tais estudos têm sido baseados principalmente na análise das seqüências dos genes que codificam, além de *COWP*, para sub-unidade menor do RNA ribossômico (ssrRNA) e para a *heat shock protein* de 70kDa (HSP70). Além desses, outros *loci* têm sido usados para estudos filogenéticos, incluindo actina, acetil-CoA sintetase, e espaço interno transcrito de rDNA (rDNA ITS 1), entre outros (Widmer *et al.*, 2002; Monis & Thompson 2003).

Por meio de análises *multi-loci*, tem sido demonstrada a existência de dois grupos monofiléticos no gênero *Cryptosporidium*: um deles reunindo as espécies de localização gástrica, *C. muris*, *C. andersoni* e *C. serpentis* e o outro, espécies que têm o intestino como habitat normal, como *C. hominis*, *C. parvum*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. saurophilum* e *C. wrairi* (Xiao *et al.*, 2000d; Xiao *et al.*, 2002b; Egyed *et al.*, 2003). Recentemente, por meio da análise do polimorfismo de regiões microsatélite e minisatélite do DNA, têm sido observadas subpopulações de *C. hominis* e de *C. parvum*, sugerindo-se inclusive a possibilidade de fecundação cruzada entre elas (Mallon *et al.*, 2003; Widmer, 2004).

1.4. Ciclo de Vida de *Cryptosporidium* spp

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp é do tipo monoxênico, completando-se no trato gastrointestinal do hospedeiro. A forma infectante do parasito é o oocisto, que deve ser ingerido ou inalado por uma espécie susceptível. Após ingestão pelo hospedeiro, quatro esporozoitos emergem do oocisto, e essa excistação requer condições próprias, ou seja, as espécies intestinais requerem presença de enzimas pancreáticas e sais biliares e as gástricas, a condição ácida do estômago (Laurent *et al.*, 1999; Hijjawi *et al.*, 2002). As espécies *C. hominis* e *C. parvum*, que mais ocorrem no homem, habitam preferencialmente a região distal do jejuno e o íleo.

Nesses locais os esporozoítos se ligam aos enterócitos e, após rápido contato do polo apical do parasito com as microvilosidades da célula hospedeira, ocorre um estímulo para invaginação da membrana, produzindo um envoltório com dupla camada que se funde na parte apical. Como resultado, o parasito fica contido num vacúolo parasitóforo, que gradativamente tem sua estrutura modificada com a incorporação de moléculas produzidas pelo parasito. Após a formação do vacúolo parasitóforo, a região que fica em contato com o citoplasma do enterócito sofre modificações, resultando na formação de uma estrutura peculiar chamada *organela de alimentação*, através da qual o parasito realiza trocas com a célula hospedeira (Beyer *et al.*, 2002). Sob essa organela, no citoplasma do enterócito, observa-se um rearranjo do citoesqueleto, com polimerização de actina, que aparentemente tem a função de ancorar o vacúolo parasitóforo, mantendo o parasito na sua localização característica: intracelular e extracitoplasmática. Tal condição também limitaria a resposta do hospedeiro e o acesso de quimioterápicos ao vacúolo parasitóforo (Farthing, 2003).

Após a internalização, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, os quais passam por processo de merogonia, produzindo merontes de tipo I, que geram seis a oito merozoítos. Essas formas emergem da célula hospedeira e invadem as adjacentes, onde se desenvolvem ou numa segunda geração de merontes do tipo I, agora com quatro merozoítos, ou em merontes do tipo II. Os merontes do tipo I geram os merozoítos que mantêm um ciclo assexuado de reprodução, enquanto os merontes do tipo II iniciam o processo de reprodução sexuada, gametogonia, pela diferenciação em macrogamontes ou microgamontes, respectivamente, produtores de gametas feminino e masculino. Os microgamontes produzem microgametas que emergem da célula hospedeira e fertilizam os macrogametas, dentro do macrogamonte, formando-se assim o zigoto. Após duas divisões mitóticas, forma-se o oocisto com quatro esporozoítos. Dois tipos de oocistos são produzidos: os de parede delgada, que se rompem dentro do hospedeiro, liberando os esporozoítos que participam do processo de auto-infecção do

hospedeiro, e os de parede espessa, formas expelidas com as fezes do hospedeiro e encontradas no meio ambiente (Fayer *et al.*, 1997; Laurent *et al.*, 1999; Tzipori & Ward, 2002; Monis *et al.*, 2003).

A manutenção *in vitro* e *in vivo* de *C. andersoni*, *C. hominis* e *C. parvum* possibilitou a visualização de outros estádios de desenvolvimento desses parasitos, aparentemente bem adaptados ao ambiente extracelular. O significado desses achados ainda não está bem estabelecido (Hijawi *et al.*, 2002; Monis *et al.*, 2003). Um esquema do ciclo vital de *Cryptosporidium* spp está apresentado na Figura 1.

Figura 1: Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp - [A] Oocisto liberando quatro esporozoítos; [B] esporozoítos invadem célula epitelial; [C] trofozoito; [D] diferenciação em meronte do tipo I, com formação de oito merozoítos; [E] merozoítos do tipo I invadem outras células e se diferenciam em novo meronte do tipo I ou em [F] meronte do tipo II, com formação de quatro merozoítos; [G] merozoítos do tipo II invadem células epiteliais e se diferenciam em estádios sexuais: [H] macrogamonte e [I] microgamonte; [J] microgameta fecunda macrogameta; [K] formação do zigoto; [L] oocisto de parede delgada: liberam esporozoítos no intestino, levando à auto infecção do hospedeiro; [M] oocistos de parede espessa: expelidos juntamente com fezes do hospedeiro. Baseado em Mead (2002).

1.5. Aspectos clínicos da criptosporidiose e relação parasito-hospedeiro

O período prepatente da criptosporidiose varia de acordo com o hospedeiro e a espécie de *Cryptosporidium*. Experimentalmente, observou-se que em infecções produzidas por *C. parvum* esse período pode variar de 2 a 7 dias em bezerros, de 2 a 14 dias em cães, de 3 a 6 dias em porcos, de 2 a 5 dias em ovelhas e de 4 a 22 dias em humanos. O período patente, também determinado experimentalmente para *C. parvum*, varia de 1 a 12 dias em bezerros, de 3 a 33 dias em cães, de 5 a 14 dias em porcos e de 1 a 20 dias em humanos (Fayer *et al.*, 1997).

A interação inicial do parasito com o hospedeiro é um processo complexo, que depende de ligantes e receptores celulares. Tal processo já foi bem estudado em outros Apicomplexa, como *Toxoplasma*, *Plasmodium* e *Eimeria*, e como esses, *Cryptosporidium* produz em suas organelas especializadas (roptrias, micronemas e grânulos densos) moléculas que são gradativamente expressas na membrana celular, e que promovem o contato, a internalização e a formação do vacúolo parasitóforo, e assim, o estabelecimento do parasitismo. Esse processo pode ser considerado o primeiro evento na patogênese da criptosporidiose (Tzipori & Ward, 2002).

A proliferação do parasito, observada *in vitro* nas espécies *C. andersoni*, *C. hominis* e *C. parvum*, é considerado um processo muito rápido. Em cultivo celular, utilizando células de adenocarcinoma ileocecal humano (HCT-8) em monocamada, cerca de 3 horas após a incubação de 5×10^5 oocistos de *C. hominis* em meio de excitação, mais de 80% tiveram seus esporozoitos liberados; após 24 horas de infecção já puderam ser observados trofozoitos e com 72 horas, todos os estádios do parasito, com cerca de 80% das células infectadas. Acredita-se que *in vivo* a propagação do parasito seja mais eficiente do que na monocamada da cultura celular, devido à topografia do intestino que facilitaria o mais rápido contato e invasão das células próximas, tanto nas vilosidades quanto nas criptas (Hijawi *et al.*, 2001; 2002).

Observou-se que 10 ou menos oocistos já são suficientes para causar infecção em humanos adultos, mas ainda não está claro se a dose infectante é a mesma para todas as espécies de *Cryptosporidium* encontradas no homem (Okhuysen *et al.*, 1999) e se há diferenças quanto à sua virulência e patogenicidade (Sestak *et al.*, 2002). Em crianças a infecção pode ocorrer durante ou logo após o desmame e re-infecções podem ser observadas no decorrer da vida (Tzipori *et al.*, 2002).

A infecção intestinal pode se estender desde o piloro até o colo e, dependendo da intensidade do parasitismo e da região atingida, o quadro será sintomático ou não. Geralmente, infecções confinadas à porção distal do íleo e/ou intestino grosso resultam em diarreia intermitente ou sem sintomatologia (Tzipori *et al.*, 2002). O mecanismo pelo qual *Cryptosporidium* induz a diarreia está associado a anormalidades importantes das funções absorptiva e secretória do intestino, resultantes dos danos causados às células pela presença dos parasitos e da resposta do hospedeiro a moléculas por eles secretadas, que levariam à produção de quimiocinas e recrutamento excessivo de células inflamatórias na lâmina própria (Laurent *et al.*, 1999; Lacroix-Lamandé *et al.*, 2002; Okhuysen *et al.*, 2002).

Com a extensiva proliferação do parasito, danificando as microvilosidades dos enterócitos, observa-se a perda da camada superficial do epitélio, o que leva à diminuição e fusão das vilosidades e ao alongamento das criptas, resultante da aceleração da divisão celular para compensar a perda. Esse processo diminui a superfície de absorção, reduzindo a obtenção de fluidos, eletrólitos e nutrientes da luz intestinal. Além disso, a perda das microvilosidades na região proximal do intestino delgado leva a disfunção enzimática, contribuindo para marcada má digestão, especialmente em crianças. Assim, se a diarreia se prolonga, pode ocorrer séria desidratação e significativa perda de peso. Associados à diarreia, outros sintomas podem se apresentar, tais como, vômito, dor abdominal, anorexia e febre (Agnew *et al.*, 1998; Laurent *et al.*, 1999; Tzipori *et al.*, 2002; Gendrel *et al.*, 2003).

A resistência e imunidade a *Cryptosporidium* envolvem resposta imune inata do hospedeiro, mediada por células nos níveis epitelial e subepitelial, e resposta imune adquirida, mediada por linfócitos B e T (Tzipori & Ward, 2002). Embora haja falta de clareza dos mecanismos de defesa em hospedeiro imunocompetente, observa-se que a infecção nesses indivíduos é geralmente auto-limitada e na maioria das vezes assintomática, podendo ocorrer, por outro lado, sintoma de diarreia sem que sejam detectados oocistos nas fezes, o que poderia ser resultado de hipersensibilidade do hospedeiro ou de contenção do ciclo reprodutivo do parasito em alguma de suas fases (Teunis *et al.*, 2002). Contudo, sabe-se que a diminuição no número de linfócitos T-CD4, circulante ou na mucosa, e a ausência de interferon gama (IFN γ) determinam falta de resistência à infecção. Esses fatores foram evidenciados em estudos epidemiológicos e clínicos com pacientes portadores do vírus HIV, apresentando diferentes níveis de células T-CD4, e validados por meio de experimentos conduzidos em modelos experimentais (Laurent, *et al.*, 1999; Ferreira & Borges, 2002; Hunter & Nichols, 2002; Lacroix-Lamandé *et al.*, 2002; Alcantara *et al.*, 2003; Farthing, 2003).

A produção de anticorpos específicos contra o parasito parece ter mais função protetora para re-infecções do que na recuperação do hospedeiro durante a infecção (Tzipori *et al.*, 2002). Indivíduos soropositivos para anticorpos IgG tendem a resistir ao parasitismo, quando submetidos a uma nova infecção. E essa resistência, aparentemente, é proporcional ao nível de anticorpos circulantes, e seria mais efetiva contra re-infecções com reduzido número de oocistos (Chappel *et al.*, 1999; Teunis *et al.*, 2002). São também mais resistentes à infecção crianças lactentes que ingerem anticorpos IgA maternos contra determinadas frações protéicas de *Cryptosporidium* de alto peso molecular, de 159, 123 e 97 kDa (Castillo *et al.*, 2001).

Criptosporidiose fulminante tem sido relatada em pacientes portadores de HIV, especialmente entre os que desenvolvem a SIDA. Nesses pacientes, além da doença gastrointestinal se apresentar

geralmente mais severa, pode ocorrer a disseminação do parasito pelo sistema respiratório e outros órgãos, tais como vesícula biliar e pâncreas. Em pacientes com outras causas de imunossupressão, também tem sido relatada a ocorrência de criptosporidiose grave, como entre indivíduos acometidos de desnutrição severa, portadores de câncer, submetidos a transplante de órgãos, portadores de diabetes ou de imunodeficiência primária (Chieffi *et al.*, 1998; Rivasi *et al.*, 1999; Clemente *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2000; Hunter & Nichols, 2002).

Como os estudos têm permitido concluir, a imunocompetência é fator decisivo para a resolução da criptosporidiose pelo hospedeiro, e assim, pode-se pensar que a maioria dos indivíduos tem capacidade de vencer o parasito. No entanto, são necessários esforços para o desenvolvimento de uma terapia satisfatória, capaz de conter a doença, principalmente nos pacientes com algum tipo de imunossupressão e para os casos de surto, quando é necessário diminuir o número de pessoas eliminando oocistos e, assim, o risco de transmissão. Nesse sentido, cerca de 200 quimioterápicos já foram testados, mas sem sucesso efetivo. Por meio de estudos controlados realizados recentemente com as drogas β -cyclodextrina e nitazoxanida têm-se obtido moderado sucesso no tratamento da criptosporidiose, com redução do número de oocistos excretados pelo paciente e tempo de duração da diarreia (Combs & Muller, 2002; Mead, 2002; Petri Jr, 2003). Com a adoção de imunoterapia, sendo empregados anticorpos monoclonais ou colostro bovino hiperimune, foram obtidos alguns bons resultados em casos humanos e em modelos experimentais (Jenkins *et al.*, 1998; Abreu, 2001). Em pacientes com SIDA, tem-se observado que o tratamento com antiretrovirais (HAART – highly active antiretroviral therapy) produz uma resposta efetiva contra *Cryptosporidium*. Embora essas drogas não tenham um efeito direto sobre o parasito, elas promovem um aumento da resposta imune do hospedeiro, com elevação do nível de linfócitos T CD4, capacitando o indivíduo a dar resolução à doença (Ives *et al.*, 2001; Roussignol *et al.*, 2001; Hunter & Nichols, 2002; Mead, 2002).

1.6. Diagnóstico da criptosporidiose

A detecção de *Cryptosporidium* geralmente é feita pela visualização de oocistos presentes nas fezes. O tamanho dos oocistos varia muito pouco de uma espécie para outra, e a diferença entre os de *C. hominis* e *C. parvum* é imperceptível pela microscopia óptica, o primeiro mede cerca de 4,9µm de comprimento por 5,1µm de largura e o segundo, 4,9 µm por 4,6 µm (Monis & Thompson, 2003). Em preparação úmida, os oocistos aparecem como corpos translúcidos, confundíveis com leveduras. Em microscopia de contraste de fase ou contraste diferencial de interferência é possível observar os esporozoítos, o que permitiria a identificação. O método laboratorial mais utilizado para o diagnóstico da criptosporidiose, técnica de Kynioun, explora a característica de álcool-ácido resistência dos oocistos, utilizando-se corantes derivados do Zeel-Nielsen (De Carli & Moura, 2001).

Na rotina laboratorial, após a concentração dos oocistos por meio de sedimentação em formalina-acetato de etila (Ritchie, 1948; Young *et al.*, 1979), segue-se a preparação de esfregaços em lâmina de vidro e o processo de coloração. Embora dependente do número de oocistos presentes nas fezes, essa combinação de técnicas apresenta bons resultados e tem sido adotada como método padrão para o diagnóstico morfológico do parasito. O tempo de processamento da amostra é inferior a 15 minutos, e o custo é reduzido, mas o diagnóstico propriamente dito depende de microscopista muito bem treinado (De Carli & Moura, 2001). Em parasitologia veterinária, a técnica mais empregada para a visualização do parasito é a de flutuação em solução de sacarose (Sheather, 1923), que apresenta a vantagem de permitir a observação de oocistos praticamente livres de detritos, além de ser eficaz na concentração e recuperação de grande número deles (Fayer *et al.*, 1997; Kvac *et al.*, 2003). Na Figura 2 são mostrados oocistos detectados pela coloração de Kynioun e pela flutuação em sacarose.

Figura 2: Oocistos de *Cryptosporidium parvum*. A: concentrados pela técnica de flutuação em solução de sacarose (Sheather, 1923); B: concentrados pela técnica de sedimentação em formalina-acetato de etila, fixados em esfregaços e submetidos à coloração de Kinyoun. Aumento de 400x.

Métodos baseados em princípios imunológicos e moleculares para o diagnóstico da criptosporidiose pelas fezes, embora disponíveis, apresentam custo elevado se comparados aos métodos morfológicos, e isso limita seu emprego na rotina da maioria dos laboratórios clínicos. Dentre esses métodos, têm sido mais utilizados o teste de imunofluorescência direta que emprega anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* (Garcia *et al.*, 1987; Kehl *et al.*, 1995; Bialek *et al.*, 2002), o ensaio imunoenzimático (ELISA – enzyme linked immunosorbent assay) para detecção de coproantígenos (Garcia & Shimizu, 1997; Johnston *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003) e a reação encadeada pela polimerase (*PCR* – polymerase chain reaction), utilizando-se diferentes estratégias de extração e amplificação do DNA (Balatbat *et al.*, 1996; Spano *et al.*, 1997; Morgan & Thompson, 1998; Morgan *et al.*, 1998; Da Silva *et al.*, 1999; Pedrazza-Diaz, 2001b; Jiang & Xiao, 2003; Kato *et al.*, 2003; Jongwutiwes *et al.*, 2004).

Além de empregadas para o diagnóstico do parasitismo pela matéria fecal humana e animal, as técnicas imunológicas e moleculares têm sido as principais ferramentas para a indicação da presença do parasito em amostras ambientais, como no solo (Lindergard *et al.*, 2001), em águas superficiais ou tratadas para consumo humano (Quintero-Betancourt *et al.*, 2002; Rimhanen-Finne *et al.*, 2002; Sturbaum *et al.*, 2002; Fontaine &

2002; Rimhanen-Finne *et al.*, 2002; Sturbaum *et al.*, 2002; Fontaine & Guillot, 2003; Higgins *et al.*, 2003; LeChevallier *et al.*, 2003; Lima & Stamford, 2003; Nichols *et al.*, 2003), em vegetais consumidos crus e outros alimentos, inclusive moluscos bivalves marinhos (Tamburrini & Pozio, 1999; Fayer *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 2002; Cook, 2003; Fayer *et al.*, 2003; Gomez-Couso *et al.*, 2003) e também em vetores mecânicos, como moscas (Graczyk *et al.*, 1999; Graczyk *et al.*, 2000; Graczyk *et al.*, 2003). Além disso, a avaliação da viabilidade dos oocistos de *Cryptosporidium* pode ser feita por ensaios baseados nesses princípios (Jenkins *et al.*, 2000; Gobet & Tose, 2001; Call *et al.*, 2001; Joachim *et al.*, 2003).

Uma interessante estratégia em estudos epidemiológicos é a detecção de anticorpos séricos contra determinado patógeno, circulantes na população. Esses estudos podem contribuir para o levantamento das áreas de risco e grau de contato da população com o parasito, o que poderia explicar, por exemplo, diferenças regionais nas taxas de infecção por *Cryptosporidium*. Nesse sentido, e também como ferramenta para estudar a interação desse parasito com o hospedeiro, diferentes técnicas sorológicas foram padronizadas, incluindo ELISA, Imunofluorescência indireta e *Western blot* (Braz *et al.*, 1996; Frost *et al.*, 1998a; Frost *et al.*, 1998b; Leach *et al.*, 2000; Priest *et al.*, 2001; Egorov *et al.*, 2003).

Uma questão a ser considerada em estudos epidemiológicos da criptosporidiose é a importância da identificação genotípica da espécie detectada, tanto em hospedeiros quanto no ambiente. Recomenda-se hoje que o diagnóstico seja realizado por meio de técnicas moleculares e não somente por critérios morfológicos, já que os elementos presentes nas fezes ou no ambiente e empregados na identificação, os oocistos, são praticamente idênticos de uma espécie para outra. Além disso, a genotipagem permitirá melhor entender a importância das várias espécies para a saúde pública, sua dinâmica de transmissão e potencial zoonótico, além da relação parasito-hospedeiro (Morgan *et al.*, 1999a; Fayer *et al.*, 2000; Chacin-Bonilla, 2002; Dillingham *et al.*, 2002; Akiyoshi *et al.*, 2003; Monis & Thompson, 2003; Fall *et al.*, 2003).

1.7. Aspectos epidemiológicos da criptosporidiose

Cryptosporidium spp têm distribuição cosmopolita. Sua presença já foi registrada em mais de 90 países, ocorrendo em humanos e em aproximadamente outras 150 espécies de mamíferos, e também nas outras classes de vertebrados (Fayer *et al.*, 1997; Fayer *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2003). Dentre as 13 espécies aceitas atualmente, *C. hominis* e *C. parvum* são as mais prevalentes no homem e têm sido responsabilizadas por todos os surtos, que tiveram o genótipo determinado (Monis & Thompson, 2003). Assim, são considerados dois ciclos de transmissão da criptosporidiose: um antroponótico, com a circulação de *C. hominis* entre humanos, e outro zoonótico, com a circulação de *C. parvum* entre homens e outras espécies hospedeiras, participando principalmente bovinos, mas com o possível envolvimento de outros animais (Peng *et al.*, 1997; Widmer *et al.*, 1998; Chalmers *et al.*, 2002a; Simpson, 2002; Abe *et al.*, 2002; Nizeyi *et al.*, 2002; Ragozo *et al.*, 2002; Abe & Iseki, 2003; Guselle *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2003).

