



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**



FLÁVIA THAMIRIS FIGUEIREDO PACHECO

Avaliação de métodos de diagnóstico laboratorial de coccídeos intestinais oportunistas e caracterização molecular das espécies de *Cryptosporidium* isoladas em amostras fecais

Salvador
2013

FLÁVIA THAMIRIS FIGUEIREDO PACHECO

Avaliação de métodos de diagnóstico laboratorial de coccídeos intestinais oportunistas e caracterização molecular das espécies de *Cryptosporidium* isoladas em amostras fecais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina
Aquino Teixeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Neci Matos Soares

Salvador
2013

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Pacheco, Flávia Thamiris Figueiredo.

Avaliação de métodos de diagnóstico laboratorial de coccídeos intestinais oportunistas e caracterização molecular das espécies de *Cryptosporidium* isoladas em amostras fecais / Flávia Thamiris Figueiredo Pacheco. - 2013.

104 f. : il.

Inclui anexos.

Orientadora: Profª Drª Márcia Cristina Aquino Teixeira.

Co-orientadora: Profª Drª Neci Matos Soares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2013.

1. *Cryptosporidium*. 2. Diagnóstico de laboratório. 3. Teste imunoenzimático. 4. Reação em cadeia de polimerase. 5. Polimorfismo (Genética) - Análise. I. Teixeira, Márcia Cristina Aquino. II. Soares, Neci Matos. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD - 616.96

CDU - 616.993.19



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



TERMO DE APROVAÇÃO

FLÁVIA THAMIRIS FIGUEIREDO PACHECO

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE COCCÍDEOS INTESTINAIS OPORTUNITAS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE CRYPTOSPORIDIUM ISOLADAS EM AMOSTRAS FECAIS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aprovada em 12 de abril de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Márcia Cristina Aquino Teixeira
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr. Alexandre Ribeiro Bello
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dr^a. Elisângela Vitória Adorno
Universidade Federal da Bahia

APOIO FINANCEIRO

A mestranda recebeu bolsa da Fundação de Amparo e Apoio a Pesquisa (FAPESB) - pedido n° 1146/2011 e termo de outorga n° BOL0312/2011.

O projeto desenvolvido foi financiado pela FAPESB, no edital n° 005/2007, sob pedido de n° 8816/2007 e termo de outorga n° APR0228/2008.

*A minha MãE, Elisabete, exemplo de vida, guerreira da vida,
Por todo esforço na minha criação e educação
Pelo amor incondicional, por ter sempre me apoiado em meus projetos
Por termos, juntas, vencido tantos obstáculos
A você, Mãe, a pessoa que mais admiro neste mundo, dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Elisabete, e meus irmãos, Kleber, Karol e Gabriel, pelo amor, carinho, paciência e apoio nos momentos difíceis.

À toda minha família, pelo apoio na realização deste sonho. Especialmente, a meu Tio José Silva, pela amizade e confiança, por acreditar em minha capacidade.

À Arilton Ribeiro, meu namorado, amigo e parceiro de todas as horas, pela paciência e pelo companheirismo incondicional.

Meus mais sinceros agradecimentos a minha orientadora, professora e amiga Márcia Cristina Aquino Teixeira pelo amparo e constante empenho neste trabalho. Um exemplo de profissional e pessoa. Agradeço-lhe pela paciência, compreensão e por todos os ensinamentos que possibilitaram meu amadurecimento científico, intelectual e pessoal e pela confiança em minha capacidade. Sua dedicação e ética profissional são sem dúvida os mais importantes exemplos que eu poderia ter recebido neste curso.

À minha coorientadora, Prof. Neci Matos Soares, pelas valiosas sugestões e colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

À minha grande amiga e companheira nesta jornada, Renata Kelly, pela amizade e apoio. Este trabalho não seria o mesmo sem você.

Aos meus queridos colegas de laboratório Adson, Samara, Sílvia e Lamarck, pela amizade e harmoniosa convivência e pelo valioso apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas de laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Joelma, Bete e Mônica, pela amizade e pelos momentos divertidos e alegres que passamos juntas.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia, setor de diagnóstico Parasitológico: D. Silvéria, Eliene, Fernando, Rita, Marco, Rosana, Luana e Bruno pelo auxílio no processamento e leitura de amostras e pelos agradáveis momentos de convívio.

À Joelma Menezes, pelo valioso auxílio na realização da PCR, pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Ricardo Riccio pela ajuda na análise estatística dos dados.

À Prof. Tânia, Prof. Joyce, Prof. Marilda e Prof. Elizângela pela colaboração neste trabalho e pela disponibilização dos seus respectivos laboratórios para realização dos experimentos. À Dra. Tereza e toda equipe da Unidade Metabólica do CPPHO-UFBA, pelo auxílio na obtenção das amostras.

Ao colega Umberto, pelo apoio na formatação das figuras do artigo.

Aos meus amigos e colegas da Pós-Graduação em Farmácia, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Aos professores do curso de mestrado Acadêmico em Farmácia, pelas aulas e conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

À Faculdade de Farmácia/UFBA, pela oportunidade fornecida aos alunos de pós-graduação em Farmácia.

À FAPESB, pelo apoio financeiro concedido.

Não posso deixar de agradecer a DEUS, por ter-me concedido a oportunidade da realização desse sonho, dando-me saúde, sabedoria, paciência e força para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

(Madre Teresa de Calcutá)

PACHECO, Flávia Thamis Figueiredo. **Avaliação de métodos de diagnóstico laboratorial de coccídeos intestinais oportunistas e caracterização molecular das espécies de *Cryptosporidium* isoladas de amostras fecais.** 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