Uma revisão de estudos realizados em diferentes regiões do mundo permitiu verificar que a frequência de infecção por *Cryptosporidium* spp associado à diarreia é mais elevada na população de países em desenvolvimento do que de países desenvolvidos, tanto entre indivíduos portadores de HIV [24,0% (120/503) e 13,8% (148/1074), respectivamente] quanto entre aqueles presumidamente normais [6,1% (1486/24269) e 2,1% (2232/100329), respectivamente]. O mesmo foi observado entre indivíduos sem sintomas de diarreia, verificando-se taxa de infecção de 5% na população HIV+ e de 1,5 na HIV- e de 1,5% na população HIV+ e 0% na HIV-, respectivamente, nos países em desenvolvimento e desenvolvidos (Adal *et al.*, 1995). Condições mais adequadas de saneamento ambiental e de tratamento da água para consumo, nos países mais industrializados,

provavelmente sejam os fatores que determinam essas diferenças (Fayer *et al.*, 2000).

No Brasil, no período de 1980 a 1997, foram detectados 2842 casos de criptosporidiose entre pacientes imunocomprometidos, particularmente nos pacientes com SIDA, observando-se freqüência mais elevada nas regiões nordeste e sudeste do país (Lima & Stamford, 2003). Por meio de estudos realizados em algumas localidades brasileiras, envolvendo crianças com ou sem diarreia, pacientes com SIDA e pacientes com problemas renais, foram verificadas taxas de ocorrência variadas de *Cryptosporidium* spp, como pode ser visto no Quadro 2. Dentre esses estudos, somente foi realizada a genotipagem dos isolados em um deles, verificando-se entre indivíduos HIV+ a ocorrência de dois casos de *C. parvum*, um de *C. hominis* e um outro indeterminado (Brantley *et al.*, 2003). Como a técnica de restrição enzimática (PCR-RFLP) utilizada pelos autores para caracterizar os isolados permite a identificação de todas as espécies até o momento relatadas no homem (Spano *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2000c; Monis & Thompson, 2003) o isolado indeterminado poderia se tratar de um novo genótipo. Outro estudo de genotipagem que incluiu isolados brasileiros, revelou a ocorrência de *C. hominis* em sete crianças não portadoras de HIV (Gatei *et al.*, 2003).

Quadro 2: Pesquisas de *Cryptosporidium* spp em populações de diferentes regiões do Brasil, no período de 1989 a 2003.

Localidade	Frequência [% (P/T)]*	População	Autores
Belém, PA	5,2 (6/115**)	Crianças c/ diarreia (N=61)	Loureiro <i>et al.</i> , 1989
Belém, PA	2,9 (1/34)	Pacientes c/ SIDA	Lainson & Silva, 1999
Fortaleza, CE	34,6 (9/26)	Crianças <2 anos baixo peso	Guerrant <i>et al.</i> , 1999
Fortaleza, CE	11,4 (46/402)	Crianças c/ diarreia	Lima <i>et al.</i> , 2000
Fortaleza, CE	45,5 (5/11)	Pacientes c/ SIDA	Brantley <i>et al.</i> , 2003***
Recife, PE	6,4 (10/156)	Crianças lactentes c/ diarreia	Silva <i>et al.</i> , 1994
Goiânia, GO	14,4 (64/445)	Crianças c/ diarreia	Pereira <i>et al.</i> , 2002
Uberlândia, MG	4,3 (4/94)	Crianças c/ diarreia	Gennari-Cardoso <i>et al.</i> , 1996
Uberlândia, MG	13,5 (7/52) 0 (0/38)	Pacientes c/ SIDA Pessoas saudáveis (controle)	Silva <i>et al.</i> , 2003****
Campo Grande, MS	1,1 (12/1051)	Crianças < 5 anos	Oshiro <i>et al.</i> , 2000
Rio de Janeiro, RJ	18,2 (18/99)	Pacientes c/ SIDA	Moura <i>et al.</i> , 1989
Rio de Janeiro, RJ	3,3 (16/485)	Crianças c/ diarreia	da Silva <i>et al.</i> , 2003
Campinas, SP	5,5 (17/307)	Crianças de creches	Franco, 1996
Ribeirão Preto, SP	1,8 (34/1836)	Crianças c/ diarreia	Medeiros <i>et al.</i> , 2001
São Paulo, SP	17,4 (22/241)	Crianças c/ diarreia	Mangini <i>et al.</i> , 1992
São Paulo, SP	34,8 (8/23) 25,0 (8/32) 17,4 4/27	Transplantados renais Paciente em hemodiálise Hipertensão arterial (controle)	Chieffi <i>et al.</i> , 1998
São Paulo, SP	7,0 (14/200)	Pacientes com SIDA	Cimerman <i>et al.</i> , 1999
Criciúma, SC	85,1 (80/94) 0,0 (0/45)	Crianças < 5 anos com diarreia Sem diarreia	Schnack <i>et al.</i> , 2003****

* (P/T) P = número de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp; T = total de amostras examinadas no estudo

** total de 115 amostras procedentes de 61 crianças

*** genotipagem por PCR-RFLP: dois casos de *C. parvum*; um de *C. hominis* e um indeterminado.

****diagnóstico realizado por método imunoenzimático (ELISA), para detecção de coproantígenos.

Como diferentes espécies de *Cryptosporidium*, ou mesmo genótipos de *C. parvum*, próprias de animais já foram relatadas no homem (Sargent *et al.*, 1998; Bornay-Llinares *et al.*, 1999; Pieniazek *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 1999a; Morgan *et al.*, 1999b; Pedraza-Diaz *et al.*, 2000; Katsumata *et al.*, 2000; Pedraza-Diaz *et al.*, 2001a; Pedraza-Diaz *et al.*, 2001c; Xiao *et al.*, 2001; Chalmers *et al.*, 2002a; Tiangtip *et al.*, 2002; Cacciò *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2002a; Xiao *et al.*, 2002b; Chalmers *et al.*, 2002b; Guyot *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003; Monis & Tompson *et al.*, 2003; Palmer *et al.*, 2003) é importante que se conheça a frequência e os aspectos biológicos dessas espécies nos seus hospedeiros habituais. Nesse sentido, no Brasil, alguns estudos epidemiológicos ou experimentais foram realizados com populações bovina, canina, felina, caprina e suína (Garcia & Lima, 1993; Mendes Maia *et al.*, 1995; Pena *et al.*, 1997; Bracarense *et al.*, 1997; Gennari *et al.*, 1999; Bracarense *et al.*, 1999; Ragozo *et al.*, 2002), e também com animais silvestres (Gilioli & Silva, 1999; Karasawa *et al.*, 2002).

A existência de dois ciclos de transmissão da criptosporidiose, o antroponótico e o zoonótico, coloca o homem numa condição propícia à aquisição do parasito, principalmente em ambientes com condições inadequadas de saneamento, que possibilitaria a circulação de oocistos de *Cryptosporidium* de diferentes origens: fezes de humanos e de outros animais. Como consequência, água e alimentos são contaminados, constituindo-se nos principais veículos de transmissão (Fayer *et al.*, 2000). Por razões óbvias, a água merece atenção especial e, com a agravante de oocistos serem resistentes aos tratamentos convencionais (Brasil, 2000; CETESB, 2000; Galé, 2001), muitos esforços têm sido direcionados no sentido de aprimorar técnicas para detecção, identificação do parasito e desinfecção da água de beber (Johnson *et al.*, 1995; LeChevallier *et al.*, 1995; Stinear *et al.*, 1996; Fricker & Crabb 1998; Xiao *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1999; Hallier-Soulier & Guillot, 1999; Reynolds *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2000; Gamba *et al.*, 2000; Yakub & Stadterman-Knauer, 2000; Franco *et al.*, 2001; Rimhanen-Finne *et al.*, 2001; Farias *et al.*, 2002; Hachich, 2002; Inoue *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

GERAL

Estudar a ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp em crianças de 4 a 72 meses de idade, atendidas em creches municipais de Taubaté-SP e definir os genótipos do parasito ocorrentes na população.

ESPECÍFICOS:

- Isolar, a partir de bovinos naturalmente infectados na região de Taubaté (Vale do Paraíba), Estado de São Paulo uma linhagem de *Cryptosporidium parvum*, e infecção experimental em bezerro;
- Implantar nos laboratórios da Universidade de Taubaté metodologia aplicada ao diagnóstico da criptosporidíase, por técnicas parasitológica e molecular;
- Realizar estudos transversal e prospectivo de casos de criptosporidiose entre crianças atendidas em creches municipais de Taubaté-SP, durante o ano de 2002;
- Verificar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp em cães e gatos apreendidos nas vias públicas de Taubaté e em bovinos da região;
- Realizar a caracterização genotípica de isolados de *Cryptosporidium* spp encontrados na população humana e animal de Taubaté e comparar com os obtidos de pacientes de outras localidades do estado de São Paulo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em fases distintas, mas inter-relacionadas, que estão sinteticamente apresentadas no algoritmo abaixo, e detalhadas nos itens a seguir.

3.1. ATIVIDADES DE CAMPO

3.1.1. Estudo baseado em população humana

3.1.1.1. Critérios de seleção do público-alvo

O trabalho de campo inicialmente foi organizado por intermédio do Departamento de Saúde Municipal de Taubaté, contando-se com a estrutura do Programa de Saúde da Família (PSF) e do Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS). Foram realizadas reuniões com a equipe de Enfermeiras responsáveis pelos programas e iniciado um treinamento com as Auxiliares de Enfermagem, que seriam as responsáveis pela notificação dos casos de diarreia nas comunidades atendidas e que dariam suporte aos agentes comunitários, esses responsáveis pela orientação direta à população.

No início de 2001, os programas mencionados foram extintos e nova estrutura organizacional foi elaborada para dar atendimento às comunidades menos favorecidas. Os programas de saúde primária passaram a ser desenvolvidos nos Postos de Atendimento Médico e Odontológico (PAMOs). O município contava na época com 30 PAMOs, distribuídos pelos bairros, e a esses foram incorporados os postos do extinto PSF, totalizando 38 PAMOs. Para se reorientar a coleta de amostras por intermédio desses postos, propôs-se a realização de um projeto piloto, em um deles. Para se definir a localidade de potencial risco de transmissão, realizou-se estudo retrospectivo de atendimentos médicos devidos a diarreias e verminoses no município, levantando-se os registros dos PAMOs referentes ao período de maio de 2000 a abril de 2001. Consideraram-se, também, os resultados de levantamento coproparasitológico realizado em 2001 envolvendo escolares da 1ª série do Ensino Fundamental. A localidade então selecionada foi o Bairro de São Gonçalo, onde anteriormente funcionava uma unidade do PSF (ver item 3.1.1.2).

A realização do projeto piloto foi importante para que se pudesse observar a rotina do posto médico, verificar a busca de atendimento em função de diarreia e treinar a equipe de campo. Em virtude das dificuldades

encontradas, optou-se por outra estratégia: realizar o trabalho em creches. Essa decisão foi reforçada pelo relato de surtos de diarreia em creches, por outros grupos de pesquisadores (Medeiros *et al.*, 2001).

O município de Taubaté contava com 45 creches, municipais ou conveniadas, e 14 Escolas de Educação Infantil. Das creches, 13 atendiam crianças a partir de 4 meses de idade, e foram denominadas neste trabalho de “creches-berçário”. O número de crianças matriculadas em 2002 nas escolas infantis e creches era de aproximadamente 11000. Considerando-se as condições favoráveis apresentadas naquele momento, foram realizadas reuniões com as diretoras das creches, por intermédio do Departamento de Educação da Prefeitura Municipal, ocasiões em que foram esclarecidos os objetivos do projeto e firmadas as parcerias necessárias.

3.1.1.2. Estudo Piloto

O estudo piloto foi realizado com a população atendida durante o mês de janeiro de 2002 na sessão de Pediatria do Posto de Atendimento Médico e Odontológico (PAMO) do Bairro São Gonçalo, situado numa região periférica do município, onde anteriormente constatou-se elevada frequência de enteroprotzoários (Araújo *et al.*, 2003). Participaram do estudo crianças, com ou sem sintomatologia, e seus familiares. Foram distribuídos 340 frascos coletores de fezes, contendo formalina a 10% tamponada com fosfatos (pH 7,2). As amostras foram processadas pelo método de concentração em formalina-acetato de etila (ver item 3.2.5.1) e do sedimento, antes da leitura para diagnóstico genérico de enteroparasitos, foram preparados dois esfregaços de 10mm de diâmetro em uma mesma lâmina, para cada amostra. Os esfregaços fecais foram corados pela técnica de Kinyoun modificada (ver item 3.2.5.3).

3.1.1.3. Estudo transversal da freqüência de *Cryptosporidium* spp em crianças de creches-berçário.

Realizou-se inquérito coproparasitológico nos momentos iniciais do trabalho de campo em quatro das 13 creches atendidas pelo projeto. Esses quatro estabelecimentos foram selecionados pela sua localização geográfica, e por apresentarem características ambientais diferentes: a) Parque Piratininga: área de expansão urbana, sendo a creche vizinha a uma fazenda de gado mantido em sistema de criação extensivo; b) Vila São José: área urbanizada, relativamente próxima ao centro da cidade, com condições de saneamento consideradas adequadas; c) CECAP: conjunto residencial de prédios populares, localizado num distrito a cerca de 5Km do centro da cidade e d) São Gonçalo: bairro periférico, com obras de escoamento de esgoto inacabadas. Essas creches atendiam, respectivamente, 376, 126, 166 e 113 crianças, no início de 2002.

A coleta de amostras fecais foi realizada pelas mães das crianças, em suas residências, ou pelas atendentes das creches quando em horário escolar. Foi colhida uma amostra fecal de cada criança, em frasco coletor de 80mL, sem conservante químico. Após a distribuição dos frascos, durante quatro dias consecutivos, foram sendo obtidas as amostras fecais das crianças, sendo as mesmas mantidas em isopor com gelo. Duas vezes por dia, por volta das 9:30 horas e das 15:00 horas, os isopores com as amostras eram recolhidos e transportados ao laboratório de Parasitologia da UNITAU.

O processamento das amostras foi realizado no mesmo dia da coleta, pelo método de concentração em formalina-acetato de etila (ver item 3.2.5.1), com a preparação de dois esfregaços de 10µL cada, corados pela técnica de Kinyoun (ver item 3.2.5.3). Do sedimento restante foram examinadas duas alíquotas com cerca de 50µL cada, sendo uma delas corada com uma gota de lugol, para melhor visualização de cistos de protozoários.

3.1.1.4. Estudo prospectivo da criptosporidiose em população atendida em creches-berçário

Com os entendimentos mantidos na administração municipal, como comentado no item 3.1.1.1, estabeleceu-se a inclusão no estudo de todas as creches municipais da área urbana de Taubaté, que possuíam berçário e que, em função disso, atendiam crianças de 4 a 72 meses de idade, totalizando 13 estabelecimentos. Assim, o trabalho de campo foi organizado de forma a se realizar “busca ativa de casos de diarreia”, com o seguinte plano de atividades:

- a) Palestras educativas com as mães das crianças matriculadas nas creches, inicialmente para esclarecimentos dos objetivos e metodologia e, em outros dois momentos em cada estabelecimento, para realização de palestras sobre temas relativos a distúrbios gastrointestinais;
- b) Orientação às diretoras e professoras das creches para o registro de todos os casos de diarreia, e notificação ao nosso laboratório dos casos de diarreia contínua por mais de dois dias;
- c) Abastecimento das creches com *kits* de coleta de amostras, que continham: um pinico; um frasco coletor de tampa-rosca com capacidade de 80mL; um frasco com capacidade de 10mL contendo 5mL de formalina a 10% tamponada com fosfatos; uma pipeta descartável e um saco-coletor de urina adaptável à coleta fecal, este último para facilitar a coleta de fezes das crianças que faziam uso de fraldas;
- d) Retorno dos resultados e, nos casos de positividade para *Cryptosporidium*, continuidade do estudo em abordagem direta às famílias.

Em visita precursora às 13 creches envolvidas no estudo, foram realizados levantamentos das condições ambientais e de funcionamento das mesmas.

A coleta de amostras diarréicas foi realizada pelas mães das crianças, em suas residências, ou pelas atendentes das creches quando em horário escolar, utilizando o *kit* de coleta. Logo após a coleta, as amostras eram colocadas em isopor com gelo (*gelox* mantido no congelador da creche) e a diretora da creche ou um preposto fazia contato telefônico com o laboratório, que imediatamente providenciava o recolhimento do material.

3.1.2. Estudo baseado em população animal e obtenção de isolado bovino de *Cryptosporidium parvum*

Foram realizados inquéritos parasitológicos em bovinos de propriedades de Taubaté e municípios vizinhos (Pindamonhangaba e Caçapava), com a finalidade de se obter um isolado de *C. parvum* adequado à padronização das técnicas morfológicas e moleculares descritas nos itens 3.2.5 e 3.2.6, e também à infecção de um modelo experimental bovino (ver item 3.2.2).

As amostras fecais colhidas diretamente do reto dos animais, com auxílio de sacos plásticos, foram devidamente identificadas e transportadas em isopor ao laboratório de Parasitologia da UNITAU. O processamento das amostras foi realizado pelo método de flutuação em solução de sacarose (Sheather, 1923), descrito no item 3.2.2.

Dentre as amostras de bezerro examinadas, uma apresentou-se positiva somente para *C. parvum*, com quantidade de oocistos suficiente aos propósitos do trabalho. Então, parte das fezes foi mantida em formalina a 10% tamponada com fosfatos, na proporção 1:4, e parte foi submetida a processo de isolamento de oocisto, como descrito no item 3.2.3, e mantida em dicromato de potássio a 5%, na proporção 1:2. Este isolado foi denominado CpVP, ou seja, *Cryptosporidium parvum* do Vale do Paraíba.

Também foram colhidas amostras de cães e gatos apreendidos nas vias públicas do município pelo Centro de Controle de Zoonoses de Taubaté - CCZT, na tentativa de se encontrar animais infectados com outras espécies de *Cryptosporidium*.

3.2. Atividades laboratoriais

3.2.1. Processamento de amostras fecais de origem humana

As amostras fecais provenientes dos estudos de campo, tanto do inquérito conduzido com as famílias por intermédio do PAMO quanto com as crianças de creches, foram submetidas ao método de sedimentação em formalina-acetato de etila (itens 3.2.5.1 e 3.2.5.2) com a preparação de esfregaços fecais corados pela técnica de Kinyoun (item 3.2.5.3).

3.2.2. Processamento de amostras fecais de origem animal

As amostras fecais, tanto de bovinos quanto de cães e gatos, foram processadas pela técnica de flutuação em solução de sacarose (Sheather, 1923). Resumidamente, em um frasco plástico com capacidade de 30mL, 2 a 3g de fezes foram dissolvidos em 10mL de solução de sacarose, densidade $1,2\text{g/cm}^3$, e em seguida essa suspensão foi filtrada, através de *parasitokit*, sendo transferida para um tubo de centrífuga com capacidade de 15mL. O material foi centrifugado a 1500rpm por 10 minutos e, com auxílio de uma alça de platina, duas amostragens da película superficial do centrifugado, com cerca de 10 μL cada, foram transferidas para uma lâmina de microscopia e recobertas separadamente com lamínulas de vidro de 1cm². O exame foi realizado em microscópio de luz, em aumento de 400x.

As amostras de bezerro positivas para *C. parvum* foram submetidas também ao método de concentração por sedimentação em formalina-acetato de etila (Ritchie, 1948; Young, 1979), descrito no item 3.2.5.1. Esse procedimento foi necessário para se minimizar a possibilidade de empregar na infecção experimental de bezerro (item 3.2.4) um isolado contendo formas infectantes de outras espécies parasitárias.

3.2.3. Isolamento de oocistos de *Cryptosporidium parvum*

O isolamento de oocistos foi um procedimento necessário para a preparação do inóculo empregado na infecção experimental de bezerro, como descrita no item 3.2.4, e também para a padronização das técnicas parasitológicas e moleculares nas condições dos laboratórios de Parasitologia e Biologia Molecular da Universidade de Taubaté.

O procedimento utilizado foi uma adaptação da técnica de Sheather (1923) realizando-se a concentração de oocistos por meio de flutuação em solução de sacarose com densidade 1,2g/mL. As suspensões fecais que eram mantidas em dicromato a 5% foram processadas da seguinte maneira:

- a) retirada do dicromato de potássio: em tubos de centrifuga com capacidade para 50mL foram misturados 20mL da suspensão fecal com 30mL de água destilada. Esse material foi centrifugado a 3000rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em água destilada e novamente centrifugado nos mesmos tempo e rotação;
- b) concentração de oocistos por flutuação: o sedimento lavado foi ressuspenso em 30mL da solução de sacarose e essa mistura foi centrifugada a 3000rpm durante 8 minutos e, em seguida, foram aspirados cuidadosamente 2mL da porção superior da coluna de sacarose, onde se encontraria a maior concentração de oocistos, transferindo-se a suspensão para um tubo limpo com capacidade para 15mL. Foram aproveitados mais 6mL da suspensão, aspirando-se e transferindo-se para tubos limpos 2mL de cada vez.
- c) retirada da sacarose: Os quatro tubos contendo 2mL de sacarose com oocistos foram completados com água destilada até 15mL e submetidos a centrifugação a 3000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado mais uma vez nas mesmas condições;
- d) concentração final de oocistos: os sedimentos foram transferidos para microtubos (tipo Eppendorf) com capacidade de 1,5mL nos quais foram feitas mais duas lavagens com água destilada e uma última com solução

salina tamponada com fosfatos (PBS), por meio de processos sucessivos de ressuspensão dos sedimentos seguido de centrifugação a 10000rpm por 3 minutos e retirada dos sobrenadantes.

Dependendo da finalidade, os oocistos obtidos, após processo de isolamento, foram conservados em dicromato de potássio a 5% para manutenção da viabilidade ou em formalina a 10% tamponada com fosfatos, para preservação das características morfológicas, ou então, mantidos em PBS e congelados a -20°C para melhor conservação das características imunogênicas e moleculares.

3.2.4. Infecção experimental de bezerro

Um bezerro procedente de área verificada como livre de infecção por *C. parvum* foi recebido por doação e mantido no biotério da Universidade de Taubaté, onde foi submetido à infecção experimental. No terceiro dia de vida do animal, após constatação de ausência de qualquer espécie parasitária em suas fezes, realizou-se a inoculação por via oral, com cerca de 2×10^6 oocistos misturados a 1L de leite desnatado. O animal permaneceu no biotério por 25 dias, sendo alimentado, enquanto apresentava diarreia, com 2 litros diários de leite desnatado e água. Do 7º ao 14º dias após infecção foram obtidas fezes diarreicas com grande quantidade de oocistos. As fezes foram coletadas com auxílio de um saco coletor, próprio para bezerros, e transferidas para frascos de vidro e misturadas em igual volume de dicromato de potássio a 5%. Findado o processo diarreico, o animal passou a ser alimentado com leite integral e água e, quando não mais apresentava oocistos nas fezes, foi doado à propriedade de onde se obteve o isolado CpVP, empregado na infecção experimental.

3.2.5. Implantação e avaliação de técnicas parasitológicas

3.2.5.1. Concentração de oocistos

Para a recuperação de oocistos em amostras fecais diarréicas de origem humana, como obtidas no estudo prospectivo descrito no item 3.1.1.4, foi empregada a técnica de concentração em formalina-acetato de etila (Ritchie, 1946; Young *et al.*, 1979). Resumidamente, 7mL da suspensão de fezes colhidas em conservante foram filtradas, através de *parasitokit*, para um tubo de centrifuga com capacidade de 10mL onde se acrescentou 3mL de acetado de etila e, por meio de agitação vigorosa, procedeu-se emulsão do material. Os tubos foram centrifugados a 3000rpm por 8 minutos (De Carli & Moura, 2001), o sobrenadante foi descartado e do sedimento foram retidas duas alíquotas de 10 μ L para preparação de esfregaços, que foram corados como descrito no item 3.2.5.3. Do sedimento restante foram preparadas duas lâminas com alíquotas de 50 μ L cada, sendo uma corada com lugol, para exame ao microscópio de luz, em aumentos de 100x e 400x.

Para a pesquisa de casos de criptosporidiose em inquéritos populacionais (itens 3.1.1.2 e 3.1.1.3) foram realizadas adaptações nessa técnica, buscando-se tornar viável seu emprego em larga escala, como método coproparasitológico genérico. Para tanto, realizou-se o ensaio descrito a seguir.

3.2.5.2. Otimização do procedimento para concentração de oocistos

Amostra fecal positiva para *C. parvum*, obtida de bezerro naturalmente infectado (isolado CpVP), foi submetida ao processo de concentração em formalina-acetato de etila, sendo comparados dois diferentes procedimentos:

- a) velocidade e tempo de centrifugação: 3000rpm durante 8min (variante A) contra 2000rpm por 2min (variante B);
- b) formas de aspiração do material para preparação de esfregaços: a) alíquota aspirada da superfície do sedimento; b) alíquota aspirada do fundo

e c) alíquota aspirada após homogeneização do sedimento.

Com o sedimento resultante da centrifugação, após descartes dos sobrenadantes, foram preparados esfregaços com 10µL de material e corados pela técnica de Kinyoun, descrita no item a seguir. Após coloração dos esfregaços, os oocistos foram contados em 25 campos definidos aleatoriamente, em microscópio de luz, com aumento de 400x.

3.2.5.3. Detecção de oocistos em esfregaços fecais

Foram comparados diferentes protocolos de coloração para *Cryptosporidium*, já descritos na literatura (De Carli & Moura, 2001; Medeiros *et al.*, 2001). Tais protocolos seguem basicamente as mesmas etapas, ou seja, coloração em fuccina carbólica, descoloração em solução de álcool-ácido, sulfúrico ou clorídrico, e coloração de contraste.

Utilizando-se uma amostra positiva para *C. parvum* (isolado CpVP), conservada em formalina a 10% tamponada com fosfatos, foram preparadas seis séries de esfregaços fecais em lâminas de microscopia. Os esfregaços circulares, com aproximadamente 10mm de diâmetro, foram confeccionados com 10µL da suspensão fecal.

Após secagem em estufa a 60°C, por cerca de cinco minutos, os esfregaços foram fixados em álcool metílico e corados por diferentes protocolos, comparando-se:

- a) tipos do corante fucsina (comercial e não-comercial);
- b) tempo de exposição dos esfregaços ao corante;
- c) composição e concentração da solução de álcool-ácido (sulfúrico ou clorídrico; 5% ou 10%) e
- d) tempo de descoloração em álcool-ácido.

Após descoloração, os esfregaços foram todos cobertos com azul de metileno a 3%, durante dois minutos, obtendo-se coloração de contraste com o mesmo padrão para todas as lâminas.

Para análise comparativa, os esfregaços foram examinados em microscópio de luz, em aumento de 400x, e procedeu-se a contagem do número de oocistos em 100 campos aleatórios de cada lâmina.

3.2.6. Implantação e avaliação de técnicas moleculares

Na padronização/adequação da reação encadeada pela polimerase (*PCR*), para detecção de *Cryptosporidium* spp, foram utilizadas fezes de bovino experimentalmente infectado. Nos procedimentos iniciais foram utilizados oocistos isolados das fezes, como descrito no item 3.2.3, mantidos congelados a -20°C, em seguida, utilizaram-se alíquotas de fezes mantidas em dicromato de potássio a 5% ou congeladas.

3.2.6.1. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo modificado descrito por Da Silva e cols. (1999), utilizando o Kit Fast DNA (BIO 101, Inc., Vista, CA). Assim, 300µL de cada amostra foram misturados com 400µL do tampão de lise celular (Cell Lysis/DNA Solubilizing Solution for Vegetation - CLS-VF, Cat. #6540-402), 200µL da solução de precipitação de proteínas (Protein Precipitation Solution – PPS, Cat. #6540-403) e 100µL de polivinilpirolidina (PVP, Cat. #85645-2, Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI), sendo essa mistura transferida para um tubo de processamento com capacidade de 2mL que continha a matriz de lise (Multi Mix2, Cat. #6560-215) e micropérolas de vidro. As soluções CLS-VF e PVP foram usadas para maximizar a remoção de carboidratos e compostos fenólicos das fezes. Na sequência, a mistura foi submetida a agitador de tubo (Vortex), na potência máxima, durante 1 minuto, para o rompimento dos oocistos presentes nas amostras, e foi centrifugada a 14000rpm por 5 minutos. O sobrenadante, que continha o DNA, foi transferido para um tubo limpo e misturado a 600µL de matriz de captura (Binding Matrix, Cat. #6540-408). Essa mistura foi homogeneizada pela inversão do tubo, incubada por 5 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugada a 14000rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado. Ao precipitado foram adicionados 500µL de solução de lavagem Sal/Etanol (SEWS-M, Cat. #6560-405), e a matriz de captura foi ressuspensa por meio de cuidadosas e

sucessivas micropipetagens. A suspensão obtida foi centrifugada a 14000rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante novamente descartado. Uma segunda centrifugação a 14000rpm por 10 segundos foi realizada para remover o excesso da solução Sal/Etanol. O DNA foi eluído da matriz de captura com 100µL de solução de eluição de DNA (DES, Cat. #6540-406). Para tanto, a matriz foi ressuspensa no eluente e incubada por 3 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, a mistura foi centrifugada a 14000rpm por 2 minutos e o sobrenadante, contendo o DNA, foi separado e colocado em um tubo limpo.

3.2.6.2. Purificação do DNA extraído

Após o processo de extração, o DNA eluído foi submetido à purificação, utilizando-se o QIAquick *PCR* purification Kit (Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA), com a finalidade de se remover completamente os inibidores de *PCR* (Da Silva *et al.*, 1999). Assim, 80µL do material extraído foram misturados com 400µL de tampão PB, aplicados na coluna QIAquick e centrifugados a 13000rpm por 60 segundos. Para lavar, foram adicionados 750µL de tampão PE na coluna, que foi centrifugada duas vezes a 13000rpm por 60 segundos, para que todo o tampão fosse removido. Nessas três etapas as soluções filtradas através da coluna foram retidas em seu tubo de suporte, e foram descartadas. Finalmente, a coluna foi transferida para um tubo limpo com capacidade de 1,5mL e, no centro da coluna, foram adicionados 30µL de tampão EB (10mM TRIS-Cl, pH 8,5) para a eluição do DNA da membrana e, após repouso por 60 segundos, o conjunto foi centrifugado a 13000rpm por 60 segundos e o DNA recuperado no filtrado final. Todas as soluções tampão mencionadas faziam parte do kit de purificação. Após purificação, o DNA extraído foi submetido à amplificação ou foi mantido congelado a -20°C, para posterior utilização.

3.2.6.3. Reações de Amplificação

Na etapa de padronização da metodologia, o DNA extraído foi

submetido a *PCR*, utilizando-se três diferentes pares de *primers*, em reações separadas (Reações R1, R2 e R3), nas seguintes condições:

Reações R1: foram utilizados os *primers* CPB-DIAGF (5'AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG3') e CPB-DIAGR (5'TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG3'), dirigidos para o gene que codifica a subunidade 18S do rRNA do parasito e resultam num produto de 435pb (Johnson e cols., 1995);

Reações R2: foram realizadas com *primers* CRY9 (5'GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G3') e CRY15 (5'GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G3') dirigidos para a região N-terminal do gene que codifica proteína de parede de *Cryptosporidium* (*COWP*) e resultam num produto de 553pb (Spano *et al.*, 1997);

Reações R3: foram realizadas com os *primers* CRY12 (5'CCA GAT GGA TTC AGA TTA TTG GG3') e CRY14 (5'CTA TCT TTT CAC AAC CAC CGG ATG GGC3'), dirigidos para a região C-terminal do gene que codifica para *COWP* e resultam num produto de 533pb (Spano *et al.*, 1997).

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 50µL contendo: 5µL da solução com o DNA extraído de cada amostra; 20mM de Tris-HCl pH 8,4; 50mM de KCl; 1,5mM de MgCl₂; 0,25mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP); 30pmol de cada *primer* e 3U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Cat. #18038-42)

As condições de amplificação em termociclador (Mastercycle Gradient – Eppendorf) foram programadas segundo os protocolos descritos para cada produto desejado:

Reações R1: DESNATURAÇÃO INICIAL - incubação a 94° C por 5 minutos, seguida de outra incubação a 98°C por 30 segundos; 39 CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO - hibridização a 55°C por 30 segundos, polimerização a 72°C por 1 minuto e desnaturação a 94°C por 30 segundos; EXTENSÃO FINAL a 72°C por 10 minutos e resfriamento a 4°C. Esse protocolo foi modificado na fase de desnaturação inicial, alterando-se a temperatura prevista no protocolo original (Johnson *et al.*, 1995) de 80°C para 94°C, obtendo-se melhores resultados.

Reações R2 e R3: DESNATURAÇÃO INICIAL - incubação a 94°C por 5 minutos; 30 CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO - hibridização a 55°C por 30 segundos, polimerização a 72°C por 50 segundos e desnaturação a 94°C por 50 segundos; EXTENSÃO FINAL a 72°C por 10 minutos e resfriamento a 4°C.

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

Durante esse processo de padronização da metodologia para detecção molecular de *C. parvum*, foram observados resultados falsos negativos ou não reprodutíveis, especialmente em amostras com baixa quantidade de oocistos. Assim, para aumentar a sensibilidade do método, padronizou-se a Nested-PCR, empregando-se na primeira reação de amplificação o protocolo descrito por Pedrazza-Diaz *et al.*, (2001b). Dessa forma, um segmento de 769pb do gene *COWP* foi amplificado com os *primers* BCOWPF (5'ACC GCT TCT CAA CAA CCA TCT TGT TCC TC3') e BCOWPR (5'CGC ACC TGT TCC CAC TCA ATG TAA ACC CC3') e, em seguida, uma segunda reação foi procedida a partir desse primeiro amplificado, com os *primers* Cry9 e Cry15 (Reação R2), gerando o produto final de 553pb.

A reações que geram o produto de 769pb foram realizadas em volume final de 25µL com 2,5µL do DNA extraído; 20mM de Tris-HCl pH 8,4; 50mM de KCl; 1,5mM MgCl₂; 0,25mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP); 10pmol de cada *primer* e 1,5U de *Taq* DNA polimerase. Essa mistura foi processada em termociclador (Mastercycle Gradient – Eppendorff) sob as seguintes condições: DESNATURAÇÃO INICIAL - incubação a 94° C por 5 minutos; 30 CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO - hibridização a 65°C por 60 segundos, polimerização a 72°C por 60 segundos e desnaturação a 94° C por 60 segundos; EXTENSÃO FINAL a 72° C por 10 minutos e resfriamento a 4° C. Em seguida, 2,5uL do material obtido nessa reação foi reamplificado com os *primers* Cry9/Cry15, como descrito para a Reação R2, exceto pelo volume

final, que nesta reação foi de 25uL, e pelo volume de *primers*, sendo nesta reação 10pmol de cada *primer*. O material amplificado foi revelado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo, visualizado em transiluminador ultravioleta e digitalizado (Kodak Digital Science 1D™).

3.2.6.4. Avaliação da sensibilidade da *Nested-PCR* para a detecção de *Cryptosporidium* spp diretamente de fezes

Foram preparadas sete amostras a partir das fezes diarréicas do bezerro experimentalmente infectado (item 3.2.4), mantidas em dicromato de potássio a 5%. A amostra inicial (A) continha cerca de 2×10^5 oocistos por mL, número este estimado pela leitura de lâminas preparadas segundo o método de flutuação em solução de sacarose (item 3.2.2). Realizou-se diluição seriada dessa *amostra A* com fezes livres de oocistos, obtendo-se sete amostras com diferentes cargas de oocistos. Essas amostras positivas foram classificadas de A a G e incluiu-se uma negativa (*amostra H*). Essas amostras foram submetidas aos processos de extração, purificação e amplificação do DNA, por *Nested-PCR*, como descrito nos itens imediatamente anteriores.

3.2.7. Aplicação dos métodos moleculares na detecção de *Cryptosporidium* spp nas amostras fecais procedentes dos estudos de campo

Uma vez padronizada a metodologia, amostras fecais de origem humana e animal foram submetidas ao processo de detecção molecular de *Cryptosporidium* spp. Entre as amostras de origem humana, uma era proveniente do estudo transversal e oito do estudo prospectivo (itens 3.1.1.3 e 3.1.1.4) realizados nas creches do município de Taubaté-SP, dentre as quais cinco tiveram diagnóstico parasitológico negativo. Além das amostras colhidas em Taubaté, foram incluídas outras dez amostras positivas para *Cryptosporidium* spp, sendo cinco procedentes de crianças moradoras de uma favela da cidade de São Paulo e cinco de pacientes com SIDA,

tratavam de material excedente de outro estudo conduzido no laboratório. Dentre as amostras de animais, nove eram de bovinos e uma era de cão. Como controle positivo das reações de extração e amplificação de DNA, nesta fase do trabalho, foi utilizado o mesmo material da etapa de padronização, ou seja, oocistos purificados isolados das fezes do bezerro experimentalmente infectado.

3.2.8. Genotipagem de isolados clínicos de *Cryptosporidium* spp

3.2.8.1. Análise por *PCR-RFLP*

Os produtos de 553pb amplificados a partir do gene *COWP* (Reação R2) de 14 amostras humanas, uma bovina e uma canina, foram submetidos ao processo de digestão com a enzima de restrição *AfaI* (*RsaI*) (Amersham Bioscience, Cat. #E1116Y). Uma alíquota de 5µL de cada produto de *Nested-PCR* (item 3.2.7) foi submetida à reação de digestão por 12 horas, em temperatura ambiente, aproximadamente 20°C, como recomendado pelo fabricante. Os produtos da digestão foram detectados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador de ultravioleta e, em seguida, digitalizados (Kodak Digital Science 1D™). O marcador molecular empregado foi o *Ladder*100pb (Biotools). O perfil eletroforético obtido para cada amostra foi comparado com os padrões de clivagem desse segmento do gene *COWP*, obtidos para diferentes espécies de *Cryptosporidium*, como descritos por Spano *et al.* (1997) e Xiao *et al.* (2000c).

3.2.8.2. Seqüenciamento de DNA

Os produtos de quatro amostras amplificadas, sendo duas de crianças de Taubaté, uma bovina e uma canina, foram submetidos a reações de seqüenciamento direto, a partir dos *primers* Cry9/Cry15, com o dideoxi terminador BigDye™ (Applied Biosystems, US) no seqüenciador automático ABI Prism 377 DNA (Applied Biosystems, US). As seqüências obtidas foram comparadas com informações disponíveis no GeneBank.

4. RESULTADOS

4.1. Implantação e avaliação de técnicas parasitológicas

4.1.1. Concentração de oocistos

Foram realizadas modificações no método de concentração em formalina-acetato de etila com a finalidade de adequá-las às condições e necessidades do laboratório, principalmente para a realização de inquérito envolvendo grande número de amostras. Na tabela 1 são mostrados os resultados da modificação no tempo e velocidade de centrifugação e da forma de obtenção da alíquota utilizada na confecção de esfregaços.

Tabela 1: Número de oocistos de *Cryptosporidium parvum* recuperados após concentração por centrifugação em formalina-acetato de etila, comparando-se diferentes procedimentos

Local de Aspiração da alíquota**	Procedimentos*			
	A		B	
	I	II	I	II
Superficial	0	0	19	18
Fundo	24	46	11	13
Homogeneizado	18	15	10	15
SOMA	42	61	40	46
MÉDIA	14,0	20,3	13,3	15,3

* Procedimentos: A = 3000rpm durante 8 minutos e B = 2000rpm durante 2 minutos; I e II duplicatas.

** Alíquotas para confecção de esfregaços aspiradas da camada Superficial, do Fundo ou após Homogeneização do sedimento obtido após concentração do material.

Tanto no procedimento A quanto no B, quando os esfregaços foram preparados com o sedimento homogeneizado, observou-se excesso de

material interferente, como fibras e restos celulares, dificultando a visualização dos oocistos. Esfregaços de melhor qualidade foram obtidos quando preparados com alíquotas aspiradas da superfície ou do fundo do sedimento.

Na centrifugação das amostras do procedimento A os oocistos ficaram concentrados no fundo do sedimento, diferentemente do que aconteceu em B, onde os oocistos ficaram distribuídos tanto na camada superior como no fundo do sedimento.

Considerando-se que em estudos populacionais pode ser grande a demanda de amostras, o processamento feito com 2 minutos de centrifugação (procedimento B) e aspiração do material na camada superficial do sedimento, pode ser útil já que se mostrou eficaz para a concentração de oocistos, permitindo o diagnóstico concomitante de diferentes espécies de parasitos intestinais, num único processamento. No estudo piloto e no estudo transversal do presente trabalho as amostras foram processadas conforme descrito no procedimento B.

4.1.2. Implantação de técnica de coloração de oocistos

Dentre os protocolos da técnica de Kinyoun modificada descritos na literatura, o que apresentou melhores resultados, considerando-se tempo de execução, número de oocistos corados e, principalmente, visualização de esporozoítos no seu interior, foi o seguinte:

- a) secagem dos esfregaços em estufa a 60°C, por 5 minutos;
- b) fixação do esfregaço com álcool metílico, por 30 segundos;
- c) cobertura do esfregaço com gotas de corante Fucsina não-comercial, por dois minutos;
- d) descoloração em álcool-ácido sulfúrico a 10%, por cerca de dez segundos;
- e) coloração de contraste com azul de metileno a 3%, durante 2 minutos.

Após cada etapa do processo, exceto na secagem (a), realizou-se a lavagem do esfregaço com água destilada, deixando-se escorrer por alguns

segundos antes da etapa seguinte.

Os resultados obtidos na comparação entre os protocolos de coloração, estão apresentados na tabela 2. Com esta padronização, tornou-se possível a realização de diagnóstico para criptosporidiose no Laboratório de Parasitologia da UNITAU, utilizando-se corante não comercial, de fácil preparação e de baixo custo.

Tabela 2: Avaliação de diferentes protocolos da técnica Kinyoun para coloração de oocistos de *Cryptosporidium* em esfregaços fecais.

Série	Corante	Tempo de coloração	Álcool-ácido	Tempo de descoloração	Oocistos corados (média)	Oocistos não corados (média)
A	não comercial*	30 min	AAS 5%	30s	57	0
B	não comercial**	2 min	AAS 5%	10s	4	31
C	não comercial**	2 min	AAS 10%	10s	47	0
D	não comercial**	3 min	AAC 0,5%	2min	38	21
E	comercial***	1 min	AAS 5%	1min	5	25
F	comercial***	1 min	AAS 10%	1min	32	4

AAS = álcool ácido sulfúrico (empleado na maioria dos protocolos de coloração de Kinyoun)

AAC = álcool ácido clorídrico (modificação proposta por Martinez & Belda Neto, 2001)

* corante Kinyoun não comercial: fuccina 1% (Rotina Instituto Adolfo Lutz – Regional Sorocaba)

** corante Kinyoun não comercial: fuccina 4% (De Carli & Moura, 2001)

*** corante comercial: *Fucsin-Carbol/Kyniuon Acid Fast* (WWR Scientific Products, USA)

4.2. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp em população humana

Realizou-se estudo piloto com a população atendida durante o mês de janeiro de 2002 na clínica pediátrica do PAMO São Gonçalo. Participaram do estudo crianças, com ou sem sintomatologia, e membros de suas famílias. Dos 340 frascos distribuídos, 303 (89,1%) retornaram com amostras para serem examinadas. A frequência geral para enteroparasitos foi de 28,4%. Todos os resultados foram negativos para *Cryptosporidium* spp. e quanto a outros protozoários, os mais freqüentes foram *Entamoeba coli* (40%)

e *Giardia duodenalis* (16%). Do total de amostras, 16 (5,3%) eram de fezes diarréicas, todas ausentes de elementos parasitários.

No trabalho realizado em creches, por meio de estudo transversal em quatro creches selecionadas, foram coletadas 456 amostras fecais. Destas, 140 (30,8%) estavam positivas para alguma espécie de enteroparasito. A frequência de helmintos foi de 7,0% e de protozoários 27,7%, sendo encontrado um caso de *Cryptosporidium* spp, em fezes de consistência normal (Tabela 3). Do total de amostras, cinco foram classificadas como diarréicas [ou líquidas, segundo De Carli, (2001)] e não apresentaram qualquer elemento parasitário. Os resultados quanto à distribuição por localidade estão apresentados na Figura 3 e na Tabela 4 e por faixa etária, na Tabela 5.