RESUMO

O diagnóstico dos coccídeos *Cryptosporidium* e *Isospora belli* é realizado principalmente pela pesquisa de oocistos em esfregaços fecais corados. Entretanto, não existe uma padronização na rotina laboratorial para a identificação microscópica desses coccídeos. O diagnóstico da *Cryptosporidium* pode também ser realizado pela detecção de coproantígenos por ensaio imunoenzimático (ELISA) ou pela amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), dispensando a identificação morfológica dos oocistos. Além disso, a análise do polimorfismo genético de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) pode ser utilizada na caracterização das espécies de *Cryptosporidium*, permitindo um melhor entendimento da dinâmica da transmissão deste parasito. Os objetivos deste trabalho foram: (1) comparar as técnicas de concentração de formol-acetato de etila (FE) e sedimentação por centrifugação (SC), bem como as técnicas de coloração de Ziehl-Neelsen modificado (ZN), auramina (AR) e safranina (SF) na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e *Isospora belli* em amostras fecais; (2) comparar a microscopia com a pesquisa de coproantígeno para o diagnóstico de *Cryptosporidium* e avaliar os resultados discordantes utilizando a PCR e (3) caracterizar as espécies de *Cryptosporidium* de amostras fecais humanas, através da PCR-RFLP. Para comparação entre os métodos de concentração de oocistos, FE e SC, e as técnicas de coloração, ZN, AR e SF, foram utilizadas amostras fecais positivas para *Cryptosporidium* (n=27) e *I. belli* (n=15), conservadas em formalina a 10%. Os métodos foram avaliados quanto ao número de oocistos detectados e a qualidade microscópica dos esfregaços. Para comparação entre o método de ZN e ELISA para o diagnóstico de *Cryptosporidium* foram examinadas amostras fecais de 626 crianças de diferentes grupos. Posteriormente, todas as amostras positivas para *Cryptosporidium* obtidas no estudo, juntamente com outros isolados disponíveis no laboratório, foram submetidos à extração de DNA e análise por Nested-PCR/RFLP dos genes COWP e 18S rRNA, para determinação das espécies de *Cryptosporidium*. Os métodos SC e ZN identificaram mais oocistos de ambos parasitos do que os demais métodos avaliados ($p<0,05$). Houve perda de oocistos no anel de detritos gordurosos no FE em praticamente todas as amostras de *Cryptosporidium* e *I. belli*. Por outro lado, os métodos FE e AR apresentaram menos artefatos nos esfregaços comparados aos demais, sendo classificados com qualidade microscópica superior. A frequência de *Cryptosporidium* nas crianças foi de 2,6% (16/626), sendo maior no grupo com doença diarreica, enfatizando a importância deste coccídeo como agente etiológico da diarreia infantil. A sensibilidade e especificidade do ELISA foram de 85,7% e 99,7%, respectivamente. A eficiência da amplificação do DNA de *Cryptosporidium* foi de 92% (23/25), considerando os resultados dos dois genes analisados. As espécies do parasito identificadas foram *C. hominis* (78,3%), *C. felis* (8,7%), *C. parvum* (4,3%) e mistura *C. felis* + *C. hominis* (8,7%). Esses dados são os primeiros de genotipagem de *Cryptosporidium* de indivíduos de Salvador, demonstrando a predominância de *C. hominis* nas infecções, e a elevada frequência de *C. felis*, sugerindo um provável papel de gatos na transmissão do parasito aos humanos em nosso meio.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. *Isospora belli*. Ziehl-Neelsen modificado. ELISA. PCR-RFLP.

PACHECO, Flávia Thamis Figueiredo. **Evaluation of methods of laboratory diagnosis of intestinal coccidia opportunistic and molecular characterization of *Cryptosporidium* species isolated from fecal samples.** 104 f. Master Dissertation – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

ABSTRACT

The diagnosis of coccidia *Isoospora belli* and *Cryptosporidium* is usually accomplished by identification of oocysts in stained fecal smears. However, there is a lack of standardization in the routine laboratory for microscopic identification of these coccidia. The diagnosis of *Cryptosporidium* can also be done by detecting coproantigens using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) or by parasite DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR), eliminating the need of morphological identification of oocysts. Furthermore, the analysis of restriction fragment length polymorphism of amplified DNA (RFLP-PCR) can be used to characterize the species of *Cryptosporidium*, allowing a better understanding of the transmission dynamics of the parasite. The objectives of this study were: (1) to compare the techniques of concentration of formalin-ethyl acetate (FE) and sedimentation by centrifugation (SC), as well as the techniques of modified Ziehl-Neelsen (ZN), auramin (AR) and safranin (SF) in the detection of *Cryptosporidium* and *Isoospora belli* in stool samples, (2) to compare the microscopy with coproantigen detection for the diagnosis of *Cryptosporidium* and evaluate discordant results using PCR and (3) to characterize the species *Cryptosporidium* in human fecal samples by PCR-RFLP. To compare the methods for concentration, FE and SC, and staining of oocysts, ZN, AR and SF, there were used positive fecal samples for *Cryptosporidium* (n = 27) and *I. belli* (n = 15), preserved in 10% formalin. The methods were evaluated according the numbers of oocysts detected and the microscopic quality of smears. For comparison between ELISA and ZN for the diagnosis of *Cryptosporidium* in faecal samples, there were examined 626 stool samples from children of different groups. Subsequently, all positive samples for *Cryptosporidium* obtained in the study, along with other isolates available in the laboratory, were subjected to DNA extraction and analysis by Nested-PCR/RFLP of the COWP and 18S rRNA genes to determine the species of *Cryptosporidium*. The SC and ZN methods identified more oocysts of both parasites than other methods tested (p <0.05). The loss of oocysts in the fatty debris layer of FE method was observed in all *Cryptosporidium* and *I. belli* samples. Moreover, the methods of FE and AR had fewer artifacts in smears compared to the others, being ranked with higher microscopic quality. The frequency of *Cryptosporidium* in children was 2.6% (16/626), being higher in patients with diarrheic disease, emphasizing the importance of this protozoan as etiologic agent of childhood diarrhea. The sensitivity and specificity of ELISA were 85.7% and 99.7%, respectively. The efficiency of amplification of *Cryptosporidium* DNA was 92% (23/25), considering the results of the two genes. The species of the parasite identified were *C. hominis* (78.3%), *C. felis* (8.7%), *C. parvum* (4.3%) and a mixture of *C. felis* + *C. hominis* (8.7%). To our knowledge, these data represent the first genotyping study of *Cryptosporidium* from individuals of Salvador, demonstrating the dominance of *C. hominis* infection and the high frequency of *C. felis*, suggesting a potential role of cats in the transmission of the parasite to humans in our area.

Keywords: *Cryptosporidium*. *Isoospora belli*. Modified Ziehl-Neelsen. ELISA. PCR-RFLP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ciclo biológico de *Cryptosporidium* (A) e *I. belli* (B).....24
- Figura 2** – Esfregaços fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium*, corados por Ziehl-Neelsen modificado. Aumento de 400x (A) e 1000x (B). 33
- Figura 3** – Esfregaços fecais contendo oocistos de *Isospora belli*, corados por Ziehl-Neelsen modificado, com um esporoblasto em aumento de 400x (A) e com dois esporoblastos em aumento de 1000x (B). 34
- Figura 4** – Percentual de amostras fecais com maior quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* e *Isospora belli* detectados, de acordo com a técnica de concentração utilizada. As amostras fecais de *Cryptosporidium* e *I. belli* foram concentradas por SC ou FE e coradas por Ziehl- Neelsen modificado como descrito em Material e Métodos..... 51
- Figura 5** – Características microscópicas avaliadas na classificação dos esfregaços fecais quanto à qualidade para fins diagnósticos. Esfregaços de qualidade INFERIOR: presença constante de detritos corados pela fucsina, como leveduras (a); oocistos descorados ou pouco corados (b); contracoloração ruim e escura, que dificulta a visualização dos parasitos (c); e precipitados de corante (d). Esfregaço REGULAR : presença dessas alterações em menos da metade dos campos microscópicos lidos. Esfregaço SUPERIOR: excelente qualidade diagnóstica, sem dificuldades na identificação dos oocistos. 53
- Figura 6** – Avaliação qualitativa das técnicas de concentração SC e FE, para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e *Isospora belli*. Após concentração das fezes por SC, os esfregaços fecais foram corados por ZN e classificados microscopicamente como SUPERIOR, REGULAR e INFERIOR, como descrito em Material e Métodos..... 53
- Figura 7** – Representação gráfica da técnica de formol-acetato de etila (FE) e percentual de amostras com maior número de oocistos de *Cryptosporidium* ou *Isospora belli* detectados, de acordo com a área examinada (anel de detritos gordurosos ou sedimento)..... 56
- Figura 8** – Percentual de amostras fecais com quantidade maior de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* detectados por campo, de acordo com a técnica de coloração utilizada. As amostras fecais de *Cryptosporidium* e *I. belli* foram concentradas por SC, e os esfregaços foram corados por ZN, AR e SF, como descrito em Material e Métodos..... 59
- Figura 9** – Avaliação qualitativa das técnicas de coloração. Após concentração das fezes por SC, os esfregaços fecais foram corados por ZN, AR e SF para a identificação de *Cryptosporidium* e *I. belli* e classificados, quanto a qualidade microscópica, como SUPERIOR, REGULAR E INFERIOR, como descrito em Material e Métodos..... 60