No estudo prospectivo, em busca ativa de casos de diarréia, 27 amostras foram encaminhadas ao laboratório de Parasitologia, das quais três estavam positivas para *Cryptosporidium* spp. Em uma dessas a detecção foi feita por *Nested-PCR* e não por método parasitológico. Nessas amostras não foram encontrados outros enteroparasitos (Figura 3 e Tabela 4).

4.2.1. Condições sanitárias e de funcionamento das creches

Todas as creches visitadas são servidas por água encanada e tratada, fornecida pela SABESP, e a coleta de lixo é realizada diariamente pela Prefeitura. Com exceção de uma (CECAP), as creches estão instaladas em prédios próprios, projetados para tal finalidade, sendo o piso cimentado ou revestido com cerâmica; nenhuma dispõe de tanque de areia para fins recreacionais. A limpeza e desinfecção da área destinada à troca de fraldas são feitas diariamente, ao final do período de atendimento.

A alimentação é servida exclusivamente por funcionários de empresa terceirizada, não sendo necessária a participação dos funcionários da creche, os quais se dedicam à educação, recreação e higiene. Crianças das diferentes faixas etárias se relacionam entre si, sempre acompanhadas pelas atendentes.

Figura 3: Localização das creches municipais de Taubaté-SP selecionadas para o estudo da criptosporidiose, representadas pelos retângulos numerados de 1 a 13. As setas em rosa indicam os locais em que se realizou o Estudo Transversal (item 3.1.1.3). Os círculos em azul indicam os locais onde foram diagnosticados casos de *Cryptosporidium* spp. Localidades: 1. Centro; 2. Vila São José; 3. Água Quente; 4. Chácara Silvestre; 5. Campos Eliseos; 6. Baronesa; 7. São Gonçalo II; 8. CECAP III; 9. Pq Piratininga; 10. Estiva; 11. Esplanada Santa Terezinha; 12. Pq. Sabará; 13. Vila Marli.

Tabela 3: Frequência de enteroparasitos em 456 amostras de fezes da população infantil de quatro creches do município de Taubaté-SP, verificada por meio de estudo transversal, realizado no ano de 2002.

ESPÉCIE	Casos diagnosticados		
	número	%	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	14	3,1	
<i>Trichuris trichiura</i>	15	3,3	
Ancilostomatidae	02	0,4	
<i>Enterobius vermicularis</i>	8	1,8	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0,2	
<i>Giardia duodenalis</i>	51	11,2	
<i>Entamoeba coli</i>	31	6,8	
<i>Iodamoeba butschlii</i>	6	1,3	
<i>Endolimax nana</i>	16	3,5	
<i>Blastocystis hominis</i>	54	11,9	
<i>Cryptosporidium</i> spp	1	0,2	
	com uma espécie	91	20,0
CASOS POSITIVOS	com duas espécies	30	6,6
	com três espécies	11	2,4
	com quatro ou mais espécies	5	1,1
CASOS NEGATIVOS		319	70,0
TOTAL		456	100,0

Tabela 4: Ocorrência de *Cryptosporidium* spp em população atendida em creches do município de Taubaté-SP, no ano de 2002.

LOCALIDADE	ESTUDO TRANSVERSAL		ESTUDO PROSPECTIVO		TOTAL	
	Amostras examinadas	Amostras positivas	Amostras		Amostras	
			examinada s	positivas	examinada s	positivas
1. Centro	-	-	0	-	0	-
2. Vila São José	61	0	5	1	66	1
3. Água Quente	-	-	1	1	1	1
4. Chácara Silvestre	-	-	6	1	6	1
5. Campos Elíseos	-	-	0	-	0	-
6. Baronesa	-	-	0	-	0	-
7. São Gonçalo II	65	0	1	0	66	0
8. CECAP III	88	0	3	0	91	0
9. Pq Piratininga	242	1	9	0	251	1
10. Estiva	-	-	1	0	1	0
11. Esp. Sta Terezinha	-	-	0	-	0	-
12. Pq. Sabará	-	-	1	0	1	0
13. Vila Marli	-	-	0	-	0	-
TOTAL	456	1	27	3	483	4
FREQÜÊNCIA (%)	-	0,22	-	11,11	-	0,83

- não se aplica

Tabela 5: Resultados de Estudo Transversal para levantamento de enteroparasitos na população atendida em quatro creches municipais de Taubaté-SP, distribuída por faixa etária, com indicação especial da frequência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.

FAIXA ETÁRIA (MESES)	POPULAÇÃO CONVIDADA	AMOSTRAS EXAMINADAS (adesão ao projeto %)	FREQÜÊNCIA					
			Enteroparasitos		<i>G. duodenalis</i>		<i>Cryptosporidium</i> spp	
			N	%	N	%	N	%
04 a 29	84	38 (45,2)	12	31,6	10	26,3	0	0
30 a 41	136	74 (54,4)	22	29,8	10	13,5	0	0
42 a 53	190	108 (56,8)	30	27,8	7	6,5	0	0
54 a 65	210	124 (60,5)	37	29,8	13	10,5	0	0
66 a 72	161	112 (69,6)	36	32,1	9	8,0	1	0,89
TOTAL	781	456 (58,4)	137	30,0	49	10,7	1	0,22

4.3. Estudo envolvendo população animal

Os resultados dos inquéritos para pesquisa de *Cryptosporidium* sp realizados em bovinos de propriedades de Taubaté e municípios vizinhos, e também de cães e gatos apreendidos nas vias públicas da cidade estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados obtidos na pesquisa de *Cryptosporidium* spp em fezes de animais de Taubaté-SP e municípios circunvizinhos, no período de maio de 2001 a julho de 2002.

Hospedeiro	Número de amostras	Casos positivos	
		número	%
cão	128	1	0,8
gato	19	0	0,0
bovino	480	23	4,8

4.4. Implantação e avaliação de técnicas moleculares

4.4.1. Padronização da *PCR*

O DNA de *Cryptosporidium parvum* extraído de oocistos isolados de fezes bovina (item 3.2.6.1), diluído em diferentes concentrações, foi submetido a três reações de amplificação: R1 (CPB-DIAG), R2 (Cry9-Cry15) e R3 (Cry12-Cry14). Os resultados obtidos nesta padronização revelaram a presença de material amplificado nas três reações de *PCR*, correspondendo ao esperado, ou seja, em R1 foi verificada a presença de bandas com cerca de 435pb, em R2 bandas com 553pb e em R3 bandas com 533pb (Figura 4).

435 pb

A - Reação R1

- 1 – Controle positivo
- 2 - Diluição 1/200
- 3 - Diluição 1/100
- 4 - Diluição 1/50
- 5 - Diluição 1/25
- 6 - Controle negativo
- 7 - Ladder 100
- 8 - Diluição 1/10
- 9 - Diluição 1/5

553 pb

B - Reação R2

- 1- Diluição 1/5
- 2 - Diluição 1/10
- 3 - Diluição 1/25
- 4 - Controle negativo
- 5 - Ladder 100
- 6 - Diluição 1/50
- 7 - Diluição 1/100
- 8 - Diluição 1/200
- 9 - Controle negativo
- 10 - Controle positivo

533 pb

C - Reação R3

- 1 – Controle positivo
- 2 – Diluição 1/5
- 3 – Diluição 1/10
- 4 – Diluição 1/25
- 5 – Controle negativo
- 6 – Ladder 100
- 7 – Diluição 1/50
- 8 – Diluição 1/100
- 9 – Diluição 1/200

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados em reações de padronização da *PCR* para detecção de *Cryptosporidium* spp. A extração de DNA foi feita a partir de oocistos purificados, obtidos de fezes de bezerro experimentalmente infectado. O produto da extração foi diluído em seis diferentes concentrações e submetido a três reações de amplificação: A - *primers* CPB-DIAG, produto esperado de 435pb do gene 18SrRNA; B - *primers* Cry9-Cry15, produto esperado 553pb do gene *COWP* e C - *primers* Cry12-Cry14, produto esperado 533pb do gene *COWP* (ver item 3.2.6.3)

4.4.2. Amplificação de DNA de *Cryptosporidium* presente em amostras fecais

Uma vez padronizados os procedimentos de extração e amplificação do DNA de *Cryptosporidium*, amostras fecais derivadas de humanos, bovinos e de canino foram submetidas à detecção molecular do parasito. Nos primeiros ensaios houve falha em se obter produtos amplificados das amostras em teste (Tabela 7), verificando-se, após eletroforese em gel de agarose, a presença de produtos somente dos controles positivos (Figura 5). Assim, procedeu-se a purificação do DNA extraído, utilizando-se o sistema QIAquick (Da Silva, 1999), o que resultou na amplificação de DNA de *Cryptosporidium* em número maior de amostras (Tabela 7). Nos ensaios em que se empregou a reação R2 foram obtidos melhores resultados; a Figura 6 representa um deles.

Tabela 7 – Resultados obtidos na fase de padronização de métodos moleculares para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp em amostras fecais, por meio de três protocolos de *PCR*.

Hospedeiro	Número de amostras*	Amostras positivas por protocolo de reação					
		R1		R2		R3	
		(CPB/DIAG)**		(Cry9/Cry15)		(Cry12-Cry14)	
		gene 18S rRNA		região N-terminal do gene <i>COWP</i>		região C-terminal do gene <i>COWP</i>	
		DIRETO	PURIFICADO	DIRETO	PURIFICADO	DIRETO	PURIFICADO
Humano	10	0	2	4	6	0	1
Bovino	5	0	2	2	3	0	0
Canino	1	0	0	0	1	0	0
Total	16	0	4	6	10	0	1

* Amostras positivas para *Cryptosporidium* pelo método parasitológico

**Entre parênteses são indicados os pares de *primers* empregados nas reações de *PCR*: R1 *primers* dirigidos para o gene que codifica a subunidade 18S do rRNA; R2 e R3 *primers* dirigidos para o gene que codifica para proteína de parede do oocisto – *COWP*, regiões N-terminal e C-terminal, respectivamente (Ver item 3.2.6.3).

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por *PCR* para detecção de *Cryptosporidium* spp em fezes. A extração de DNA foi feita diretamente da amostra fecal, sem prévio processamento: A - *primers* CPB-DIAG, dirigido para o gene que codifica a subunidade 18S do rRNA, com produto esperado de 435pb; B - *primers* Cry9-Cry15, dirigidos para a região N-terminal o gene que codifica para proteína de parede do oocisto – *COWP*, com produto esperado 553pb e C - *primers* Cry12-Cry14, dirigidos para a região C-terminal do gene *COWP*, com produto esperado 533pb (Ver item 3.2.6.3).

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose de produtos amplificados por *PCR* para detecção de *Cryptosporidium* spp em amostras fecais de humanos, bovinos e de cão. O DNA foi extraído diretamente das fezes, congeladas ou mantidas em dicromato de potássio a 5%. Após extração, o DNA foi purificado com o sistema QIAquick (ver item 3.2.6.2). Os *primers* empregados nesta reação foram Cry9-Cry15, cujo produto esperado é de 553pb, da região N-terminal do gene *COWP* (Reação R2, item 3.2.6.3)

1 – Fezes humana 1 (em dicromato)	7 – Fezes bovina 2 (em dicromato)
2 – Fezes de cão	8 – Fezes bovina 2 (congelada)
3 – Fezes humana 2 (congelada)	9 – Controle Positivo
4 – controle negativo	10 – Controle negativo
5 – Fezes bovina 1 (congelada)	11 – Fezes humana 3 (em dicromato)
6 – Fezes humana negativa para <i>Cryptosporidium</i> pelo método de Kinyoun	12 – Fezes humana 4 (congelada)
	13 – <i>Ladder</i>
	14 – Fezes humana 1 (em dicromato)

4.4.3. Avaliação da sensibilidade da Nested-PCR na detecção de *C. parvum* em fezes com diferentes concentrações de oocistos.

Sete amostras fecais de bovino com quantidades crescentes de oocistos foram submetidas a processo de extração e purificação de DNA e amplificação por meio de *Nested-PCR*. Em gel de agarose, após eletroforese, foram observados produtos amplificados com cerca de 553pb, de todas as amostras submetidas ao processo (Figura 7). Essa estratégia de amplificação mostrou-se viável para detecção de DNA de *C. parvum* em amostras fecais com número reduzido de oocistos.

FIGURA 7 – Eletroforese em gel de agarose de produtos resultantes de *Nested-PCR* procedida em amostras fecais de bovino contendo quantidades crescentes de oocistos de *C. parvum*. Na parte superior do gel está apresentada a primeira amplificação, obtida com o emprego do par de *primers* BCOWPF/BCOWPR, cujo produto esperado é de 769 pb. Na parte inferior, encontram-se os produtos obtidos na segunda amplificação, com os *primers* Cry9/Cry15, que geram produtos de 553pb da região N-terminal do gene *COWP*.

- 1 – Controle negativo
- 2 – Amostra fecal contendo cerca de 5 oocistos/mL
- 3 – Amostra fecal contendo cerca de 5×10^1 oocistos/mL
- 4 – Amostra fecal contendo cerca de 5×10^2 oocistos/mL
- 5 – Amostra fecal contendo cerca de 5×10^3 oocistos/mL
- 6 – Amostra fecal contendo cerca de 5×10^4 oocistos/mL
- 7 – Amostra fecal contendo cerca de 1×10^5 oocistos/mL
- 8 – Amostra fecal contendo cerca de 2×10^6 oocistos/mL
- 9 – Ladder

4.5. Aplicação dos métodos moleculares na detecção de *Cryptosporidium* spp nas amostras fecais procedentes dos estudos de campo

4.5.1. Reações de amplificação de DNA por *Nested-PCR*

Procedeu-se a amplificação do DNA extraído de 29 amostras de fezes, sendo 19 amostras humanas, nove bovinas e uma canina. Dentre as amostras humanas, nove eram de crianças de Taubaté, tendo sido visualizados oocistos em três delas. Dentre as outras dez amostras humanas, cinco eram de crianças moradoras em uma favela de São Paulo e cinco eram de pacientes com SIDA, de Sorocaba, todas positivas pelo método parasitológico. A eletroforese revelou produto amplificado por *Nested-PCR* com cerca de 553 pb em 14 das amostras humanas, oito das bovinas e na amostra canina (Tabela 8). Na figura 8 podem ser observados os resultados obtidos em um dos ensaios que gerou os produtos amplificados de *Cryptosporidium* em amostras humanas.

Tabela 8– Resultados obtidos na amplificação de fragmentos do gene *COWP* de *Cryptosporidium* spp extraídos em amostras fecais, por meio de *Nested-PCR*

HOSPEDEIRO	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO*	NÚMERO DE AMOSTRAS		
		PROCESSADAS	AMPLIFICADAS**	
			1ª REAÇÃO	2ª REAÇÃO
Humano	(TT)	3	1	3
	Positivo (SP)	5	3	5
	(SO)	5	3	5
	Negativo (TT)	6	0	1
Bovino	Positivo (Cp)	3	1	3
	Positivo (Ca)	3	2	3
	Positivo (Cp+Ca)	3	1	2
Canino	Positivo	1	0	1
Totais		29	11	23

* Diagnóstico parasitológico realizado pela técnica de Kinyoun nas amostras humanas e pelo método de Sheather nas amostras de animais: Positivo/Negativo = presença/ausência de oocistos na matéria fecal; Procedência das amostras humana: TT – Taubaté; SP – São Paulo e SO – Sorocaba. Cp: oocistos compatíveis com *Cryptosporidium parvum*; Ca: oocistos compatíveis com *Cryptosporidium andersoni*.

** *Nested-PCR*: O DNA foi extraído diretamente das fezes, congeladas ou mantidas em dicromato de potássio a 5%. Após extração, o DNA foi purificado com o sistema QIAquick (ver item 3.2.6.2). Na primeira reação foi empregado o par de *primers* BCOWPF/BCOWPR, cujo produto esperado é de 769 pb e na segunda, os *primers* Cry9/Cry15, que geram produtos de 553pb, da região N-terminal do gene *COWP*.

FIGURA 8 – Eletroforese em gel de agarose de produtos resultantes de *Nested-PCR* realizada a partir de amostras fecais humanas. O DNA foi extraído diretamente das fezes, congeladas ou mantidas em dicromato de potássio a 5%. Após extração, o DNA foi purificado com o sistema QIAquick. Na imagem A está apresentada a primeira amplificação, obtida com o emprego do par de *primers* BCOWPF/BCOWPR, cujo produto esperado é de 769 pb. Na imagem B, encontram-se os produtos da segunda amplificação, com os *primers* Cry9/Cry15, que geram produtos de 553pb, da região N-terminal do gene COWP.

1 – Controle negativo	8 - SP 6
2 – TT 001 (ausente de oocistos)	9 - SP 7
3 – SO 689	10 - SP 12
4 - SO 322	11 - SP 31
5 - SO 623	12 - SP 17
6 - TT P07	13 - SO 507
7 - TT P03	14 - <i>Ladder</i> 100 pb
Amostras fecais procedentes de Taubaté (TT), São Paulo (SP) e Sorocaba (SO)	

4.5.2. Genotipagem dos isolados de *Cryptosporidium* spp

4.5.2.1. PCR-RFLP

A identificação genotípica dos isolados de *Cryptosporidium* spp obtidos em Taubaté, incluindo-se quatro de crianças, um de bovino e um de cão, além de outros dez isolados procedentes de outras localidades, foi realizada por meio de análise do polimorfismo dos segmentos de DNA, empregando-se a enzima de restrição *Afa I* (*Rsa I*). No Quadro 3 são mostrados os resultados obtidos ao se comparar o perfil eletroforético dos isolados do presente estudo com os padrões descritos na literatura (Spano *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2000) e a Figura 9 representa um dos ensaios de restrição enzimática realizado com os produtos de *Cryptosporidium* spp extraídos de amostras humanas.

4.5.2.2. Seqüenciamento de DNA

Os produtos amplificados de quatro amostras foram submetidos ao seqüenciamento de DNA, sendo duas amostras humanas de crianças de creches de Taubaté, uma de bovino (isolado CpVP) e uma de cão, confirmando-se que os produtos amplificados de 553pb se tratavam de seqüências do genoma de *Cryptosporidium*. Nessas reações, seqüências com um mínimo de 480pb foram obtidas e comparadas às seqüências disponíveis no GeneBank, verificando-se alta homologia (>95%) com *Cryptosporidium*. Na Figura 10 está apresentado o alinhamento das seqüências, tanto das obtidas no presente estudo como daquelas descritas para *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis*.

Quadro 3: Identificação genotípica de *Cryptosporidium* spp, por meio de *PCR-RFLP*, isolados de amostras fecais humanas procedentes dos municípios de Taubaté (TT), São Paulo (SP) e Sorocaba (SO) e de animais.

Isolados*	Espécie	Tamanho dos fragmentos**
TT P03	<i>C. hominis</i>	284; 129; 106; 34
TT P06	<i>C. hominis</i>	284; 129; 106; 34
TT P07	<i>C. parvum</i>	413; 106; 34
TT T01	<i>C. parvum</i>	413; 106; 34
SP 006	<i>C. hominis</i>	284; 129; 106; 34
SP 007	<i>C. hominis</i>	284; 129; 106; 34
SP 012	<i>C. parvum</i>	413; 106; 34
SP 017	<i>C. hominis</i>	284; 129; 106; 34
SP 031	<i>C. hominis</i>	284; 129; 106; 34
SO 049	<i>C. parvum</i>	413; 106; 34
SO 322	<i>C. hominis</i>	284; 129; 106; 34
SO 507	<i>C. hominis</i>	284; 129; 106; 34
SO 623	<i>C. meleagridis</i>	372; 147; 34
SO 689	<i>C. meleagridis</i>	372; 147; 34
CpVP (bovino)	<i>C. parvum</i>	413; 106; 34
Canino	<i>C. parvum</i>	413; 106; 34

*Procedência dos isolados: TT P - estudo prospectivo realizado em creches de Taubaté; TT T - estudo transversal também realizado em creches de Taubaté; SP - crianças de uma favela de São Paulo; SO - pacientes com SIDA do município de Sorocaba.

**Segmento de 553pb da região N-Terminal do gene *COWP*, submetidos a digestão com a enzima *Afa I* (*Rsa I*) (Spano *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2000)

Figura 9 – Perfil eletroforético de produtos amplificados por *Nested-PCR* (2ª amplificação) com o par de *primers* Cry9/Cry15 (região N-terminal do gene *COWP*) e digeridos com a enzima *Afa I* (*Rsa I*) a partir de isolados de *Cryptosporidium* spp detectados em amostras fecais de origem humana. Ver Quadro 3 para detalhamento das espécies identificadas.