- Figura 10** – Características microscópicas avaliadas na classificação dos esfregaços fecais quanto à qualidade das colorações ZN, SF e AR, para diagnóstico de *Cryptosporidium* (A) e *I. belli* (B). Esfregaços de qualidade INFERIOR: presença constante de detritos corados pela fucsina, como leveduras (a); oocistos descorados ou pouco corados (b); contracoloração ruim e escura, que dificulta a visualização dos parasitos (c); precipitados de corante (d); e falta de coloração da membrana do oocisto (e). Esfregaço REGULAR : presença dessas alterações em menos da metade dos campos microscópicos lidos. Esfregaço SUPERIOR: excelente qualidade diagnóstica, sem dificuldades na identificação dos oocistos. 61
- Figura 11** – Amplificação pelo Nested-PCR do gene COWP. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Os DNAs amplificados a partir dos isolados de *Cryptosporidium* foram aplicados aos canais do gel na seguinte ordem: M - marcador de peso molecular (1kb DNA ladder), canal 1 - controle positivo, canais 2-12 – amostras C71, C72, C23, B59, B35, Q345, Q89, A17, R02, C181 e L02; canal 13 – controle negativo. 64
- Figura 12** – Avaliação por RFLP do polimorfismo do gene COWP de diferentes isolados de *Cryptosporidium*. Os produtos de digestão com enzima *RsaI* do DNA de *Cryptosporidium* amplificado foram aplicados aos canais do gel a 3%, na seguinte ordem: M - marcador de peso molecular (50pb DNA ladder), canal 1 - controle positivo *C. hominis* (284, 129 e 106pb), canal 2 – controle positivo *C. parvum* (406 e 106pb), canais 3- 11– amostras C71, C72, C23, B59, B35, Q89, C181, Q345 e 025; canal 12 - amplicon do gene COWP 553pb..... 64
- Figura 13** – Amplificação pelo Nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Os DNAs amplificados a partir dos isolados de *Cryptosporidium* foram aplicados aos canais do gel na seguinte ordem: M - marcador de peso molecular (1kb DNA ladder), canal 1 - controle positivo, canais 2-12 – amostras C71, C72, C23, B59, B35, Q345, Q89, A17, R02, C181 e L02; canal 13 – controle negativo. 65
- Figura 14** – Avaliação por RFLP do polimorfismo do gene 18S rRNA nos diferentes isolados de *Cryptosporidium* com enzimas *SspI* (A) e *VspI* (B). Gel de agarose 3%. Os produtos de digestão foram aplicados aos canais do gel na seguinte ordem: M - marcador de peso molecular (50pb DNA ladder), canal 1 - controle positivo *C. hominis*, canal 2 – controle positivo *C. parvum*, canais 3-11 – amostras C71, C72, C23, B59, L02, R02, C28, Q345 e O25; canal 12 – amplicon do gene 18S rRNA de 819-825pb..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies relatadas de <i>Cryptosporidium</i> , seus principais hospedeiros e localização.	37
Tabela 2 – Fragmentos gerados dos genes COWP e 18S rRNA amplificados por PCR, após digestão com enzimas de restrição.	39
Tabela 3 – Descrição dos procedimentos das técnicas comparadas neste estudo.	42
Tabela 4 – Número total de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Isospora belli</i> detectados em 20 campos microscópicos de esfregaços fecais concentrados pelas técnicas de sedimentação por centrifugação (SC) ou formol-acetato de etila (FE). Aumento de 400x.....	50
Tabela 5 – Mediana e valores mínimo e máximo do número total de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>I. belli</i> em 20 campos microscópicos das amostras analisadas.	51
Tabela 6 – Avaliação dos métodos de concentração de acordo com a densidade de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> nas amostras fecais concentradas através das técnicas SC e FE, e corados por ZN. O escalonamento das amostras teve como base o método SC.	52
Tabela 7 – Avaliação da perda de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Isospora belli</i> em esfregaços fecais concentrados pelo método formol-acetato de etila (FE).....	55
Tabela 8 – Mediana, mínimo e máximo do número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>I. belli</i> detectados em 20 campos microscópicos, de acordo com a área analisada, após concentração pela técnica de FE.....	56
Tabela 9 – Número total de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> detectados em 20 campos microscópicos de esfregaços fecais corados por ZN, SF e AR. Aumento de 400x.	57
Tabela 10 – Número total de oocistos de <i>I. belli</i> detectados em 20 campos microscópicos de esfregaços fecais corados por ZN, SF e AR. Aumento de 400x.....	58
Tabela 11 – Mediana, mínimo e máximo do número total de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>I. belli</i> , observados em 20 campos microscópicos dos esfregaços fecais corados por ZN, SF e AR.	58
Tabela 12 – Avaliação dos métodos de coloração de acordo com a densidade de oocistos nas amostras. As amostras fecais foram concentradas através das técnicas SC e coradas por ZN, AR ou SF. O escalonamento das amostras teve como base o método ZN.	59
Tabela 13 – Frequência de <i>Cryptosporidium</i> em diferentes grupos de crianças.	62
Tabela 14 – Correlação entre ELISA e ZN para detecção de <i>Cryptosporidium</i>	63
Tabela 15 – Dados gerais das análises das amostras positivas para <i>Cryptosporidium</i> , incluindo origem da amostra, resultados dos diferentes métodos diagnósticos empregados e a genotipagem dos isolados pela análise dos genes COWP e 18S rRNA.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AR	Auramina
ASL	Tampão de lise
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças
COWP	Proteína de parede de oocisto de <i>Cryptosporidium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima
EUA	Estados Unidos da América
GP60	Glicoproteína de 60kDa
FE	Formol-acetato de etila
HSP70	Proteína do choque térmico de 70kDa
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
IP	Inibidores de protease
LACEN-BA	Laboratório central do Estado da Bahia
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qsp	Quantidade suficiente para
RFLP	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
SC	Sedimentação por centrifugação
SF	Safranina
18S rRNA	Subunidade ribossomal 18S

TAE	Tampão tris-acetado-EDTA
U	Unidades
USEPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
V	Volts
ZN	Ziehl-Neelsen modificado
μg	Micrograma
μL	Microlitros
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 HISTÓRICO	20
2.2 BIOLOGIA DE <i>Cryptosporidium E Isospora belli</i>	22
2.3 PATOGÊNESE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	24
2.4 EPIDEMIOLOGIA	27
2.5 TRATAMENTO	30
2.6 DIAGNÓSTICO	32
2.6.1 Métodos microscópicos	32
2.6.2 Métodos imunológicos.....	34
2.6.3 Métodos moleculares.....	35
2.7 GENOTIPAGEM DE <i>Cryptosporidium</i>	36
3. OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Cryptosporidium E Isospora belli</i> EM AMOSTRAS FECAIS	41
4.1.1 Amostras fecais	41
4.1.2 Métodos parasitológicos avaliados.....	41
4.1.3 Análise comparativa entre os métodos parasitológicos	43
4.1.4 Análise estatística	44
4.2 COMPARAÇÃO ENTRE O ZIEHL NEELSEN MODIFICADO E A PESQUISA DE COPROANTÍGENO POR ELISA NO DIAGNÓSTICO DA CRIPTOSPORIDIOSE E GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE <i>Cryptosporidium</i> DETECTADOS.....	44
4.2.1 Origem das amostras	44
4.2.2 Comparação entre o método parasitológico e a pesquisa de coproantígeno por ELISA para identificação de <i>Cryptosporidium</i> em amostras fecais.....	45
4.2.3 Extração de DNA dos isolados de <i>Cryptosporidium</i>.....	46
4.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	47
4.2.5 Digestão dos produtos de nested-PCR com enzimas de restrição.....	49
5. RESULTADOS	50
5.1 COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS PARA DIAGNÓSTICO DE <i>Cryptosporidium E Isospora belli</i>	50

5.1.1 Avaliação de técnicas de concentração de oocistos em amostras fecais	50
5.1.2 Avaliação de métodos de coloração de oocistos em amostras fecais.....	56
5.2 COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO PARASITOLÓGICO E A PESQUISA DE COPROANTÍGENO POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA O DIAGNÓSTICO DE <i>Cryptosporidium</i> EM AMOSTRAS FECAIS DE DIVERSOS GRUPOS DE CRIANÇAS	62
5.3 GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE <i>Cryptosporidium</i>	63
5.3.1 Amplificação e avaliação do polimorfismo do gene COWP para caracterização das espécies de <i>Cryptosporidium</i>	63
5.3.2 Amplificação e avaliação do polimorfismo do gene 18S rRNA para caracterização das espécies de <i>Cryptosporidium</i>	65
5.3.3 Avaliação das discordâncias entre ZN e ELISA no diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> utilizando a PCR	68
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS	103
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	103
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	104

1. INTRODUÇÃO

Infecções intestinais por parasitos oportunistas são importantes causas de diarreia, e um sério problema nas regiões tropicais (MARQUES et al., 2005; HANSCHIED; CRISTINO; SALGADO, 2008). Entre os agentes etiológicos, merecem destaque os protozoários *Cryptosporidium* sp e *Isospora (Cystoisospora) belli*, como os principais causadores de diarreia crônica (HANSCHIED; CRISTINO; SALGADO, 2008; ALEMU et al., 2011). Além disso, a infecção por *Cryptosporidium* sp é bastante frequente em crianças de até cinco anos de idade e pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), podendo causar diarreia aguda ou persistente quando associada a quadros de imunossupressão (GARLIPP; BOTTINI; TEIXEIRA, 1995; HUANG et al., 2004; AGNAMEY et al., 2010a; MOYO et al., 2011).

Como a diarreia aquosa é a principal manifestação das infecções causadas pelos coccídeos intestinais, o diagnóstico clínico não permite uma diferenciação específica do agente causal, de modo que a confirmação laboratorial constitui uma ferramenta imprescindível para estabelecer a diagnose diferencial e requer, no caso desses protozoários, o uso de técnicas específicas de coloração e concentração (RIGO; FRANCO, 2002; HANSCHIED; CRISTINO; SALGADO, 2008).

Existem diversos métodos imunológicos para detecção de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais, como ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (GARCIA; SHIMIZU, 1997; WEITZEL et al., 2006; ELGUN; KOLTAS, 2011), imunofluorescência direta e testes rápidos (COLLINET-ADLER; WARD, 2010; MAGI et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2011). Técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, são usadas para identificação de *Cryptosporidium* e *I. belli*, mas principalmente em pesquisas (MAGI et al., 2006; TEN HOVE et al., 2008; SKOTARCZAK, 2010), devido aos elevados custos de se implantar na rotina laboratorial. Desta forma, os métodos mais utilizados são os que permitem a visualização de oocistos nas fezes, sem a determinação da espécie envolvida, mediante técnicas de coloração de esfregaços fecais em lâminas de vidro, baseadas na propriedade de álcool-ácido resistência desses protozoários (LINDSAY; DUBEY; BLAGBURN, 1997; MAGI et al., 2006; HARRINGTON, 2008). Porém, apesar da diversidade de técnicas parasitológicas existentes para detecção de *Cryptosporidium* e *I. belli* em fezes, existem incertezas em relação as especificidades e sensibilidades dessas técnicas na prática laboratorial.

Embora tradicionalmente o diagnóstico de *Cryptosporidium* seja baseado no exame parasitológico de fezes, alguns estudos demonstram que ensaios imunoenzimáticos são iguais ou superam a eficiência da microscopia (JAYALAKSHMI; APPALARAJU; MAHADEVAN, 2008; ELGUN; KOLTAS, 2011). Por outro lado, tanto os métodos microscópicos quanto os imunoenaios não permitem a diferenciação das espécies de *Cryptosporidium*, sendo necessário o uso de métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction), pois, além de alta especificidade e sensibilidade, são capazes de distinguir as espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* envolvidos nas infecções humanas, o que apresenta importantes implicações epidemiológicas e ambientais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO

Cryptosporidium e *Isoospora (Cystoisospora) belli* são protozoários intracelulares, relacionados filogeneticamente, pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiiida, subordem Eimeriina, distinguindo-se na classificação taxonômica em nível de família, Cryptosporididae e Eimeriidae, respectivamente (PLUTZER; KARANIS, 2009; NEIRA-OTERO et al., 2010).