1 - Ladder 100 pb	8 - SP 6
2 - Controle positivo (não digerido)	9 - SP 7
3 - SO 689	10 - SP 12
4 - SP 31	11 - SO 322
5 - SO 623	12 - SP 17
6 - TT P07	13 - SO 507
7 - TT P03	
Amostras fecais procedentes de Taubaté (TT), São Paulo (SP) e Sorocaba (SO)	

<i>C. parvum</i>	1	GTAGATAATG	GAAGAGATTG	TGTTGCATTC	ACTATGCCTG	AAAAATCATG	TCCCCCAGGA
<i>C. hominis</i>	1						
Am TT P07							
Am TT P03							
Am CpVP				T			C
Am Canina							
<i>C. parvum</i>	61	TTCGTTTTTT	CTGGAAAACA	ATGTGTTCAA	TCAGACACAG	CTCCTCCTAA	TCCAGGATGT
<i>C. hominis</i>	61	C....					
Am TT P07	61						
Am TT P03					C-..		-
Am CpVP	61			T			
Am Canina	61						
<i>C. parvum</i>	121	CCTCCAGGCA	CTATACTGGA	GAATGGCACA	TGTAAATTAA	TCAACAAAT	TGATACCGTT
<i>C. hominis</i>	121	 <u>.T.</u>	<u>-</u>				
Am TT P07	121						
Am TT P03	121	 <u>.T-</u>	<u>-</u>				
Am CpVP	121						
Am Canina	121						
<i>C. parvum</i>	181	TGTCCTTCTG	GTTTTGTGA	AGAAGGAAAT	AGATGTGTTT	AATATCTCCC	TGCAAAATAA
<i>C. hominis</i>	181						C...
Am TT P07	181						
Am TT P03	181						C...
Am CpVP	181						
Am Canina	181						
<i>C. parvum</i>	241	ATCTGTCCTC	CTGGATTCAA	TTTGTGAGGA	CAACAATGTA	TGGCACCAGA	ATCAGCTGAA
<i>C. hominis</i>	241						
Am TT P07	241						
Am TT P03	241						
Am CpVP	241						
Am Canina	241						
<i>C. parvum</i>	301	TTAGAATCGA	CATGCCACCC	TAAATCAATA	TTTGAAAATG	GAAAATGTAA	AGTGATTAAA
<i>C. hominis</i>	301						
Am TT P07	301						
Am TT P03	301						
Am CpVP	301						
Am Canina	301						
<i>C. parvum</i>	361	AATATTGATA	TGGTCTGCCC	ACCAGGATAT	ACAGACTCAG	GAGATGATTG	<u>TGTACTATAT</u>
<i>C. hominis</i>	361				T....		
Am TT P07	361						
Am TT P03	361				T....		
Am CpVP	361						
Am Canina	361						
<i>C. parvum</i>	421	GTAGCTCCTG	CAAAGGAATG	CCCACCAAAT	TTCATTTTAC	AAGGCCTCCA	ATGTATACAA
<i>C. hominis</i>	421						G.....T...
Am TT P07	421						
Am TT P03	421			A			G.....T...
Am CpVP	421						
Am Canina	421						
<i>C. parvum</i>	481	ACTAGTTCTG	CTCCAACTCA	ACCTGTCTGC	CCTCCAG <u>GTA</u>	<u>C</u> AGTATTACA	AGATAATGCC
<i>C. hominis</i>	481						
Am TT P07	481						
Am TT P03	481		..G.....	-AA...	G....	..	
Am CpVP	481		..G.....	-...			...
Am Canina	481						
<i>C. parvum</i>	541	TGTATTTCAG	TCC				
<i>C. hominis</i>	541		...				

Figura 10: Alinhamento de seqüências correspondentes à região N-Terminal do gene *COWP* de *Cryptosporidium* spp descritos no GeneBank: *C. parvum* (número de acesso: AF248743) e *C. hominis* (referida como *C. parvum* genótipo 1; número de acesso: AF248741) e de isolados de amostras fecais de crianças (Am TT P03 e Am TT P07) de bovino (Am CpVP) e de cão (Am Canina) obtidos no presente estudo. A numeração foi feita de acordo com a seqüência descrita de 553pb do gene *COWP* de *Cryptosporidium parvum* amplificada com o par de primers Cry9/Cry15.

5. DISCUSSÃO

A importância de *Cryptosporidium* spp como agente causal de diarreia grave e prolongada, constituindo importante causa de morbidade e mortalidade em crianças mal-nutridas e nos indivíduos com imunodeficiência, como nos casos de infecção pelo vírus HIV ou em pacientes transplantados (Saredi & Bava, 1998; Baraldi *et al.*, 1999; Cegielski *et al.*, 1999; Cimerman *et al.*, 1999; Tzipori & Ward, 2002), está largamente discutida na literatura. Entretanto, a frequência da criptosporidiose em crianças sem imunocomprometimento não está bem estabelecida. A dificuldade para conhecer a real prevalência da doença talvez se deva ao fato de *Cryptosporidium* spp apresentar dimensões muito pequenas e nem sempre ser detectado pelos métodos de exame parasitológico de fezes, empregados na rotina laboratorial. Embora existam técnicas de coloração que permitam a visualização e identificação do parasito, nem todos os laboratórios as adotam e, por outro lado, diante de um caso de diarreia em crianças consideradas normais, o clínico nem sempre suspeita de criptosporidiose, deixando de solicitar diagnóstico laboratorial específico para essa protozoose (São Paulo, 2000; Wiebbelling *et al.*, 2002). Assim, possíveis casos de infecção por *Cryptosporidium* em crianças sem imunocomprometimento devem ficar sem diagnóstico.

Das 13 espécies aceitas atualmente, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* (anteriormente denominada *Cryptosporidium parvum* genótipo 1) e são as mais freqüentemente relatadas; no entanto, outras espécies, tais como *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*, além de diferentes genótipos de *C. parvum*, adaptados a animais, foram isolados de material clínico de pacientes com criptosporidiose e evidenciados por métodos moleculares (Pieniazek *et al.*, 1999; Pedraza-Dias *et al.*, 2001a; Pedraza-Dias *et al.*, 2001c; Fayer *et al.*, 2001; Morgan-Ryan *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2002a). Esses achados trazem evidências de que diferentes espécies de *Cryptosporidium* circulam no ambiente, traduzindo-se em risco tanto para homens como para animais, o que

justifica a aplicação de técnicas moleculares para identificação das espécies e conhecimento do modelo epidemiológico da criptosporidiose na área em estudo.

Cryptosporidium spp foi responsabilizado por diferentes surtos de diarreia, ocorridos nos últimos anos nos Estados Unidos e na Europa, tendo sido comprovado que a infecção era transmitida pela água de abastecimento público (Fricker & Crabb, 1998; Glaberman *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 2002; Khalakdina *et al.*, 2003; Dalle *et al.*, 2003; Lemarchand & Lebaron, 2003). A ingestão de alimentos contaminados também vem sendo descrita como possível causa de infecção (Ortega *et al.*, 1997; Fayer *et al.*, 1999; Slifko *et al.*, 2000; Gomez-Couso *et al.*, 2003; Fayer *et al.*, 2003), e outros fatores de risco têm sido estudados, como contato com animais (Irwin, 2002; Litwin, 2003; Monis & Thompson, 2003), disseminação de oocistos por manipuladores de alimentos (Queiroz *et al.*, 2000), atividades recreacionais em piscinas (Cartwright, 2003), relações interpessoais (Pereira *et al.*, 2002), além de fatores ligados ao hospedeiro, como o imunocomprometimento (Hunter & Nichols, 2002).

No Brasil, durante o ano de 2002, foram notificados ao Sistema Único de Saúde (SUS) 2231533 casos de diarreia em crianças menores de 2 anos, e desses 52551 (2,35%) ocorreram no estado de São Paulo, sendo 1899 (0,0855%) notificados pela Diretoria Regional de Saúde de Taubaté (DIR-XXIV) (Apêndices 1 a 3). Dentre essas crianças com diarreia, 5402 menores de um ano foram a óbito, 96 delas (1,78%) do estado de São Paulo; pela DIR-XXIV foram notificados oito óbitos por diarreia em crianças menores de um ano, em 2002 (Apêndices 4 a 6). No banco eletrônico de dados do SUS (DataSUS, 2004) não constam dados do município de Taubaté, do ano de 2002. Esses dados brasileiros, mesmo que considerados subestimados (Merchán-Hamann & Laguardia, 2000), permitem reafirmar que a diarreia continua sendo importante causa no quadro de morbi-mortalidade no país. As tentativas em realizar a vigilância com efetividade e representatividade são limitadas por dificuldades como inobservância da obrigatoriedade de notificação de surtos e da aceitação,

tanto pelos técnicos quanto por leigos, de que o problema da diarreia “é normal” no Brasil (FUNASA, 2004).

No estado de São Paulo, por meio da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde (SES/CVE/DTHA) foram documentados 908 surtos de diarreia nos últimos quatro anos, dos quais 16 tiveram *Cryptosporidium* spp indicado como agente, isolado ou associado a outros agentes, como *Rotavirus*, *Salmonela*, *Giardia duodenalis*, *Shigella*, *Escherichia coli* (Apêndice 7). Dentre os surtos por *Cryptosporidium* spp, um ocorreu em creche, envolvendo 87 pessoas, e outro em escola infantil, acometendo 21 crianças. Estudos realizados no Brasil já apontavam para a ocorrência de *Cryptosporidium* spp em crianças atendidas em creches (Franco, 1996), mas não em situação de surto. Esses relatos mostram que o parasito está presente no ambiente institucional, sendo importante determinar a espécie circulante, para se conhecer o ciclo de transmissão, antroponótico ou zoonótico, e as possíveis fontes de infecção.

Durante nosso estudo, nenhum caso de surto de diarreia foi detectado nas creches de Taubaté. Nos últimos quatro anos, o município notificou à DTHA, 16 ocorrências de surtos de diarreia, envolvendo 455 pessoas. No ano de 2002, dos sete surtos notificados, quatro foram por causa indeterminada (Apêndice 8). No mesmo ano, por meio de vigilância ativa de casos de diarreia, implantada em 14 Postos de Atendimento Médico e Odontológico (PAMOs) do município, foram notificados 208 casos de diarreia, sem registro da etiologia (Apêndice 9). Aparentemente, há carência de recursos laboratoriais e/ou deficiência no fluxo de informações, no que se refere à investigação epidemiológica de diarreias no município.

No presente trabalho, durante o ano de 2002, foi realizado estudo prospectivo em 13 creches municipais de Taubaté que atendem crianças de 4 a 72 meses de idade, para a pesquisa de *Cryptosporidium*. A partir da notificação direta ao nosso laboratório da ocorrência de diarreia, foram recolhidas amostras diarreicas de 27 crianças, das quais três (11,1%)

estavam positivas para o parasito. Na fase inicial do trabalho de campo, foi realizado estudo transversal em quatro creches, onde as crianças foram solicitadas a ceder amostra fecal para exame. De 456 amostras examinadas, uma (0,22%) apresentou oocistos de *Cryptosporidium* spp. Os quatro isolados clínicos do parasito foram genotipados, verificando-se a ocorrência de dois casos de *Cryptosporidium hominis*, nas localidades Vila São José e Água Quente (números 2 e 3, respectivamente, da Figura 3) e dois casos de *Cryptosporidium parvum*, nas localidades Chácara Silvestre e Parque Piratininga (números 4 e 9, respectivamente, da Figura 3). Embora seja reduzido o número de casos detectados, a ocorrência de *C. hominis* em bairros mais urbanizados e de *C. parvum* em área próxima ao ambiente rural, pode ser um indicativo da circulação de animais infectados nessas duas últimas localidades.

A frequência de *Cryptosporidium* spp observada em Taubaté pode ser considerada semelhante à encontrada por diferentes autores em estudos realizados recentemente no Brasil, como em Campo Grande, 1,1% entre crianças menores de cinco anos, sem sintomatologia (Oshiro *et al.*, 2000), e em outros municípios, entre crianças com diarreia: 11,4% em Fortaleza-CE (Lima *et al.*, 2000); 14, 4% em Goiânia-GO (Pereira *et al.*, 2002); 3,3% no Rio de Janeiro-RJ (da Silva *et al.*, 2003) e 1,8% em Ribeirão Preto-SP (Medeiros *et al.*, 2001). Em outro estudo realizado em Fortaleza-CE, entre crianças menores de dois anos, com peso abaixo do ideal para a idade, encontrou-se taxa de 34,6%, (Guerrant *et al.*, 1999) e em Criciúma-SC, entre crianças menores de cinco anos, com diarreia, a taxa encontrada foi de 85,1% (Schnack *et al.*, 2003). Este último estudo foi realizado com emprego do ELISA, para detecção de coproantígenos, considerado um método mais sensível que o morfológico para a detecção de *Cryptosporidium* (Johnston *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003).

Na fase de implantação dos métodos para detecção de *Cryptosporidium* spp em nossos laboratórios, no ano de 2001, número elevado de surtos foi notificado à DTHA, sendo expressivo o de criptosporidiose, se comparado aos outros anos levantados (Apêndice 7).

No entanto, o mesmo não ocorreu nos anos seguintes, verificando-se uma diminuição no número de relatos, embora com permanência, ou mesmo intensificação, do programa de vigilância ativa de doenças transmitidas por alimentos. Talvez isso possa estar associado à amplificação do programa brasileiro de tratamento dos indivíduos portadores de SIDA com antiretrovirais - HAART (Cimerman *et al.*, 2002) que, ao possibilitar a essa população maior capacidade em dar resolução à criptosporidiose (Mead, 2002), promoveria a diminuição da excreção de oocistos e, conseqüentemente, a redução da contaminação ambiental e da transmissão interpessoal. De fato, o encontro de casos de criptosporidiose entre pacientes com SIDA, em Taubaté, diminuiu após a implementação do tratamento com antiretrovirais [Peregrino, 2003]. Quanto à criptosporidiose em crianças de Taubaté, a freqüência era desconhecida na literatura até a realização do presente estudo, o que dificulta interpretar nossos achados, se refletem a prevalência para o município ou se houve uma queda na freqüência.

Para a realização deste estudo, foram necessárias a padronização/adequação e implantação dos diferentes métodos diagnósticos nos laboratórios de parasitologia e biologia molecular da Universidade de Taubaté. O método de flutuação em solução de sacarose (Sheather, 1923) foi implantado, possibilitando assim iniciarem-se os trabalhos de campo com populações bovina, canina e felina. Com isso, obteve-se um isolado de bezerro da região de Taubaté, que denominamos CpVP, ou seja, *Cryptosporidium parvum* do Vale do Paraíba. Esse isolado foi empregado na infecção experimental de um bezerro, obtendo-se grande quantidade de oocistos, o que possibilitou estabelecer os protocolos-padrão para o diagnóstico, morfológico e molecular, da criptosporidiose na Universidade de Taubaté.

A comparação de protocolos para a concentração de oocistos em fezes humanas pelo método de sedimentação em formalina-acetato de etila, seguida da preparação e coloração de esfregaços pela técnica de Kynioun, foi o primeiro passo para se iniciar o estudo piloto, com população humana,

realizado num bairro periférico de Taubaté, onde anteriormente se observou elevada frequência de enteroprotzoários (Araújo *et al.*, 2003). No estudo piloto foram detectados casos de *Entamoeba coli* e *Giardia duodenalis*, entre outros enteroparasitos, com frequência de 40% e 16%, respectivamente, no entanto, nenhum caso de *Cryptosporidium* foi encontrado. A frequência de crianças com *G. duodenalis*, entre aquelas investigadas no estudo piloto (11,2%) e no estudo transversal (17%), é semelhante a muitas outras localidades do município (Araújo *et al.*, 2003), sugerindo a manutenção das condições sócio-ambientais favoráveis à transmissão deste parasito no município de Taubaté, condições estas que possibilitariam também a circulação de *Cryptosporidium* spp (Franco, 1996).

A introdução dos métodos morfológicos na rotina diagnóstica, aplicada a estudos epidemiológicos realizados em nossos laboratórios, possibilitará estudar a prevalência de *Cryptosporidium* spp em diferentes comunidades do município, contribuindo para o conhecimento da real situação da parasitose em população humana considerada normal. Além disso, estudos com população animal devem ser estimulados, já que o parasito foi encontrado em bovinos e em um cão apreendido em vias públicas (Tabela 6). Cabe lembrar que os métodos morfológicos utilizados são de baixo custo e de fácil execução, exigindo apenas bom treinamento para a leitura microscópica.

Durante a implantação dos métodos moleculares, foram comparados alguns protocolos de extração e amplificação de DNA de *Cryptosporidium* spp. A metodologia de extração que forneceu os melhores resultados foi a descrita por Da Silva *et al.*, (1999), com o FastDNA Kit (Bio 101, Inc, Visa, CA). Antes disso, foram utilizadas duas metodologias diferentes e que não foram apropriadas para o desenvolvimento do trabalho, sendo a primeira a partir do Kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel Cat. 740952.50) e em seguida pelo sistema FTA CARD (Gibco BRL Cat. 10876027). Essas metodologias, por algumas vezes, permitiram a amplificação do material extraído, mas na maioria das ocasiões os resultados não se reproduziram. Deste modo, decidiu-se pelo emprego do método de extração com o Fast

DNA Kit. Neste kit, a presença de microesferas de vidro contidas na matriz de lise (Multi Mix Matrix) facilita a quebra dos oocistos, tornando mais rápido o processo de extração. Além disso, a introdução de Polivinilpirrolidona (PVP), que promove a precipitação de agentes fenólicos contidos nas amostras fecais, diminui a possibilidade de inibição das reações de amplificação (Da Silva *et al.*, 1999), viabilizando a extração do DNA diretamente das fezes, sem prévia purificação dos oocistos.

De posse de uma metodologia de extração do DNA de *Cryptosporidium*, que reproduziu os resultados obtidos, procedeu-se à amplificação do material extraído, comparando-se protocolos de amplificação do DNA. A amplificação por *PCR* foi realizada utilizando-se três pares de *primers*: CPB-DIAGF/CPBDIAGR, dirigido ao gene da subunidade 18S do rRNA (Jhonson *et al.*, 1995); Cry9/Cry15 e Cry12/Cry14, dirigidos ao gene COWP (Spano *et al.*, 1997). Essas reações foram conduzidas separadamente umas das outras. Inicialmente, foram utilizados oocistos purificados das fezes do bezerro experimentalmente infectado, obtendo-se bons resultados nos três protocolos testados, com os produtos da extração diluídos em diferentes concentrações (Figura 4). Ao se empregar os mesmos protocolos diretamente em amostras fecais foram obtidos resultados pouco satisfatórios, mesmo realizando-se sucessivas lavagens das fezes antes de submetê-las ao processo de extração (Tabela 7). Nessas reações, foram empregados como controles positivos os oocistos purificados, e como em todas as ocasiões houve a amplificação do controle, entendeu-se que havia problemas no processo de amplificação de produtos extraídos diretamente da amostra fecal, possivelmente devido à permanência de inibidores da reação de *PCR*, uma vez que na composição da matéria fecal, dependendo da dieta e das características da flora intestinal, pode haver produtos que prejudiquem a viabilidade das reações de *PCR* (Da Silva *et al.*, 1999). Apesar da PVP e da Solução de Lise Celular (CLS-VF) potencializarem a retirada de agentes fenólicos e de carboidratos das fezes, uma parte destes pode permanecer no material extraído (Da Silva *et al.*, 1999; Bajer *et al.*, 2003; Jiang & Xiao, 2003).

Assim, os produtos de DNA extraído de todas as amostras, inclusive os controles de extração, foram submetidos à purificação em sistema *QIAquick PCR Purification kit* e, posteriormente, submetidos a uma nova amplificação. Após eletroforese, comparando-se o sinal no gel do material não purificado e purificado, obteve-se com a purificação maior número de casos positivos, tanto entre as amostras fecais humanas quanto de animais (Tabela 7). Com esses resultados, confirmam-se a eficácia e importância do processo de purificação do DNA quando extraído de matéria fecal para fins de diagnóstico. Quanto ao processo de amplificação, o protocolo descrito nas Reações R2 (item 3.2.6.3), empregando-se o par de *primers* Cry9/Cry15 dirigidos a um segmento da região N-terminal do gene que codifica para uma proteína de parede do oocisto – *COWP*, apresentou melhores resultados (Tabela 7; Figura 6), porém, das 16 amostras submetidas aos processos de extração e amplificação, seis permaneceram negativas pela *PCR*, embora positivas pelo método morfológico.

Procurando-se aumentar a sensibilidade da *PCR*, os protocolos descritos por Pedraza-Dias *et al.*, (2001b) e Spano *et al.*, (1997), foram avaliados e empregados na realização de *Nested-PCR*. Assim, foram utilizados nas reações de amplificação, primeiro, o par de *primers* BCOWPF/BCOWPR que gera um produto de 769pb da região N-terminal do gene *COWP* e, em seguida, o par de *primers* Cry9/Cry15 que gera um produto de 553pb, contido no fragmento amplificado na primeira reação. Essa metodologia se mostrou mais sensível para a amplificação de DNA do parasito, obtendo-se resultados satisfatórios ao se realizar o processo de extração diretamente de fezes. Neste ensaio, realizado com amostras contendo quantidade decrescente de oocistos, obteve-se resultado positivo por *PCR* somente nas duas amostras que continham acima de 1×10^5 oocistos/mL, enquanto que pela *Nested-PCR* foram obtidos produtos amplificados em todas as amostras testadas, com quantidade estimada a partir de 5 oocistos/mL de fezes (Figura 7).

Tendo-se implantados os protocolos de extração, purificação e amplificação de DNA de *Cryptosporidium* spp diretamente de fezes e, ainda,

obtidos bons resultados na avaliação da sensibilidade da *Nested-PCR*, partiu-se para a aplicação dessa metodologia nas amostras fecais de crianças das creches de Taubaté e de outros humanos, colhidas nos municípios de São Paulo e Sorocaba e, também, de diferentes amostras bovinas. De 23 amostras positivas pelo método morfológico, todas foram positivas pela *Nested-PCR*. Porém, algumas amostras tiveram que ser submetidas várias vezes ao processo de amplificação, especialmente as que continham número reduzido de oocistos, como foi o caso de uma amostra de Taubaté, na qual foram observados dois oocistos no esfregaço corado por Kynioun e de uma outra que foi negativa pelo método morfológico e ao ser submetida pela primeira vez à *Nested-PCR* se mostrou positiva, mas com sinal fraco no gel de eletroforese. Essa amostra foi submetida à extração mais três vezes, obtendo material amplificado em mais uma delas. Para esses casos foram realizados alguns ajustes no protocolo de amplificação, como aumento da concentração de $MgCl_2$, de 1,5mM para 2,5mM, e aumento no número de ciclos de amplificação, de 30 para 35, na primeira reação da *Nested-PCR*. Dessa forma foram obtidos produtos amplificados, necessários à genotipagem dos isolados.