O protozoário *Cryptosporidium* foi primeiro descoberto na mucosa gástrica de camundongos pelo médico parasitologista Ernest Edward Tyzzer (1907), e denominado *Cryptosporidium muris*. Mais tarde, em 1912, o mesmo pesquisador identificou uma segunda espécie, o *Cryptosporidium parvum*, também encontrada em camundongos, mas com desenvolvimento no intestino delgado (TYZZER, 1912). Em 1955, Slavin encontrou oocistos de *Cryptosporidium* em perus com diarreia, e denominou-os de *Cryptosporidium meleagridis* (SLAVIN, 1955). Em 1971, este coccídeo foi encontrado pela primeira vez em bezerras com diarreia, despertando o interesse da medicina veterinária (PANCIERA; THAMASSEN; GAMER, 1971).

A primeira detecção de *Isoospora* em humanos foi realizada por Virchow em 1860 (VIRCHOW, 1860 apud WENYON, 1926) e por Eimer em 1870 (EIMER, 1870 apud WENYON, 1926), durante a necropsia de humanos, onde detectaram no intestino delgado oocistos de parasitos semelhantes àqueles que infectavam cães e gatos. O achado de oocistos desse parasito nas fezes humanas só ocorreu em 1890, em dois indivíduos com diarreia crônica (RAILLIET; LUCET, 1890 apud WENYON, 1926).

Woodcock (1915) encontrou oocistos de *Isoospora* inúmeras vezes durante análise de fezes de soldados durante a Primeira Guerra Mundial. Dobell em 1919 nomeou a espécie de *Isoospora* encontrada em humanos de *Isoospora hominis*. Mas em 1926, Wenyon sugeriu o nome de *Isoospora belli* (*belli* do latim: guerra) para as espécies descritas por Woodcock e *I. hominis* para as descritas por Virchow. Atualmente sabe-se que os oocistos identificados como *I. hominis* eram *Blastocystis hominis*. Embora no gênero *Isoospora* haja centenas de espécies descritas que podem causar infecções em mamíferos diversos, a espécie clinicamente mais importante para o ser humano é a *Isoospora (Cystoisospora) belli* (LINDSAY; DUBEY; BLAGBURN, 1997).

Antigamente todas as espécies do gênero *Cystoisospora* também pertenciam ao gênero *Isospora*. A diferença na nomenclatura é devido à capacidade de formação (*Cystoisospora*) ou não (*Isospora*) de cistos teciduais (FRENKEL, 1977). Estudos têm demonstrado controvérsias em relação à classificação taxonômica da até então conhecida *I. belli* (BOX et al., 1980; LEVINE, 1988; CARRENO et al., 1998). Entretanto, trabalhos têm demonstrado uma maior relação filogenética desta espécie com o gênero *Cystoisospora* (CARRENO et al., 1998; FRANZEN et al., 2000), porém, na prática ainda é pouco comum a utilização da denominação *Cystoisospora belli*, portanto, neste trabalho usamos a nomenclatura *Isospora belli*.

Até a década de 70 pouca importância clínica era atribuída a esses parasitos, com raros relatos de infecções em humanos. Até 1935 apenas 200 casos de isosporíase humana foram notificados no mundo (NEIRA-OTERO et al., 2010), enquanto que os primeiros casos de criptosporidiose em humanos foram relatados somente em 1976, um em uma criança saudável (NIME et al., 1976) e outro em adulto imunossuprimido (MEISEL et al., 1976). No início da década de 80, com o advento da AIDS, foram relatados inúmeros casos humanos de infecções por *Cryptosporidium* e/ou *I. belli* (TZIPORI; WIDMER, 2008; NEIRA-OTERO et al., 2010). A associação entre AIDS e esses protozoários tem atraído a atenção da comunidade médica e científica por todo o mundo.

A criptosporidiose conquistou ainda maior importância na saúde pública após diversos surtos de veiculação hídrica, como o surto de criptosporidiose por água no Texas (1985) e na Georgia (1986), Estados Unidos da América (EUA). Em 1988, a agência norte americana de proteção ambiental, USEPA (United States, Environmental Protection Agency), incluiu a pesquisa de *Cryptosporidium* na lista de prioridade de água potável (HACHICH, 2002). Contudo, em 1993 ocorreu o maior surto de criptosporidiose no mundo na cidade de Miliwaukee, EUA, que afetou cerca de 400000 pessoas (MAC KENZIE et al., 1994).

No Brasil, em 12 de Dezembro de 2011, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 2914 1469, que revogou as Portarias nº 1469 de 2000 e 518 de 2004, reforçando a recomendação da inclusão da pesquisa de organismos patogênicos em água destinada a consumo humano, visando o padrão de ausência, dentro outros, de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* (BRASIL, 2011).

2.2 BIOLOGIA DE *Cryptosporidium* E *Isospora belli*

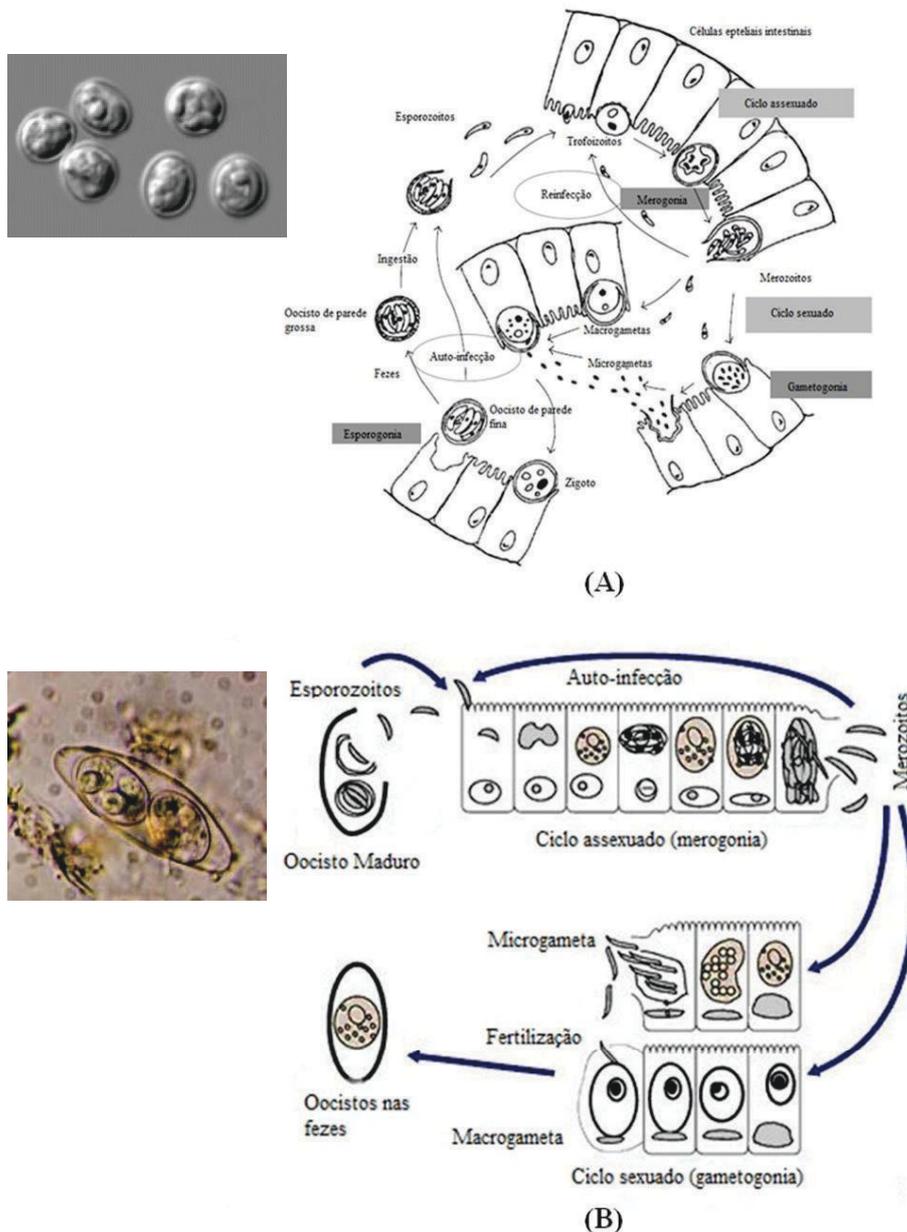
Os coccídeos *Cryptosporidium* e *I. belli* têm como habitat normal a mucosa intestinal de seus hospedeiros, com exceção de algumas espécies de *Cryptosporidium*, como *C. muris*, que se localizam na mucosa gástrica.

O ciclo evolutivo desses coccídeos intestinais é monoxênico, completando-se dentro de um único hospedeiro, passando por diferentes estágios evolutivos: excistamento, ciclo assexuado (merogonia), e ciclo sexuado (gametogonia) (Figura 1). O ciclo começa com a ingestão de oocistos viáveis e infectivos por um hospedeiro susceptível. A forma infectante das espécies do gênero *Cryptosporidium* e da *I. belli* é o oocisto, elemento de resistência do parasito que permite a disseminação da infecção. O oocisto de *Cryptosporidium* é esférico ou ovoide, mede entre 4 a 6µm de diâmetro e contem quatro esporozoítos no seu interior (Figura 1A) (DEL COCO; CORDOBA; BASUALDO, 2009). O oocisto infectante de *I. belli* se caracteriza por ser elipsoide e apresentar uma membrana fina, com tamanho variando de 25 a 30µm de comprimento e 10 a 19µm de largura, apresentando no seu interior dois esporocistos, contendo cada um quatro esporozoítos (Figura 1B) (LINDSAY; DUBEY; BLAGBURN, 1997). No aparelho digestivo do hospedeiro, essas formas sofrem excistamento, que consiste na ruptura da parede do oocisto e liberação dos esporozoítos. Esse processo requer condições redutoras específicas, como a presença de proteases e sais biliares que ajudam a romper o oocisto (WOODMANSEE, 1987).

Os esporozoítos liberados são móveis e invadem os enterócitos, principalmente do jejuno e íleo, por meio de reconhecimento de receptores específicos. Após a penetração, os esporozoítos do gênero *Cryptosporidium* se desenvolvem na periferia do citoplasma da célula hospedeira (Figura 1A), enquanto que os esporozoítos da *I. belli* completam o ciclo no interior do citoplasma, próximo ao núcleo (Figura 1B). Uma matriz densa de elementos do citoesqueleto isola o citoplasma hospedeiro do parasito, resultando na formação do vacúolo parasitóforo (VALIGUROVÁ et al., 2008). Dentro dessa estrutura, esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos que amadurecem e sofrem divisões (ciclo assexuado ou merogonia) formando o meronte tipo I que contem seis a oito merozoítos, estruturalmente similares aos esporozoítos, que são liberados e invadem outras células epiteliais repetindo o ciclo assexuado (etapa que constitui uma fonte de autoinfecção) ou diferenciando-se em merontes tipo II que contem quatro merozoítos. Essas formas evolutivas iniciam o ciclo sexuado quando se diferenciam em macro e microgametas. Os microgametas sofrem exflagelação e fertilizam os macrogametas, produzindo o zigoto. A célula ovo ou zigoto se encista, dando origem aos

oocistos. Os oocistos de *Cryptosporidium* sofrem esporogonia ainda dentro do hospedeiro, gerando os esporozoítos infectantes. Os oocistos de *Cryptosporidium* podem ser de parede fina ou de parede grossa. Os de parede fina se rompem ainda dentro do hospedeiro liberando esporozoítos infectantes (fonte de autoinfecção), já os oocistos de parede grossa são eliminados nas fezes do hospedeiro, constituindo a forma de resistência e de disseminação (Figura 1A). Os oocistos de *I. belli*, por sua vez, são liberados pelo hospedeiro ainda imaturos, contendo apenas um esporoblasto (Figura 1B), e sofrem esporogonia apenas no ambiente sob condições favoráveis de temperatura e pH, tornando-se assim infectante (LINDSAY; DUBEY; BLAGBURN, 1997; KOSEK et al., 2001; CHEN et al., 2002; DESPORTES-LIVAGE; DATRY, 2005; DEL COCO; CORDOBA; BASUALDO, 2009; COLLINET-ADLER; WARD, 2010; MURO et al., 2010).

Figura 1 – Ciclo biológico de *Cryptosporidium* (A) e *I. belli* (B).



Fonte: Adaptado de PUTIGNANI; MENICHELIA, 2010 e Center for Disease Control and Prevention – CDC (<http://www.cdc.gov/parasites/cystoisospora/biology.html>), respectivamente.

2.3 PATOGÊNESE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os protozoários *I. belli* e *Cryptosporidium* causam as doenças clínicas denominadas isosporíase e criptosporidiose, respectivamente. Clinicamente essas doenças são indistinguíveis, caracterizadas por uma síndrome gastroentérica. As doenças variam na

gravidade de leve a severa, e as manifestações dependem do sítio de colonização e do estado imune do hospedeiro (CHALMERS; DAVIES, 2010; NEIRA-OTERO et al., 2010; NAVANEETHAN et al., 2012).

O principal local de infecção por essas coccidioses é o intestino delgado. Os danos ou morte dos enterócitos podem ser decorrentes da invasão direta e multiplicação do parasito. As principais alterações microscópicas durante a fisiopatogênese dessas coccidioses são atrofia das vilosidades que pode variar de leve a achatamento total, hiperplasia da cripta e aumento da permeabilidade celular (CLARK; SEARS, 1996; GOODGAME, 1996; CAPET et al., 1999; KELLY et al., 2004; KLEIN et al., 2008). O intestino apresenta um infiltrado inflamatório na lâmina própria, com presença de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e células plasmáticas (CLARK; SEARS, 1996; GOODGAME, 1996; RAO et al., 2012). A apoptose de célula intestinal tem sido identificada em cultura de células epiteliais biliares e intestinais (CHEN et al., 1998; CHEN et al., 1999; OJCIUS et al., 1999).