A genotipagem de *Cryptosporidium* foi realizada em dezesseis isolados clínicos, sendo quatro de Taubaté, cinco de crianças de São Paulo, cinco de pacientes com SIDA, de Sorocaba, e duas de animais: o isolado bovino CpVP e o obtido de cão. Dentre os quatro isolados obtidos de crianças de creches de Taubaté, submetidos à digestão enzimática (*PCR-RFLP*), obtiveram-se dois diferentes perfis eletroforéticos, sendo os de dois isolados compatíveis com *C. hominis* e os de outros dois, correspondentes a *C. parvum*, conforme padrões descritos por Xiao *et al.*, (2000c). Das outras dez amostras humanas estudadas, cinco foram identificadas como *C. hominis* e três como *C. parvum* e as outras duas, procedentes de pacientes com SIDA, apresentaram perfil correspondente ao descrito para a espécie *Cryptosporidium meleagridis* (Quadro 3; Figura 9).

A identificação de *C. hominis* com maior frequência que *C. parvum*, entre as crianças de São Paulo, indica a predominância do ciclo

antroponótico de transmissão na área. Em Taubaté, *C. hominis* foi detectado em duas áreas urbanas próximas ao centro da cidade, enquanto que *C. parvum* ocorreu em crianças residentes em áreas periurbanas, próximas a ambiente tipicamente rural, o que pode ser indicativo da circulação de animais parasitados por *C. parvum*, contaminando essas áreas.

O produto de 553pb do gene *COWP* pode ser empregado na identificação de todas as espécies válidas de *Cryptosporidium*, por análise das seqüências otidas por técnica de seqüenciamento de DNA, sendo útil na identificação tanto de isolados clínicos quanto ambientais. Já no que se refere à restrição enzimática desse segmento, empregando-se a enzima *RsaI*, tem sido empregada em amostras clínicas, sendo pouco recomendado para estudos ambientais, já que algumas espécies apresentam padrão de restrição semelhante, como *C. muris*, *C. andersoni*, *C. serpentins* (Xiao *et al.*, 2000c).

Quanto ao seqüenciamento de DNA de *Cryptosporidium* spp detectados no presente estudo, dois dos isolados humanos, um de bovino e um de cão, obtidos em Taubaté, foram analisados. Uma das amostras de criança (TT P03) apresentou seqüência de bases semelhantes a *C. hominis* e outra (TT P07) semelhante a *C. parvum*, concordantes com o padrão de RFLP, apresentados na Figura 9, posições 7 e 6, respectivamente. Nas seqüências obtidas (Figura 10) podem ser verificados os sítios de clivagem pela enzima *Rsa I* (GT-AC) nas posições 129, 413 e 519 (Am TT P03) e nas posições 413 e 519 (amostra TT P07). Quanto aos isolados obtidos de bovino e de cão, tanto pelo seqüenciamento como pelo perfil eletroforético, foram diagnosticados como *C. parvum*.

6. CONCLUSÃO

Empregando-se métodos parasitológicos, foram detectados três casos de *Cryptosporidium* spp em crianças do município de Taubaté-SP, um deles detectado dentre 315 amostras fecais não diarréicas e dois casos dentre 27 amostras diarréicas. Um quarto caso foi detectado por *Nested-PCR*, em amostra diarréica.

A frequência de 0,83% de *Cryptosporidium* spp detectada na população estudada, crianças de 4 a 72 meses de idade, pode ser considerada baixa quando comparada com outros estudos realizados no Brasil e no exterior.

Foram identificados genotipicamente quatro isolados obtidos de crianças de Taubaté, sendo dois isolados compatíveis com *Cryptosporidium hominis*, e os outros com *Cryptosporidium parvum*.

A genotipagem de isolados de *Cryptosporidium* spp de outras localidades do estado de São Paulo, obtidos de amostras de crianças de uma favela e de pacientes com SIDA, mostrou a ocorrência no município de São Paulo de quatro casos de *C. hominis* e um de *C. parvum* e no município de Sorocaba, de um de *C. hominis*, dois de *C. parvum* e dois de *Cryptosporidium meleagridis*. Portanto, foram identificadas genotipicamente três espécies de *Cryptosporidium*, ocorrendo *C. meleagridis* somente dentre os indivíduos portadores de SIDA.

A implantação de técnicas parasitológicas e moleculares para o diagnóstico da criptosporidiose foi realizada com sucesso nos laboratórios da Universidade de Taubaté, podendo ser empregados na detecção e genotipagem de isolados clínicos e ambientais de *Cryptosporidium* spp. Ressalta-se a importância das técnicas moleculares como ferramenta em estudos epidemiológicos, para a identificação das espécies circulantes, caracterização de possíveis fontes de infecção e contribuição ao conhecimento da dinâmica de transmissão desses parasitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Abe, N.; Kimata, I.; Iseki, M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 64: 165-68, 2002.
- ❖ Abe, N.; Iseki M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. *Parasitol. Res.*, 89: 422-4, 2003.
- ❖ Abreu, V. J. S. Evaluation of the efficacy of hiperimmune bovine colostrum on *Cryptosporidium parvum* experimental infection of rodents. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 43: 192, 2001.
- ❖ Adal, K. A.; Sterling, C. R.; Guerrant, R. L. *Cryptosporidium* and related species. In: Blaser, M.J.; Smith, P. D.; Radvin, J. I.; Greenberg, H. B.; Guerrant, R. L. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven press. 1995. p. 1107-28.
- ❖ Agnew, D.G.; Lima, A.A.M.; Newman, R.D.; Wuhib, T.; Moore, R.D.; Guerrant, R.L.; Sears C.L. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increades diarrhea morbidity. *J. Infect. Dis.*, 177: 754-60, 1998.
- ❖ Akiyoshi, D. E.; Mor, S.; Tzipori, S. Rapid displacement of *Cryptosporidium parvum* type 1 by tipe 2 in mixed infections in piglets. *Infect. Immunity*, 71: 5765-71, 2003.
- ❖ Alcantara, C. S.; Yang, C.; Steiner, T. S.; Barrett, L.; Lima, A. A. M.; Chappell, C. I.; Okhuysen, P. C.; White Jr, A. C.; Guerrant, R. L. Interleukin-8 tumor necrosis factor, and lactoferrin in immunocompetent host with experimental and brazilian children with acquired cryptosporidiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68: 325-28, 2003.

-
- ❖ Alvarez-Pellitero, P.; Sitjà-Bobadilla, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *J. Parasitol.* 32: 1007-21, 2002.
 - ❖ Alves, M.; Xiao, L.; Sulaiman, I.; Lal, A. A.; Matos, O.; Antunes, F. Subgenotype analyses of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 2744-47, 2003.
 - ❖ Araujo, A.J.U.S.; Araújo, S.M.; Carvalho, M.L.F.O.; Zöllner, M.S.A.C. O conhecimento das parasitoses como ponto de partida para a Educação Sanitária. *Rev. Extensão. Univert.*, 1:107-12, 2003.
 - ❖ Arrowood, M. J. In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. *Microbiol.*, 15: 390-400, 2002.
 - ❖ Bajer, A.; Cacciò, S.; Bednarska, M.; Behnke, J. M.; Pieniazek, N. J.; Sinski, E. Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *J. Parasitol.*, 89: 1053-55, 2003.
 - ❖ Balatbat, A. B.; Jordan, G. W.; Tang, Y. J.; Silva Jr, J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by Nested PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 1769-72, 1996.
 - ❖ Bankier, A. T.; Spriggs, H. F.; Fartmann, B.; Konfortov, B. A.; Madera, M.; Vogel, C.; Teichmann, S. A.; Ivens, A.; Dear, P. H. Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Research*, 13: 1787-99, 2003.
 - ❖ Baraldi, S.R.; Marques, E.G.L.; Dias, R.M.D.S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58: 97-103, 1999.
 - ❖ Beyer, T. V.; Svezhova, N. V.; Radchenko, A. I.; Sidorenko, N. V. Parasitophorous vacuole; morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). *Cell Biol. Inter.*, 26: 861-71, 2002.

-
- ❖ Bialek, R.; Binder, N.; Dietz, K.; Joachim A.; Knobloch J.; Zelck U.E. Comparison of fluorescence, antigen and *PCR* assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. *Diag. Microbiol. Infect. Diseases.*, 43: 283-288, 2002.
 - ❖ Blunt, D. S.; Khrantsov, N. V.; Upton, S. J.; Montelone, B. A. Molecular karyotype analysis of *Cryptosporidium parvum*: evidence for eight chromossomes and a low-molecular-size molecule. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 4: 11-13, 1997.
 - ❖ Bornay-Llinares, F. J.; Da Silva, A. J.; Moura, I. N.; Myjak, P.; Pietkiewicz, H.; Kruminis-Lozowska, W.; Graczyk, T. K.; Pieniazek, N. J. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecula methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 455-58, 1999.
 - ❖ Bracarense, A.P.F.R.L.; Sinhorini, I.L. Aspectos clínicos e histopatológicos da criptosporidiose experimental em suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 48: 665-676, 1997.
 - ❖ Bracarense A.P.F.R.L.; Reis A.C.F.; Sinhorini, I.L. Ultrastructural aspects of experimental cryptosporidiosis in pigs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zotec.*, 52: 441-4, 1999.
 - ❖ Brantley, R. K.; Williams, K. R.; Silva, T. M. J.; Sistrom, M.; Thielman, N. M.; Ward, H.; Lima, A. A. M.; Guerrant, R. L. 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. Diseases*, 7: 16-22, 2003.
 - ❖ Brasil. Ministério da Saúde. FUNASA. Portaria 1469/00 de 29 de dezembro de 2000: aprova o controle e vigilância da qualidade da água. Republica no Diário Oficial da União, n. 38 E, em 22 fev. 2001, seção 1, p. 39. Disponível na URL [http://www.funasa.gov.Br/amb/pdfs/portaria 1469.pdf](http://www.funasa.gov.Br/amb/pdfs/portaria%201469.pdf).

-
- ❖ Braz, L. M. A.; Amato Neto, V.; Ferrari, C. I. L.; Palhares, M. C. A.; Amato, V. S.; Santos, M. T. F.; Marques, H. H. S.; Vallada, M.; Nakanishi, L. S. S.; Andrade Jr, H. F. Human cryptosporidiosis: detection of specific antibodies in the serum by na indirect immunofluorescence. *Rev. Saúde Pública*, 30: 395-402,1996.
 - ❖ Cacciò, S.; Camilli, R.; La Rosa, G.; Pozio, E. Establishing the *Cryptosporidium parvum* karyotype by not I and Sfil restriction analysis and sourthern hibridization. *Gene*, 219: 73-79, 1998.
 - ❖ Cacciò, S.; Pinter, E.; Fantini, R.; Mezzaroma, I.; Pozio, E. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 85-86, 2002.
 - ❖ Call, J. L.; Arrowood, M.; Xie, L.; Hancock, K.; Tsang, V. C. W. Imunoassay for viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in turbid environmental water samples. *J. Parasitol.*, 87: 203-10, 2001.
 - ❖ Cartwright, R. Y.; Food waterborne infections associated with package holidays. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 12S-24S, 2003.
 - ❖ Castillo, R.; Gilman, R.; Miranda, E.; Echevarria, M.; Lembcke, J.; Sterling, C. Secretory IgA antibodies breast milk protected against infection by *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol. Día*, 25: 2-8, 2001.
 - ❖ Cegielski, J.P.; Ortega, Y.R.; McKee, S.; Madden, J.F.; Gaido, L.; Schwartz, D.A.; Manji, K.; Jorgensen, A.F.; Miller, S.E.; Pulipaka, U.P.; Msengi, A. E.; Mwakyusa, D. H.; Sterling, C. R.; Reller, L. B. *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, and *Cyclospora* Infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. *Clin. Inf. Dis.*, 28:314-21, 1999.
 - ❖ CETESB. *Microbiologia ambiental*. Norma Técnica L5. 2000.
 - ❖ Chacin-Bonilla, L. Importance of the different species and genotypes of *Cryptosporidium* in public health. *Invest. Clin.*, 43:1-2, 2002.

-
- ❖ Chalmers, R. M.; Elwin, K.; Reilly, W. J.; Irvine, H.; Thomas, A. L.; Hunter, P. R. *Cryptosporidium* in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep. *Int. J. Parasitol.*, 32: 21-26, 2002a.
 - ❖ Chalmers, R. M.; Elwin, K.; Thomas, A. L.; Joynson, D. H. M. Infection with unusual types of *Cryptosporidium* is not restricted to immunocompromised patients. *J. Infect. Diseases*, 185: 270-71, 2002b.
 - ❖ Chappell, C. L.; Okhuysen, P. C.; Sterling, C. R.; Wang, C.; Jakubowski, W.; Dupont, H. L. Infective of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60: 157-64, 1999.
 - ❖ Chieffi, P. P.; Sens, Y. A. S.; Paschoalotti, M. A.; Miorin, L. A.; Silva, H. G. C.; Jabur, P. Infection by *Cryptosporidium parvum* in renal patients submitted to renal transplant or hemodialysis. *Rev. Soc. Med. Trop.*, 31: 333-37, 1998.
 - ❖ Chung, E.; Aldom, J. E.; Carrero, R. A.; Chagla, A. H.; Kostrzynska, M.; Lee, H.; Palmateer, G.; Trevors, J. T.; Unger, S.; Xu, R.; De Grandis, S. A. *PCR*-based quantitation of *Cryptosporidium parvum* in municipal water samples. *J. Microbiol. Methods*, 38: 119-30, 1999.
 - ❖ Cimerman, S.; Cimerman, B.; Lewi, D.S. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Int. J. Infect. Dis.*, 3: 203-6, 1999.
 - ❖ Cimerman, S.; Castañeda, C.G.; Iuliano, W.A. Palacios, R. Perfil das enteroparasitoses diagnosticadas em pacientes com infecção pelo HIV na era da terapia antiretroviral potente em um centro de referência em São Paulo, Brasil. *Parasitol. Latinoam.* 57: 111-9, 2002.
 - ❖ Clemente, C. M.; Caramori, C. A.; Padula, P.; Rodrigues, M. A. M. Gastric cryptosporidiosis as a clue for the diagnosis of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ara. Gastroenterol.*, 37: 180-82, 2000.

-
- ❖ Cook, N. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J. Microbiol. Methods*, 53: 165-74, 2003.
 - ❖ Coombs, G. H.; Müller, S. Recent advances in the search for new anti-coccidial drugs. *Inter. J. for Parasitol.*, 32: 497-508, 2002.
 - ❖ Dalle, F.; Roz, P.; Dautin, G.; Di-Palma, M.; Kohli, E.; Sire-Bidault, C.; Fleischmann, M.G.; Gallay, A.; Carbonel, S.; Bon, F.; Tillier, C.; Beaudeau, P.; Bonnin, A. Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium* spp. collected during an outbreak of gastroenteritis in south Burgundy, France. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 2690-2693, 2003.
 - ❖ D'Antoni, R. G.; Winn, R. E.; Taylor, J. P.; Gustafson, T.L.; Current, W.L.; Rhodes, M.M.; Gary Jr, G.W.; Zajac, R. A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal host. *Ann. Intern. Med.*, 103: 886-88, 1985.
 - ❖ DataSUS. Informações de Saúde. Disponível na URL <http://www.datasus.gov.br>. Acessado em 18 de janeiro de 2004.
 - ❖ Da Silva, A.J.; Bornay-Llinares, F.J.; Moura, I.N.S.; Slemenda, S.B.; Tuttle, T.L.; Pieniazek, N.J. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Mol. Diagn.*, 4: 57-63, 1999.
 - ❖ da Silva, S.; da Silva, S.P.; Gouveia, Y. S.; da Silva N. O.; Melo, M. E.; Moura, H.; Neves, R.H.; Bello, A.R.; Machado-Silva, J.R. Occurrence of *Cryptosporidium* sp in fecal samples of children less than 10 years old with clinical indication of Rotavirus. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.*, 36: 421-3, 2003.
 - ❖ De Carli, G. A. Exame macroscópico e microscópico da amostra fecal fresca e preservada. In:____ *Parasitologia Clínica*. São Paulo: Atheneu. 2001. p. 27-81.
 - ❖ De Carli, G.A.; Moura, H. Métodos de coloração para coccídios intestinais. In: De Carli, G. A. *Parasitologia Clínica*. São Paulo: Atheneu. 2001. p. 223-263.

-
- ❖ Deng, M. Q.; Lam, K. M.; Cliver, D.O. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using MACS microbeads and high gradient separation columns. *J. Microbiol. Methods*, 40: 11-17, 2000.
 - ❖ Dillingham, R. A.; Lima, A. A.; Guerrant, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4: 1059-66, 2002.
 - ❖ Egorov, A.; Frost, F.; Müller, T.; Naumova, E.; Tereschenco, A.; Ford, T. Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in a russian city and evaluation of risk factors for infections. *Ann. Epidemiol.*, (in press) 2003. [Disponível Online]
 - ❖ Egyed, Z.; Sréter, T.; Széll, Z.; Varga, I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. Recent developments and future needs. *Veterinary Parasitol.*, 111: 103-14, 2003.
 - ❖ Fall, A.; Thompson, R. C. A.; Hobbs, R. P.; Morgan-Ryan, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *J. Parasitol.*, 89: 399-402, 2003.
 - ❖ Farias, E. W. C.; Gamba, R. C.; Pellizri, V. H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 33: 44-3, 2002.
 - ❖ Farthing, M. J. G. Immune response-mediated pathology in human intestinal parasitic infection. *Parasite Immun.* 25: 247-57, 2003.
 - ❖ Fayer, R.; Speer, C.A.; Dubey, J.P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R. (ed) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC Press. 1997. p.1-41.
 - ❖ Fayer, R.; Lewis, E.J.; Trout, J.M.; Graczyk, T.K.; Jenkins, M.C.; Higgins, J.; Xiao, L.; Lal, A. A. *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake bay. *Emerging Inf. Dis.*, 5: 706-710, 1999.

-
- ❖ Fayer, R.; Morgan, U.; Upton, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Inter. J. Parasitol.*, 30: 1305-22, 2000.
 - ❖ Fayer, R.; Trout, J. M.; Xiao, L.; Morgan, U. M.; Lal, A. A.; Dubey, J. P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.*, 87: 1415-22, 2001.
 - ❖ Fayer, R.; Trout, J. M.; Lewis, E. J.; Xiao, L.; Lal, A.; Jenkins, M. C.; Graczyk, T. K. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake bay. *Parasitol. Research*, 88: 998-1003, 2002.
 - ❖ Fayer, R.; Trout, J. M.; Lewis, E. J.; Santin, M.; Zhou, L.; Lal, A.; Xiao, L. Contamination of atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitol. Research*, 89: 141-5, 2003.
 - ❖ Ferreira, M. S.; Borges, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97: 443-57, 2002.
 - ❖ Fontaine, M.; Guillot, E. An immunomagnetic separation-real-time *PCR* method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. *J. Microbiol. Methods*, 54: 29-36, 2003.
 - ❖ Franco, R. M. B. Infecções parasitárias em creches: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*. 1996. 86 p. Apêndices e Anexos. [Tese de Doutorado – Instituto de Biologia da UNICAMP].
 - ❖ Franco, R. M. B.; 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. S. Paulo*, 43: 109-11, 2001.
 - ❖ Fricker, C. R.; Crabb, J. H. Water-borne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. *Adv. Parasitol.*, 40: 241-78, 1998.

-
- ❖ Frost, F. J.; Calderon, R. L.; Muller, T. B. A two-year follow-up survey of antibodies to *Cryptosporidium* in Jackson County, Oregon following an outbreak of waterborne disease. *Epidemiol. Infect.*, 121: 213-7, 1998a.
 - ❖ Frost, F.J.; del la Cruz, A.A.; Moss, D.M.; Curry M.; Calderon, R.L. Comparison of ELISA and western blot assays for detection of *Cryptosporidium* antibody. *Epidemiol. Infect.*, 121:205-11, 1998b
 - ❖ FUNASA. Diarréia: aspectos epidemiológicos. In: Saúde em movimento. Disponível na URL <http://www.saudeemmovimento.com.br>. Data da publicação 30 de março de 2002. Acessado em 15 de janeiro de 2004.
 - ❖ Galé, P. Developments in microbiological risk assessment for drinking water. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 191-205, 2001.
 - ❖ Gamba, R.C.; Ciapina, E.M.P.; Espíndola, R.S.; Pacheco, A.; Pellizari, V.H. Detection of *Cryptosporidium* sp oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba City, S. Paulo – Brasil. *Bras. J. Microbiol.*, 31: 151-3, 2000.
 - ❖ Garcia, L. S.; Brewer, T. C.; Bruckner, D. A. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 119-21, 1987.
 - ❖ Garcia, A. M.; Lima, J.D. Frequência de *Cryptosporidium* em bezerros lactentes de rebanhos leiteiros de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 45: 193-8. 1993.
 - ❖ Garcia, L. S.; Shimizu, R. Y.; Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 209-12, 1997.
 - ❖ Gatei, W.; Greensill, J.; Ashford, R. W.; Cuevas, L. E.; Parry, C. M.; Cunliffe, N. A.; Beeching, N. J.; Hart, C. A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human

immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1458-62, 2003.

- ❖ Gendrel, D.; Treluyer, J. M.; Richard-Lenoble, D. Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. *Fund. Clin. Pharmacol.*, 17: 189-97, 2003.
- ❖ Gennari, S.M.; Kasai, N. Pena, H.F.J.; Cortez, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 36:87-91. 1999.
- ❖ Gennari-Cardoso, M. L.; Costa-Cruz, J. M.; Castro, E.; Lima, I. M.; Prudente, D. V. *Cryptosporidium* sp. in children suffering from acute diarrhea at Uberlandia city, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91: 551-4, 1996.
- ❖ Gerber, D. A.; Green, M.; Jaffe, R.; Greenberg, D.; Mazariegos, G.; Reyes, J. Cryptosporidial infections after solid organ transplantation in children. *Pediat. Transplantation*, 4: 50-5, 2000
- ❖ Gilioli, R.; Silva, F. A. Frequency of parasites and Salmonella infection in captive maned-wolf, *Chrysocyon brachyurus*, kept in zoos at the state of São Paulo, Brazil. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zotec.*, 52:33-7, 1999.
- ❖ Glaberman, S.; Moore, J.E.; Lowery, C.J.; Chalmers, R.M.; Sulaiman, I.; Elwin, K.; Rooney, P.J.; Millar, B.C.; Dooley, J.S.G.; Lal, A. A.; Xiao, L. Three drinking-water-associated Cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 631-3, 2002.
- ❖ Gobet, P.; Toze, S. Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Microbiol. Lettlers*, 200: 37-41, 2001.
- ❖ Gomez-Couso, H.; Freire-Santos, F.; Martínez-Urtaza, J.; Garcia-Martin, O.; Ares-Mazas, M. E. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium*

-
- oocysts: the need for new quality control standards. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 97-105, 2003.
- ❖ Graczyk, T. K.; Cranfield, M. R.; Fayer, R.; Bixler, H. House flies (*Musca domestica*) as transport host of *Cryptosporidium parvum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61: 500-04, 1999.
 - ❖ Graczyk, T. K.; Fayer, R.; Knight, R.; Mhangami-Ruwende, B.; Trout, J. M.; Da Silva, A. J.; Pieniazek, N. J. Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocyst by wild filth flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 63: 4178-83, 2000.
 - ❖ Graczyk, T. K.; Grimes, B. H.; Knight, R.; Da Silva, A. J.; Pieniazek, N. J.; Veal, D. A. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68: 228-32, 2003.
 - ❖ Green, S. L., Bouley, D. M., Josling, C. A., Fayer, R. Cryptosporidiosis associated with emaciation and proliferative gastritis in a laboratory-reared South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comp. Med.*, 53: 81-4, 2003.
 - ❖ Guerrant, D. I.; Moore, S. R.; Lima, A. A. M.; Patrick, P. D.; Schorling, J. B.; Guerrant, R. L. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61: 707-13, 1999.
 - ❖ Guselle, N. J.; Appelbee, A. J.; Olson, M. E. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.*, 113: 7-18, 2003.
 - ❖ Guyot, K.; Follet-Dumoulin, A.; Recourt, C.; Lelièvre, E.; Cailliez, J. C.; Deic-Cas, E. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a diagnostic 452-base-pair DNA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meliagridis* and between *C. Parvum* isolates of human and animal origin. *Appl. Env. Microbiol.*, 68: 2071-6, 2002.

-
- ❖ Hachich, E.M. Avaliação da presença dos protozoários *Giardia* sp *Cryptosporidium* sp em águas superficiais destinadas a captação e tratamento para consumo humano no Estado de São Paulo. 2002. 175 p. Anexos. [Tese de Doutorado – Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
 - ❖ Hallier-Soulier, S.; Guillot, E. An immunomagnetic separation polymerase chain reaction assay for rapid and ultra-sensitive detection of *Cryptosporidium parvum* in drinking water. *FEMS Microbiol. Lett.*, 176: 285-9, 1999.
 - ❖ Hayes, E. B.; Matte, T. D.; O'Brien, T. R. McKinley, T. W.; Logsdon, G. S.; Rose, J. B.; Ungar, B. L.; Word, D. M.; Pinsky, P. F.; Cummings, M. L. *et al.* Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 320: 1372-6, 1989.
 - ❖ Higgins, J. A.; Trout, J. M.; Fayer, R.; Shekton, D.; Jenkins, M. C. Recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples using continuous flow centrifugation. *Water Research*, 37: 3551-60, 2003.
 - ❖ Hijjawi, N. S.; Meloni, B. P.; Morgan, U. M.; Thompson, R. C. A. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Inter. J. for Parasitology*, 31: 1048 -55, 2001.
 - ❖ Hijjawi, N. S.; Meloni, B. P.; Ryan, U. M.; Olson, M. E.; Thompson, R. C. A. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Inter. Journal for Parasitology*, 32: 1719-26, 2002.
 - ❖ Hunter, P. R.; Nichols, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 145-54, 2002.

-
- ❖ Hunter, P. R.; Chalmers, R. M.; Syed, Q.; Hughes, L. S.; Woodhouse, S.; Swift, L. Foot and mouth disease and cryptosporidiosis: possible interaction between two emerging infectious diseases. *Emerg. Infect. Diseases*, 9: 109-12, 2003.
 - ❖ Inoue, M.; Rai, S. K.; Oda, T.; Kimura, K.; Nakanishi, M.; Hotta, H.; Uga, S. A new filter-eluting solution that facilitates improved recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J. Microbiol. Methods*, 55: 679-86, 2003.
 - ❖ Irwin, P. J. Companion animal parasitology: a clinical perspective. *Inter. J. Parasitol.*, 32: 581-93, 2002.
 - ❖ Ives, N.; Gazzard, B.; Easterbrook, P. The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active anti-retroviral therapy (HAART) in a London clinic. *Infection*, 42: 134-9, 2001.
 - ❖ Jenkins, M. C.; O'Brien, C.; Trout, J.; Guidry, A.; Fayer, R. Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. *Vaccine*, 17: 2453-60, 1998.
 - ❖ Jenkins, M. C.; Trout, J.; Abrahamsen, M. S.; Lancto, C. A.; Higgins, J.; Fayer, R. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *J. Microbiol. Methods*, 43: 97-106, 2000.
 - ❖ Jiang, J.; Xiao, L. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. *J Eukaryot Microbiol.*, 50: 542-7, 2003.
 - ❖ Joachim, A.; Eckert, E.; Petry, F.; Bialek, R.; Dauschies, A. Viability assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts after disinfection. *Vet. Parasitol.*, 111: 47-57, 2003.

-
- ❖ Johnson, D. W.; Pieniazek, N. J.; Griffin, D. W.; Misener, L.; Rose, J. B. Development of a *PCR* protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water sample. *Appl. Envir. Microbiol.*, 61: 3849-55, 1995.
 - ❖ Johnston, S. P.; Ballard, M. M.; Beach, M. J.; Causer, L.; Wilkins, P. P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 623-6, 2003.
 - ❖ 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. Inter. Health*, 7: 257-64, 2004.
 - ❖ Karasawa, A. S. M.; Silva, R. J.; Mascarini, I. M.; Barrella, T. H.; Lopes, C. A. M. Occurrence of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in *Crotallus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97: 779-81, 2002.
 - ❖ Katsumata, T.; Hosea, D.; Ranuh, I. G.; Uga, S.; Yanagi, T.; Kohno, S. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62: 70-2, 2000.
 - ❖ Kato, S.; Lindergard, G.; Mohammed, H. O. Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (*COWP*) gene in a *Nested PCR* approach for detection infection in cattle. *Veterinary Parasitol.*, 111: 153-9, 2003.
 - ❖ Kehl, K. S. C.; Cicirello, H.; Havens, P. L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 416-8, 1995.
 - ❖ Khalakdina, A.; Vugia, D.J.; Nadle, J.; Rothrock, G.A.; Colford Jr, J.M. Is drinking water a risk factor for endemic cryptosporidiosis? A case-control study in the immunocompetent general population of the San Francisco Bay Area. *B.M.C. Public. Health.*, 3:11-21, 2003.

-
- ❖ Kvac, M.; Kvetonova, D.; Puzova, G.; Ditrich, O. Comparison of selected diagnostic methods for identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in routine examination on faeces. *J. Vet. Med.*, 50: 405-11, 2003.
 - ❖ Lacroix-Lamandé, S.; Mancassola, R.; Naciri, M.; Laurent, F. Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.*, 70: 2090-9, 2002.
 - ❖ Lainson, R.; Silva, B. A. M. Intestinal parasites of some diarrhoeic HIV-seropositive individuals in north Brazil, with particular reference to *Isospora belli* Wenyon, 1923 and *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell, 1918. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 611-3, 1999.
 - ❖ Laurent, F.; McCole, D.; Eckmann, L.; Kagnoff, M. F. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes and Infection*, 2: 141-48, 1999.
 - ❖ Leach, C. T.; Koo, F. C.; Kuhls, T. L.; Hilsenbeck, S. G.; Jenson, H. B. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in children along the Texas-Mexico border and associated risk factors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 656-61, 2000.
 - ❖ LeChevallier, M. W.; Norton, W. *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished water. *J. Am. Water Works Assoc.*, 87:54-68, 1995.
 - ❖ LeChevallier, M. W.; Di- Giovanni, G. D.; Clancy, J. L.; Bukhari, Z.; Bukhari, S.; Rosen, J. S.; Sobrinho, J.; Frey, M. M. Comparison of methods 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in source waters. *Appl. Envir. Microbiol.*, 69: 971-9, 2003.
 - ❖ Lemarchand, K.; Lebaron, P. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *Microbiol. Lett.*, 218: 203-9, 2003.

-
- ❖ Levine, N. D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *J. Protozool.*, 31: 94-8, 1984.
 - ❖ Lima, A. A. M.; Moore, S. R.; Barbosa, Jr, M. S.; Soares, A. M.; Schleupner, M. A.; Newman, R. D.; Sears, C. L.; Nataro, J. P.; Fedorko, D. P.; Wuhib, T.; Schorling, J. B.; Guerrant, R. L. 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.*, 181: 1643-51, 2000.
 - ❖ Lima, E. C.; Stamford, T. L. M. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. *Cienc. e Saúde Coletiva*, 8: 791-800, 2003.
 - ❖ Lindergard, G.; Wade, S.E.; Schaaf, S.; barwick, R. S.; Mohammed, H. O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in soil samples by enzyme-linked immunoassay. *Veterinary Parasitol.*, 94: 163-76, 2001.
 - ❖ Litwin, C.M. Pet-transmitted infections: diagnosis by microbiologic and immunologic methods, 22:768-77, 2003.
 - ❖ Loureiro, E. C.; Linhares Ada, C.; Mata, L. Cryptosporidiosis in children from 1 to 2 years of age, with acute diarrhea in Belém, Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 117-22, 1989.
 - ❖ Mackenzie, W. R.; Hoxie, N. J.; Proctor, M. E.; Gradus, M. S.; Blair, K. A.; Peterson, D. E.; Kazmierczak, J. J.; Addiss, D. G.; Fox, K. R.; Rose, J. B. *et al.* A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 331: 161-7, 1994.
 - ❖ Martinez, I.; Belda Neto, F. M. Contribution to the Laboratory Diagnosis of Human Cryptosporidiosis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 43: 79-82, 2001.

-
- ❖ Mallon, M. E.; MacLeod, A.; Wastling, J. M.; Smith, H.; Tait, A. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* type 2: population genetics and sub-structuring. *Infect. Genet. and Evolution*, 3: 201-18, 2003.
 - ❖ Mangini, A. C.; Dias, R. M.; Grisi, S. J.; Escobar, A. M.; Torres, D. M.; Zuba, I. P.; Quadros, C. M.; Chieffi, P. P. *Cryptosporidium* parasitism in children with acute diarrhea. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 34: 241-5, 1992.
 - ❖ Mead, J. R. Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. *Drug Resist Updat.*, 5: 47-57, 2002.
 - ❖ Medeiros, M. I. C.; Neme S. N.; Silva, P.; Capuano, D. M.; Errera, M.C.; Fernades, S. L.; Valle, G. R. & Avila, F. A. Etiology of acute among children in Riberão Preto-SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 43: 21-4, 2001.
 - ❖ Meisel, J. L.; Pereira, D. R.; Meligro, C.; Rubin, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterol.*, 70: 1156-60, 1976.
 - ❖ Mendes Maia, A.A.; Ogassawara, S. Pena, H.F.J., Hoge, A.Y.A. Oocistos de *Cryptosporidium* spp nas fezes de bovinos em Montes Claros, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zotec.*, 47:717-9, 1995.
 - ❖ Merchán-Hammann, E; Laguardia, J. Reflexões sobre a vigilância epidemiológica: mais além da notificação compulsória. *Inf. Epidemiol. SUS*, 9: 211-9, 2000.
 - ❖ Millar, B. C.; Finn, M.; Xiao, L.; Lowery, C. J.; Dooley, J. S.G.; Moore, J. E. *Cryptosporidium* in foodstuffs - na emerging aetiological route of human foodborne illness. *Trends in Food Science Tecnol.*, 13: 168-87, 2002.
 - ❖ Monis, P. T.; Thompson, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia* - zoonoses: fact or fiction? *Infect. Genet. Evolut.*, 3: 233-44, 2003.
 - ❖ Morgan, U. M.; Pallant, L.; Dwyer, B. W.; Forbes, D. A.; rich, G.; Thompsom, R. C. A. Comparison of *PCR* and microscopy for detection of

-
- Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 995-8, 1998.
- ❖ Morgan, U. M.; Thompsom, R. C. A. *PCR* Detection of *Cryptosporidium*: the way foward? *Parasitol. Today*, 14: 241-5, 1998.
 - ❖ Morgan, U. M.; Xiao, L.; Fayer, R.; Lal, A. A.; Thompsom, R. C. A. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *Inter. J. Parasitol.*, 29: 1733-51, 1999a.
 - ❖ Morgan, U.M.; Xiao, L.; Monis, P.; Sulaiman, I.; Pavlasek, I.; Blagburn, B.; Olson, M.; Upton, S. J.; Khramtsov, N. V.; Lal, A.; Elliot, A.; Thompson, R. C. A. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various host. *Parasit.*, 120: 457-64, 1999b.
 - ❖ Morgan-Ryan, U. M.; Fall, A.; Ward, L. A.; Hijjaw, N.; Sulaiman, I.; Fayer, R.; Thompson, R. C. A.; Olson, M.; Lal, A.; Xiao, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 49:433-40, 2002.
 - ❖ Moura, H.; Fernandes, O.; Viola, J. P.; Silva, S. P.; Passos, R. H.; Lima, D. B. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 527-33, 1989.
 - ❖ Newman, R. D.; Sears C. L.; Moore, S. R.; Nataro, J. P.; Wuhib, T.; Agnew, D. A.; Guerrant, R.L.; Lima, A. A. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.*, 180: 167-75, 1999.
 - ❖ Nichols, R. A. B.; Campbell, B. M.; Smith, H. V. Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in United Kingdom noncarbonated natural mineral waters and drinking waters by using a modified neses *PCR*-restriction fragment length polymorphism assay. *Appl. Envir. Microbiol.*, 69: 4183-9, 2003.

-
- ❖ Nime, F. A.; Burek, J. D.; Page, D. L.; Holcher, M. A.; Yardle, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterol.*, 70: 592-8, 1976.
 - ❖ Nizeyi, J. B.; Sebunya, D.; Dasilva, A. J.; Cranfield, M. R.; Pieniazec, N. J.; Graczyk, T. K. Cryptosporidiosis in people sharing habitats with free-ranging mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*), Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66: 442-4, 2002.
 - ❖ Okhuysen, P. C.; Chappell, J. H.; Crabb, C. R.; Sterling, H. L. Dupont, Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults, *J. Infect. Dis.*, 180: 1275-81, 1999.
 - ❖ Okhuysen, P. C.; Chappell, C. L. *Cryptosporidium* virulence determinants – are we there yet? *Intern. J. Parasitol.*, 32: 517-25, 2002.
 - ❖ Ong, C. S. L.; Eisler, D. L.; Alikhani, A.; Fung, V. W. K.; Tomblin, J. Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with cervine genotype. *Emerg. Infect. Diseases*, 8: 263-8, 2002.
 - ❖ Ortega, Y. R.; Roxas, C. R.; Gilman, R. H.; Miller, N. J.; Cabrera, L.; Taquiri, C.; Sterling, C. R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 57: 686-96, 1997.
 - ❖ Oshiro, E. T.; Dorval, M. E. C.; Nunes, V. L. B.; Silva, M. A. A.; Said, L. A. M. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 33: 277-80, 2000.
 - ❖ Palmer, C. J.; Xiao, L.; Terashima, A.; Guerra, H.; Gotuzzo, E.; Bonilla, J. A.; Zhou, L.; Lindquist, A.; Upton, S. J. *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Peru. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 1174-6, 2003.

-
- ❖ Pedraza-Díaz, S.; Amar, C.; McLauchlin, J. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 15;189: 189-94, 2000.
 - ❖ Pedraza-Díaz, S.; Amar, C.; Iversen, A.M.; Stanley, P.J.; McLauchlin, J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* “dog type” from patients in England. *J. Med. Microbiol.*, 50: 293-6, 2001a.
 - ❖ Pedraza-Díaz, S.; Amar, C.; Nichols, G.L.; McLauchlin, J. Nested Polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Infect. Dis.*, 7: 49-56, 2001b.
 - ❖ Pedraza-Díaz, S.; Amar, C.F.L.; McLauchlin, J.; Nichols, G. L.; Cotton, K. M.; Godwin P.; Iversen, A. M.; Milne, L.; Mulla, J. R.; Nye, K.; Panigrahl, H.; Venn, S.R.; Wiggins, R.; Williams, M.; Youngs, E.R. *Cryptosporidium meleagridis* from humans: molecular analysis and description of affected patients. *J. Infection*, 42: 243-50, 2001c.
 - ❖ Pena, H.F.J.; Kasai, N.; Gennari, S.M. *Cryptosporidium muris* in dairy cattle in Brazil. *Vet. Parasitol.*, 73:353-5, 1997.
 - ❖ Peng, M. M.; Xiao, L.; Freeman, A. R.; Arrowood, M. J.; Escalante, A. A.; Weltr, A. C.; Ong, C. S.; Mackenzie, W. R.; Lal, A. A.; Beard, C. B. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolated evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg. Infect. Dis.*, 3: 567-73, 1997.
 - ❖ Peng, M. M.; Wilson, M. L.; Holland, R. E.; Meshnick, S. R.; Lal, A. A.; Xiao, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitol. Research*, 90: 175-80, 2003.
 - ❖ Pereira, M. G. C.; Atwill, E. R.; Barbosa, A. P.; Silva, S. A.; García-Zapata, M. T. A. 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. Hig.*, 66: 787-93, 2002.

- ❖ [Peregrino, T. B. F. Diagnóstico de parasitos intestinais em pacientes atendidos no Hospital Universitário de Taubaté. 2003. Comunicação pessoal].
- ❖ Petri Jr., W. A. Therapy of intestinal protozoa. *Trends in Parasitol.*, 19: 523-8, 2003.
- ❖ Pieniazek, N. J.; Bornay -Llinares, F. J.; Slemenda, S. B.; Da Silva, A. J.; Moura, I. N.; Arrowood, M. J.; ditrich, O.; Addiss, D. G. New *Cryptosporium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 444-9, 1999.
- ❖ Piper, M. B.; Bankier, A. T.; Dear, P. H. A happy map of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Res.*, 8: 1299-307, 1998.
- ❖ Priest, J. W.; Li, A.; Khan, M.; Arrowood, M. J.; Lammie, P. J.; Ong, C. S.; Roberts, J. M.; Isaac-Renton, J. Enzyme immunoassay detection of antigen-specific immunoglobulin G antibodies in longitudinal serum samples from patients with cryptosporidiosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8: 415-23, 2001.
- ❖ Puiu, D.; Enomoto, S.; Buck, G. A.; Abrahamsen, M. S.; Kissinger, J. C. CryptoDB: the *Cryptosporidium* genome resource. *Nucleic Acids Res.*, 32 (in press) 2004. [Online]
- ❖ Putignani, L.; Sallicandro, P.; Alano, P.; Abrahamsen, M. S.; Crisanti, A.; Spano, F. Chromosome mapping in *Cryptosporidium parvum* and establishment of a long-range restriction map for chromosome. *VI FEMS Microbiol. Lett*, 175: 231-8, 1999.
- ❖ Queiroz, E. S.; Bem, C.; MacArthur, J. R.; Xiao, L.; Fletcher, M.; Arrowood, M. J.; Shay, D. K.; Levy, M. E.; Glass, R. I.; Lal, A. An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. *J. Infect. Dis.*, 181: 695-700, 2000.

-
- ❖ Quintero-Betancourt, W.; Peele, E. R.; Rose, J. B. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J. Microbiol. Meth.*, 49: 209-24, 2002.
 - ❖ Ragozo, A. M. A.; Muradian, V.; Ramos e Silva, J. C.; Caravieri, R.; Amajoner, V. R.; Magnabosco, C.; Gennari, S. M. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em fezes de gatos das cidades de São Paulo e Guarulhos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 39: 244-6, 2002.
 - ❖ Reynolds, D. T.; Slade, R. B.; Sykes, N. J.; Jonas, A.; Fricker, C. R. Detection of *Cryptospridium* oocysts in water: techniques for generating precise recovery data. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 804-13, 1999.
 - ❖ Rimhanen-Finne, R.; Ronkainen, P.; Hänninen, M. L. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 1030-5, 2001.
 - ❖ Rimhanen-Finne, R.; Hörman, A.; Ronkainen, P.; Hänninen, M. L. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. *J. Microbiol. Meth.*, 50: 299-303, 2002.
 - ❖ Ritchie, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull. U.S. Army Med. Dept.*, 8: 326, 1948.
 - ❖ Rivasi, F.; Rossi, P.; Righi, E.; Pozio, E. Gastric cryptosporidiosis: correlation between intensity of infectio and histological alterations. *Histopathology*, 34: 405-9, 1999.
 - ❖ Rossignol, J. F. A.; Ayoub, A.; Ayers, M. S. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a propective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *J. Infect. Diseases*, 184: 103-6, 2001.
 - ❖ São Paulo. Secretaria de Estado da Saude. Centro de Vigilância Epidemiológica. *Vigilância ativa das doenças transmitidas por alimentos* –

normas e instruções, 2000. Disponível na URL <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm>

- ❖ Saredi, N.; Bava, J. Cryptosporidiosis in pediatric patients. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*, 40: 197-200, 1998.
- ❖ Sargent, K. D.; Morgan, U. M.; Elliot, A.; Thompson, R. C. A. Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Vet. Parasitol.*, 77: 221-7, 1998.
- ❖ Schnack, F. J.; Fontana, L. M.; Barbosa, P. R.; Silva, L. S. M.; Baillargeon, C. M. M.; Barichello, T.; Póvoa, M. M.; Cavasini, C. E.; Machado, R. L. D. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (< 5 anos de idade) em mostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. *Cad. Saúde Publ.*, 19: 1205-08, 2003.
- ❖ Sestak, K.; Ward, L. A.; Sheoran, A.; Feng, X.; Akiyoshi, D. E.; Ward, H. D.; Tzipori, S. Variability among *Cryptosporidium parvum* genotype 1 and 2 immunodominant surface glycoproteins. *Parasite Immunol.*, 24: 213-9, 2002.
- ❖ Sheather, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. *J. Comp. Ther.*, 36: 266-75, 1923.
- ❖ Silva, C. V.; Ferreira, M. S.; Gonçalves-Pires, M. R. F.; Costa-Cruz, J. M. Detection of *Cryptosporidium* - specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98: 1097-9, 2003.
- ❖ Silva, G. A. P.; Magalhães, M.; Oliveira, A. M. A.; Melo, V. M. Diarreia aguda do lactente associada ao *Cryptosporidium* sp, na cidade de Recife. *J. Pediatria*, 70:44-7, 1994.
- ❖ Simpson, V. R. Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK. *Vet. J.*, 163: 28-46, 2002.