Os mecanismos moleculares pelos quais *Cryptosporidium* e *I. belli* causam diarreia são desconhecidos. Os três principais mecanismos propostos são: má absorção resultando em uma diarreia osmótica; diarreia induzida por produtos inflamatórios; e ação de enterotoxina do parasito resultando em diarreia secretória. Estudos têm relatado má absorção em alguns pacientes com criptosporidiose, evidenciada por absorção de vitamina B12 e D-xilose reduzida nesses pacientes, além de aumento da má absorção e atrofia das vilosidades com a carga parasitária aumentada (GOODGAME et al., 1995; KLEIN et al., 2008). Outros estudos têm demonstrado que a permeabilidade celular e inflamação aumentadas na lâmina própria contribuem para a diarreia via ação de citocinas e neuropeptídeos (GOODGAME, 1996; BORAD; WARD, 2010). Resumidamente, os mecanismos causadores da diarreia por essas coccidioses são multifatoriais, consistindo do efeito do parasito e seus produtos sobre o epitélio e a resposta inflamatória e imunológica, levando a absorção intestinal debilitada e secreção aumentada. A natureza aquosa e volumosa da diarreia assemelha-se com diarreia secretória, sugestivo de ação de enterotoxina produzido pelo parasito, entretanto, embora a atividade de toxina tenha sido observada em estudos *in vitro*, até o momento nenhuma enterotoxina foi isolada desses coccídeos (GUARINO et al., 1994; 1995; NEIRA-OTERO et al., 2010).

Os sinais e sintomas clínicos da criptosporidiose e da isosporíase varia de acordo o estado imunológico do paciente. Em indivíduos imunocompetentes essas coccidioses são limitadas ao trato gastrointestinal, os sinais e sintomas clínicos variam de indivíduos assintomáticos a aqueles com sintomas gastrointestinais leves e autolimitados. A diarreia tem

início súbito e é geralmente aquosa e volumosa. Outros sintomas agudos incluem dor abdominal, náusea, febre, anorexia e desidratação (NEWMAN et al., 1999; XIAO et al., 2001; PEREIRA et al., 2009; CHALMERS; DAVIES, 2010), com duração média dos sintomas de 12 dias (MAC KENZIE et al., 1994). Em um estudo realizado com 87 crianças do Kuwait com infecção por *Cryptosporidium*, foi demonstrada a maior frequência de diarreia aquosa (83%) e desidratação (20%) entre os sintomas. Febre estava presente em 21% dos casos, e 16% queixaram de náusea e vômito (IQBAL; KHALID; HIRA, 2011).

Embora pacientes imunocompetentes, bem nutridos e saudáveis sejam portadores assintomáticos, ou se recuperem espontaneamente da isosporíase e/ou criptosporidiose, alguns grupos de pacientes imunocomprometidos, especialmente indivíduos com HIV/AIDS, podem sofrer doença crônica e prolongada, algumas vezes com desfechos fatais. Em tais pacientes essas coccidioses são caracterizadas por diarreia crônica e persistente, resistente ao tratamento (MALIK et al., 2005; ABUBAKAR et al., 2007; PEREIRA et al., 2009; CHALMERS; DAVIES, 2010; MURO et al., 2010; NEL et al., 2011; BOYLES et al., 2012). Em geral, pacientes com HIV/AIDS apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, variando de assintomático a enfermidade fulminante, dependendo do local da infecção e contagem de células T CD4 (ASSEFA et al., 2009; CHEN et al., 2002). Indivíduos com contagem de células T CD4 menor que 200 células/ μ l geralmente apresentam quadros mais graves das infecções por *Cryptosporidium* e *I. belli* (GUPTA et al., 2008; ASSEFA et al., 2009; KULKARNI et al., 2009; OLESEGUN; OKAKA; MACHADO, 2009; PAVIE et al., 2012).

Em pacientes imunocomprometidos, além de doença intestinal severa, doença extraintestinal também pode se desenvolver, e geralmente representa uma extensão da infecção intestinal primária. Em tais indivíduos, a criptosporidiose pode afetar todo o trato gastrointestinal incluindo vesícula biliar e ducto pancreático, podendo causar colangite esclerosante (ABDO et al., 2003) e pancreatite (DASSOPOULOS; EHRENPREIS, 1999). Pacientes com AIDS podem também apresentar sintomas como bronquite, tosse e secreções, dispnéia e dor torácica, devido a colonização do trato respiratório pelo *Cryptosporidium* (PALMIERI et al., 2005; CHALMERS; DAVIES, 2010). A isosporíase também pode apresentar disseminação extraintestinal, acometendo linfonodos mesentéricos, baço e fígado (MICHIELIS et al., 1994; FRENKEL et al., 2003; PEREIRA et al., 2009). Embora a disseminação extraintestinal desses coccídeos em pacientes imunossuprimidos seja mais comumente relatada na literatura, este evento também pode acontecer em indivíduos imunocompetentes, principalmente em crianças. Mor et al. (2010) avaliou escarro de 48 crianças da Uganda e 17 (35,4%) delas apresentaram resultado positivo para criptosporidiose

respiratória, 10 (58,8%) dessas crianças eram saudáveis, não estavam desnutridas ou infectadas por HIV.

Outro grupo de risco importante para a criptosporidiose é representado por crianças menores de cinco anos de idade. Em países em desenvolvimento, a criptosporidiose tem sido associada a um ciclo crônico de diarreia, desnutrição, prejuízo no desenvolvimento físico e diminuição cognitiva em crianças. Em um estudo com crianças com diarreia da Uganda, a infecção por *Cryptosporidium* foi associada com crescimento reduzido e desnutrição (TUMWINE et al., 2003). Outro estudo realizado com crianças de área urbana pobre do Nordeste do Brasil mostrou associação entre aptidão física e função cognitiva reduzidas das crianças com a infecção por *Cryptosporidium* (GUERRANT et al., 1999; BUSHEN et al., 2007).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A principal via de transmissão da infecção por *Cryptosporidium* e *Isospora belli* é a fecal-oral. O homem pode adquirir indiretamente a infecção por ingestão de oocistos esporulados através de água e alimentos contaminados, ou diretamente, por contato com pessoa ou animal infectado (COLLINET-ADLER; WARD, 2010; MURO et al., 2010). Como o ser humano é a única fonte reconhecida de *I. belli*, a transmissão zoonótica desse coccídeo não tem importância epidemiológica (PEREIRA et al., 2009). Por outro lado, protozoários do gênero *Cryptosporidium* infectam o homem, animais de criação, de estimação e silvestres, e estes podem ser prováveis fontes de contaminação de oocistos no meio ambiente. Dessa forma, a transmissão zoonótica desse protozoário tem grande importância epidemiológica e na saúde pública (XIAO; FENG, 2008).