-
- ❖ Slavin, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.*, 65: 262-6, 1955.
 - ❖ Slifko, T. R.; Smith, H. V.; Rose, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Inter. J. Parasitol.*, 30: 1379-93, 2000.
 - ❖ Spano, F.; Putignani, L.; McLauchlin, J.; Casemore, D. P.; Crisanti, A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. Wrairi* and *C. Parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *Microbiol. Letters*, 150: 209-217, 1997.
 - ❖ Spano, F.; Crisanti, A. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *Inter. Journal for Parasitology*, 30: 553-65, 2000.
 - ❖ Stinear, T.; Matusan, A. Hines, S. Sandery, M. Detection of single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3385-90, 1996.
 - ❖ Sturbaum, G. D.; Klonicki, P. T.; Marshall, M. M.; Jost, B. H.; Clay, B. L.; Sterling, C. R. Immunomagnetic separation (IMS)-fluorescent antibody detection and IMS-PCR detection of seeded *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters and their limitations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2991-6, 2002.
 - ❖ Tamburrini, A.; Pozio, E. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocyst in seawater and experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Inter. J. Parasitol.*, 29: 711-5, 1999.
 - ❖ Teunis, P. F. M.; Chappell, C. L.; Okhuysen, P. C. *Cryptosporidium* dose-response studies: variation between hosts. *Risk Analysis*, 22: 475-8, 2002.
 - ❖ Tiangtip, R.; Jongwutiwes, S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolates from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health*, 7: 357-64, 2002.
 - ❖ Tzipori, S.; Ward, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4: 1047-58, 2002.

-
- ❖ Widmer, G.; Tchach, L.; Spano, F.; Tzipori, S. A study of *Cryptosporidium parvum* genotypes and population structure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93: 685-6, 1998.
 - ❖ Widmer, G.; Lin, L.; Kapur, V.; Feng, X.; Abrahamsen, M.S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. *Microbes and Infection*, 4: 1081-90, 2002.
 - ❖ Widmer, G. Population genetics of *Cryptosporidium parvum*. *Trends in Parasitol.*, 20: 3-5, 2004.
 - ❖ Wiebbelling, A.M.P.; Mezzari, A.; Schnato, L.K.; Richter, V.T.; Bohme, E.S. Avaliação do conhecimento sobre criptosporidiose em uma amostral de médicos de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *J. Bras. Patol. Clín. Med. Lab.*, 38: 119-23, 2002.
 - ❖ Xiao, L.; Sulaiman, I.; Fayer, R.; Lal, A. A. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93: 687-92, 1998.
 - ❖ Xiao, L.; Morgan, U. M.; Limor, J.; Escalante, A.; Arrowood, M.; Shulaw, W.; Thompson, R. C.; Fayer, R.; Lal, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3386-91, 1999.
 - ❖ Xiao, L.; Alderisio, K.; Limor, J.; Royer, M.; Lal, A. A. identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 5492-8, 2000a.
 - ❖ Xiao, L.; Limor, J. R.; Sulaiman, I. M.; Duncan, R. B.; Lal, A. A. Molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from a black bear. *Journal of Parasitology*, 86: 1166-70, 2000b.
 - ❖ Xiao, L.; Limor, J.; Morgan, U. M.; Sulaiman, I. M.; Thompson, R. C. A.; Lal, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst

-
- wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 5499-502, 2000c.
- ❖ Xiao, L.; Morgan, U. M.; Fayer, R.; Thompson, R. C. A.; Lal, A.A. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology today*, 16: 287-92, 2000d.
 - ❖ Xiao, L.; Bern, C.; Limor, J.; Sulaiman, I.; Roberts, J.; Checkley, W.; Cabrera, L.; Gilman, R. H.; Lal, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Diseases*, 182: 492-7, 2001.
 - ❖ Xiao, L.; Bern, C.; Arrowood, M.; Sulaiman, I.; Zhou, L.; Kawai, V.; Lal, A. A. Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *J. Infect. Dis.*, 185:12 1846-8, 2002a.
 - ❖ Xiao, L.; Sulaiman, I. M.; Ryan, U. M.; Zhou, L.; Atwill, E.R.; Tischler, M. L.; Zhang, X.; Fayer, R.; Lal, A. A. Host adaptation and host-parasite co-evaluation in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Inter. Journal for Parasitology*, 32: 1773-85, 2002b.
 - ❖ Xiao, L.; Fayer, R.; Ryan, U.; Upton, S. J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent advances and Implications for public health. *Clin. Microbiol. Reviews*, 17: 72-97, 2004.
 - ❖ Yakub, G. P.; Stadterman-Knauer, K. L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. *Envir. Microbiol.*, 66: 3628-31, 2000.
 - ❖ Young, K. H.; Bullock, S. L.; Melvin, D. M.; Spruill, C. L. Ethyl Acetate as a substitute for Diethyl Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Technique. *J. Clin. Microbiol.*, 10: 852-3, 1979.

Cr<2a c/diarr por Ano/Mês segundo Unid.Federação
Período: 2002

Unid.Federação	2002/Jan	2002/Fe v	2002/Ma r	2002/Ab r	2002/Mai	2002/Jun	2002/Jul	2002/Ag o	2002/Set	2002/Ou t	2002/No v	2002/De z	TOTAL
TOTAL	214.348	238.245	195.463	178.948	168.442	163.276	171.280	182.497	183.872	188.730	181.104	165.328	2.231.533
Rondônia	2.353	1.911	1.988	1.781	2.145	2.045	1.742	2.000	2.133	2.162	2.074	1.819	24.153
Acre	2.325	2.330	2.082	2.095	2.002	1.718	1.880	1.955	1.899	2.363	1.945	1.871	24.465
Amazonas	12.373	11.165	10.943	10.930	10.477	10.257	10.163	10.370	10.168	10.356	10.174	9.626	127.002
Roraima	458	581	467	712	956	873	624	529	419	449	488	433	6.989
Pará	18.820	20.642	19.052	17.486	16.945	16.803	15.331	16.726	15.857	16.011	16.569	15.588	205.830
Amapá	2.302	2.793	3.001	2.763	2.742	2.546	2.450	2.457	2.293	2.209	2.279	2.145	29.980
Tocantins	2.476	2.373	2.170	1.999	1.945	2.178	2.167	3.598	3.928	4.263	3.551	2.893	33.541
Maranhão	19.149	19.775	15.762	14.354	14.246	14.337	15.455	15.920	16.353	16.981	16.286	15.909	194.527
Piauí	11.003	11.660	7.917	6.861	6.258	5.943	6.597	7.723	8.296	7.627	7.054	6.411	93.360
Ceará	27.749	43.340	27.053	21.761	17.350	15.787	15.570	16.120	16.540	16.767	14.945	13.359	246.341
Rio Grande do Sul	9.041	11.206	7.254	5.581	5.161	4.698	4.804	4.779	4.829	5.389	5.691	5.667	74.100
Paraíba	10.806	13.019	9.110	7.729	6.848	6.182	7.635	6.952	7.184	7.275	6.861	6.515	96.116
Pernambuco	16.258	19.434	16.769	15.657	14.468	13.642	14.801	14.482	14.333	14.188	13.588	11.995	179.615
Alagoas	7.696	8.973	7.977	6.951	7.189	6.851	7.303	7.048	6.859	7.033	7.484	6.872	88.236
Sergipe	4.327	4.956	4.159	3.842	4.113	4.080	4.160	3.654	3.811	3.360	3.571	3.302	47.335
Bahia	21.256	21.420	17.916	16.734	16.177	15.252	18.697	18.406	17.778	18.806	18.126	15.415	215.983
Minas Gerais	10.948	9.284	9.837	10.291	9.575	9.838	11.312	12.294	13.485	13.274	12.971	11.574	134.683
Espírito Santo	2.265	2.335	2.418	2.636	2.297	2.304	2.502	2.911	2.421	2.448	2.316	1.944	28.797
Rio de Janeiro	2.441	2.445	2.059	2.221	2.275	2.664	2.798	3.000	2.314	3.291	2.959	2.512	30.979
São Paulo	4.041	4.384	4.591	4.105	3.738	3.782	3.896	4.623	4.917	5.256	4.789	4.429	52.551
Paraná	6.606	6.698	6.087	5.584	5.614	5.603	5.344	7.120	8.077	7.814	6.825	5.870	77.242
Santa Catarina	4.231	3.520	3.597	3.582	3.440	3.322	3.253	3.855	3.726	3.822	3.884	3.466	43.698
Rio Grande do Sul	3.215	3.202	3.269	2.650	2.661	2.605	2.608	2.898	2.887	3.142	3.514	3.480	36.131
Mato Grosso do Sul	1.824	1.467	1.498	1.661	1.545	1.657	1.630	2.174	2.128	2.189	2.064	1.909	21.746
Mato Grosso	4.201	3.441	3.185	3.581	3.015	3.403	3.358	3.917	4.384	4.686	4.536	3.879	45.586
Goiás	5.630	5.282	4.794	4.900	4.732	4.338	4.621	6.381	6.301	6.997	5.947	5.944	65.867
Distrito Federal	554	609	508	501	528	568	579	605	552	572	613	501	6.690

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Atenção Básica - SIAB

Sistema de Informação de Atenção Básica - Situação de Saúde - São Paulo

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Atenção Básica - SIAB
Cr<2a c/diarr por Ano/Mês segundo Regional de Saúde

Regional de Saúde	2002/Jan	2002/Fev	2002/Mar	2002/Abr	2002/Mai	2002/Jun	2002/Jul	2002/Ago	2002/Set	2002/Out	2002/Nov	2002/Dez	TOTAL
TOTAL	4.041	4.384	4.591	4.105	3.738	3.782	3.896	4.623	4.917	5.256	4.789	4.429	52.551
3501 S.Paulo	429	486	444	509	349	447	245	323	275	254	461	304	4.526
3502 Santo André	219	465	470	317	417	377	313	413	270	267	230	174	3.932
3503 Moji das Cruzes	39	41	47	29	36	85	42	42	85	64	67	101	678
3504 Franco da Rocha	152	152	160	195	151	147	139	149	157	152	166	132	1.852
3505 Osasco	103	201	111	145	140	188	191	161	132	101	155	149	1.777
3506 Araçatuba	187	135	175	145	154	150	120	230	179	184	148	71	1.878
3507 Araraquara	51	48	89	59	107	66	99	68	70	12	51	55	775
3508 Assis	156	144	151	170	138	110	88	112	150	157	121	135	1.632
3509 Barretos	41	60	97	23	23	20	136	57	91	58	94	145	845
3510 Bauru	76	104	139	106	50	72	96	103	131	223	254	144	1.498
3511 Botucatu	57	55	62	113	28	25	65	64	72	99	67	82	789
3512 Campinas	114	70	84	75	68	63	55	107	79	112	106	161	1.094
3513 Franca	69	50	76	100	61	104	66	130	153	123	160	150	1.242
3514 Marília	264	228	267	201	202	168	184	307	340	407	265	286	3.119
3515 Piracicaba	219	255	245	199	179	162	295	198	247	196	196	110	2.501
3516 Presidente Prudente	408	254	229	234	279	351	295	417	392	335	241	333	3.768
3517 Registro	115	184	116	108	95	77	192	102	130	196	127	116	1.558
3518 Ribeirão Preto	84	72	104	104	189	168	172	214	254	378	387	231	2.357
3519 Santos	165	164	224	242	225	215	233	208	219	190	206	258	2.549
3520 S.João da Boa Vista	95	92	134	69	112	57	57	52	135	200	147	214	1.364
3521 S.José dos Campos	225	342	417	276	202	252	249	252	241	314	238	311	3.319
3522 S.José do Rio Preto	203	145	141	147	125	121	107	211	258	262	150	165	2.035
3523 Sorocaba	459	506	459	405	318	274	347	536	688	632	501	439	5.564
3524 Taubaté	111	131	150	134	90	83	110	167	169	340	251	163	1.899

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Atenção Básica - SIAB

**Cr<2a c/diarr por Ano/Mês segundo Município
Regional de Saúde: 3524 Taubaté
Período: 2002**

Município	2002/Ja n	2002/Fe v	2002/Ma r	2002/Ab r	2002/Ma i	2002/Ju n	2002/Jul	2002/Ag o	2002/Se t	2002/Ou t	2002/No v	2002/De z
TOTAL	111	131	150	134	90	83	110	167	169	340	251	163
350250 Aparecida	9	4	4	2	3	-	2	4	6	10	5	1
350315 Arapeí	20	5	3	4	1	-	4	-	13	22	1	-
350350 Arelas	7	2	3	-	-	-	1	3	-	-	-	-
350490 Bananal	-	-	-	2	-	3	2	5	4	4	2	-
350860 Cachoeira Paulista	1	15	29	20	12	17	1	19	5	7	33	46
350995 Canas	1	2	-	4	-	5	4	-	3	2	4	4
351340 Cruzeiro	9	30	5	22	3	2	19	1	8	3	31	2
351360 Cunha	10	15	9	6	3	2	2	10	18	11	8	8
351840 Guaratinguetá	5	3	18	15	15	6	14	9	13	13	15	16
352630 Lagoinha	-	3	4	3	3	-	4	-	4	9	5	6
352660 Lavrinhas	5	1	18	2	14	1	4	4	1	1	1	1
352720 Lorena	3	2	9	17	2	2	2	2	15	183	19	13
353800 Pindamonhangaba	15	17	22	11	8	5	12	17	12	16	60	12
354075 Potim	4	4	5	2	1	2	-	47	5	1	-	1
354190 Queluz	4	1	-	1	3	6	3	1	2	5	9	14
354230 Redenção da Serra	10	13	11	17	16	21	17	11	39	32	21	22
354820 Santo Antônio do Pinhal	2	1	2	1	3	4	1	20	7	1	1	4
355000 São Luís do Paraitinga	4	9	6	5	-	3	-	10	7	14	-	1
355200 Silveiras	2	3	-	-	2	3	5	4	7	6	5	7
355480 Tremembé	-	1	2	-	1	1	13	-	-	-	31	5

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Atenção Básica - SIAB

Período: 2002	Unid.Federação	Óbitos<1a Diarr por Ano/Mês segundo Unid.Federação												Total
		2002/Jan	2002/Fev	2002/Mar	2002/Abr	2002/Mai	2002/Jun	2002/Jul	2002/Ago	2002/Set	2002/Out	2002/Nov	2002/Dez	
TOTAL		721	580	496	607	411	311	424	449	406	363	369	265	5.402
Rondônia		5	3	2	6	1	3	1	38	1	2	1	2	65
Acre		6	1	5	2	2	1	2	1	-	4	1	1	26
Amazonas		31	25	24	41	8	25	16	19	37	16	15	16	273
Roraima		1	-	-	2	2	3	1	1	-	-	-	-	10
Pará		36	23	36	32	45	25	59	34	35	34	17	17	393
Amapá		1	1	6	4	3	3	2	2	2	6	4	4	38
Tocantins		7	3	5	10	7	7	8	11	35	35	15	14	157
Maranhão		69	72	68	51	74	46	42	85	52	33	50	49	691
Plauí		29	44	18	105	15	10	21	18	12	14	18	4	308
Ceará		26	78	78	46	42	20	39	17	23	11	13	17	410
Rio Grande do Norte		15	20	9	14	7	9	9	10	6	15	15	5	134
Paraíba		21	32	15	17	16	9	20	12	19	25	8	10	204
Pernambuco		40	64	40	49	38	29	26	35	41	16	29	16	423
Alagoas		30	32	22	15	13	8	10	9	11	8	13	14	185
Sergipe		17	15	11	16	11	18	14	13	5	6	6	5	137
Bahia		75	48	56	56	39	32	58	39	37	33	42	30	545
Minas Gerais		34	30	32	48	27	14	32	41	23	29	48	16	374
Espírito Santo		14	10	9	11	6	4	13	5	6	4	10	10	102
Rio de Janeiro		2	3	4	-	2	3	4	6	4	7	11	1	47
São Paulo		3	8	3	6	12	7	8	8	11	11	16	3	96
Paraná		13	34	13	24	8	11	8	11	9	9	14	8	162
Santa Catarina		6	6	8	10	12	7	11	6	8	7	6	3	90
Rio Grande do Sul		214	8	4	9	7	-	7	5	4	5	-	5	268
Mato Grosso do Sul		1	4	15	9	3	6	3	3	4	5	3	1	57
Mato Grosso		6	3	8	6	1	5	4	6	7	7	3	1	57
Goiás		19	9	5	18	10	5	6	14	14	21	11	13	145
Distrito Federal		-	4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	5

Óbitos<1a Diarr segundo Regional de Saúde
Período: 2002

Regional de Saúde	Óbitos<1a Diarr
TOTAL	96
3501 S.Paulo	5
3502 Santo André	12
3503 Moji das Cruzes	1
3504 Franco da Rocha	7
3506 Araçatuba	2
3510 Bauru	10
3512 Campinas	4
3513 Franca	8
3514 Marília	3
3515 Piracicaba	5
3516 Presidente Prudente	4
3517 Registro	2
3518 Ribeirão Preto	2
3519 Santos	3
3520 S.João da Boa Vista	3
3521 S.José dos Campos	9
3522 S.José do Rio Preto	2
3523 Sorocaba	6
3524 Taubaté	8

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Atenção Básica

**Óbitos<1a Diarr por Ano/Mês segundo Reg Saude/Municip
Regional de Saúde: 3524 Taubaté
Período: 2002**

Reg Saude/Municip	2002/Fev	2002/Mar	2002/Abr	2002/Jun	2002/Ago	2002/Out	2002/Nov	2002/Dez	Total
TOTAL	1	1	1	1	1	1	1	1	8
3524 Taubaté	1	1	1	1	1	1	1	1	8
.... Cachoeira Paulista	-	-	-	-	-	-	1	1	2
.... Canas	-	-	1	-	-	-	-	-	1
.... Cruzeiro	1	-	-	-	-	-	-	-	1
.... Lorena	-	-	-	-	1	-	-	-	1
.... Pindamonhangaba	-	-	-	-	-	1	-	-	1
.... Santo Antônio do Pinhal	-	-	-	1	-	-	-	-	1
.... São José do Barreiro	-	1	-	-	-	-	-	-	1

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Atenção Básica - SIAB

APÊNDICE 7

SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ÁGUA E ALIMENTOS NOTIFICADOS A DIVISÃO DE DTHA, NO PERÍODO DE 2000 A 2003.					
ANO	TOTAL DE SURTOS	PESSOAS DOENTES	POR Cryptosporidium		
			PESSOAS DOENTES	MUNICÍPIO	OBSERVAÇÕES
2000	197	4918	12	Riolândia	
2001	379	8467	21	São Paulo ar1	escola infantil creche de hospital crianças e adultos
			87	São Paulo ar2	
			138	Luiz Antonio	
			11	Luiz Antonio	
			71	Ibirá	
			20	Icem	
			23	Jales	
			39	Nova Granada	
			47	Riolândia	
			163	Riolândia	
			13	Uberama	
			3	Tabapuã	
2002	197	3950	17	Butantã	
2003	135	6036	10	São José do Rio Preto	
			31	Campo limpo	
TOTAL	908	23371	706		

FONTE: VE São Paulo

Disponível na URL <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm>

APÊNDICE 8

SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ÁGUA E ALIMENTOS NOTIFICADOS A DIVISÃO DE DTHA, PELO MUNICÍPIO DE TAUBATÉ, NO PERÍODO DE 2000 A 2003.			
ANO	NÚMERO DE SURTOS	PESSOAS DOENTES	CAUSA
2000	2	40	<i>Salmonella</i>
		37	<i>Salmonella</i>
2001	7	46	IGNORADA
		8	<i>Staphylococcus aureus; Bacillus cereus</i>
		2	IGNORADA
		6	IGNORADA
		11	<i>Salmonella</i>
		122	<i>S. flex. inneri; E. coli</i>
2002	6	9	IGNORADA
		16	<i>Staphylococcus aureus</i>
		2	IGNORADA
		96	<i>Salmonella</i>
		40	<i>Bacillus cereus</i>
2003	1	6	IGNORADA
		11	<i>Salmonella</i>
TOTAL	16	455	

FONTE: VE São Paulo

Disponível na URL <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm>

APÊNDICE 9

CASOS DE DIARRÉIA NOTIFICADOS À VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE TAUBATÉ POR PAMOSs SENTINELA*, DURANTE O ANO DE 2002.						
Localidades	Faixa Etária				Total	%
	< 1	1 a 4	5 a 9	> 10		
Belém	2				2	1,0
Cidade Jardim			1	1	2	1,0
Chac. Silvestre		2	2		4	1,9
Esp Sta Terezinha	13	36	23	8	80	38,5
Gurilândia	2	4	1		7	3,4
Imaculada	2	31	15	3	51	24,5
Imaculada-cigano	1	1			2	1,0
Jd Rezende	3	3	1		7	3,4
Mourisco	5	9	5		19	9,1
Piratininga	1	7	4	1	13	6,3
Quiririm	2	7	1	2	12	5,8
Santa Fé		1		1	2	1,0
São Pedro		5	1		6	2,9
Três Marias		1			1	0,5
Total	31	107	54	16	208	100,0
%	14,9	51,4	26,0	7,7	100,0	

Postos de Atendimento Médico e Odontológico selecionados para coleta de dados do Programa de Controle de Diarréias - Busca Ativa de Casos.
Fonte VE Taubaté, SP