A contaminação da água com oocistos esporulados é um importante fator na prevalência da criptosporidiose e isosporíase (MARSHALL et al., 1997). Entretanto, relatos sobre a transmissão hídrica de *Cryptosporidium* são muito mais comuns do que para *I. belli*. A resistência do *Cryptosporidium* a processos usuais de desinfecção da água, como o tratamento pelo cloro, a persistência da viabilidade dos oocistos no ambiente por vários dias e capacidade de infectar diferentes tipos de mamíferos, como bezerros e animais domésticos, favorecem a contaminação da água (MARSHALL et al., 1997; AGNAMEY et al., 2010a; MURO et al., 2010; SMITH; NICHOLS, 2010).

A contaminação da água potável na transmissão da criptosporidiose é responsável por vários surtos, especialmente em países desenvolvidos (YODER et al., 2008; CHALMERS et al., 2009). De acordo com Baldursson e Karanis (2011), cerca de 200 surtos veiculados por água e causados por protozoários foram relatados durante o período de 2004 a 2010 e, mais de 90% desses surtos ocorreram na Austrália, América do Norte e Europa. *Cryptosporidium* foi o agente etiológico em 60,3% desses surtos. Em 1993, mais de 400.000 residentes de Milwaukee, nos EUA, desenvolveram diarreia associada a consumo de água potável contaminada com oocistos de *Cryptosporidium* (MAC KENZIE et al., 1994). Desde 1988, os EUA incluiu a pesquisa de *Cryptosporidium* na lista de prioridade de água potável (HACHICH, 2002). Há também relatos de surtos de criptosporidiose veiculados por água recreacional, como piscinas e lagos (MATHIEU et al., 2004; INSULANDER et al., 2005; CHALMERS et al., 2009). No Brasil há poucos relatos de surtos por *Cryptosporidium*, e todos eles são em creches infantis de São Paulo (CARVALHO; CARVALHO; MASCARINI, 2006; GONÇALVES et al., 2006). Embora as fontes desses surtos ainda não tenham sido identificadas, a contaminação ambiental é observada em rios e reservatórios de água pública em diferentes regiões de São Paulo (FRANCO; ROCHA-EBERHARDT; CANSTUSIO NETO, 2001; HACHICH et al., 2004; ARAÚJO et al., 2011; SATO et al., 2013). No Brasil, desde 2000, o Ministério da Saúde recomenda a inclusão da pesquisa de *Cryptosporidium* em água potável (BRASIL, 2000).

Existem relatos de surtos de criptosporidiose veiculados a ingestão de alimentos, (PÔNKA et al., 2009; GORMLEY et al., 2011). Alguns têm sido associados à cidra de maçã preparada da fruta inapropriadamente higienizada (BLACKBURN et al., 2006). Um surto envolvendo 88 pessoas em Washington, EUA, foi relacionado a alimento contaminado com *Cryptosporidium* por manipulador infectado (QUIROZ et al., 2000). No Brasil, oocistos de *Cryptosporidium* têm sido identificados em hortaliças destinadas ao consumo humano (SILVA; ANDRADE; STAMFORD, 2005; MONTOVANI; ARAUJO; KANAMURA, 2010), a exemplo da alface e rúcula (TAKAYANAGUI et al., 2001).

Os parasitos *Cryptosporidium* e *I. belli* têm ampla distribuição geográfica. Ocorrem em países desenvolvidos e em desenvolvimento de todos os continentes, embora *I. belli* seja mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais (LINDSAY; DUBEY; BLAGBURN, 1997; MURO et al., 2010). As taxas de infecção variam de acordo com as condições socioeconômicas, características imunológicas e a idade do hospedeiro. A infecção por *I. belli*, que é menos comum que a infecção por *Cryptosporidium*, raramente é relatada em indivíduos imunocompetentes, mas é relativamente frequente em pacientes com HIV/AIDS. Em

Bangladesh a taxa de infecção por *Cryptosporidium* e *I. belli* em pacientes com HIV/AIDS foi de 47,14% (33/70 pacientes) e 28,6% (20/70) e em indivíduos HIV negativos foi de 5,71% (4/70) e 2,8% (2/70), respectivamente (NOOR et al., 2012). Nos EUA, as taxas de infecção por *I. belli* em pacientes com AIDS variam de 0,2-3% (PETERS et al., 1986; PEREIRA et al., 2009), já em alguns países da África variam de 3-20% (PEREIRA et al., 2009).

De acordo com revisão de Collinet-Adler e Ward (2010), as taxas de infecção por *Cryptosporidium* variam de 0,26-22% (média de 2,2%) em imunocompetentes e 6-70% (média de 14%) em imunocomprometidos em países desenvolvidos, e de 1,4-40,9% (média de 6,1%) em imunocompetentes e 8,7-48% (média de 24%) em imunocomprometidos em países em desenvolvimento. Além disso, cerca de 7,5% dos indivíduos infectados pelo protozoário apresentam-se sem diarreia.

No Brasil, a prevalência de infecção por *I. belli* varia de 1 a 32,3% em pacientes com HIV/AIDS (PEREIRA et al., 2009). Em estudo em Belém do Pará, a frequência de *I. belli* foi de 32,3% em pacientes HIV positivos com diarreia persistente (LAINSON; SILVA, 1999). Este estudo ressalta a importância da pesquisa deste coccídeo em casos de diarreia persistente, especialmente em pacientes com AIDS. Em Minas Gerais, Oliveira-Silva et al. (2007) analisaram amostras fecais de 638 amostras de fezes de pacientes com HIV/AIDS no período de Julho/1993 a Junho/2003, e encontrou uma frequência de *I. belli* de 15,5% e 7,8% em pacientes com e sem diarreia, respectivamente. Na região Nordeste do Brasil, Rocha e Santos (2002) analisaram 422 amostras de pacientes com HIV/AIDS internados na cidade de Natal, com diarreia crônica, e encontraram oocistos de *I. belli* em 13,3% dos pacientes.

Estudo realizado em São José do Rio Preto, São Paulo, no período de Janeiro/1998 a Dezembro/2008, amostras fecais de 1100 pacientes portadores de HIV foram analisadas para pesquisa de coccídeos intestinais, *Cryptosporidium* e *I. belli* foram encontrados em 0,3% e 4,2% dos pacientes, respectivamente (CARDOSO et al., 2011), refletindo a redução na prevalência de parasitos intestinais oportunistas com o advento da terapia antirretroviral. Isto também foi observado em outros estudos (BACHUR et al., 2008; BRADY et al., 2010).

A criptosporidiose é um problema de saúde pública tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. Geralmente nos países em desenvolvimento a infecção é endêmica, já nos países desenvolvidos ocorrem em surtos, ou casos esporádicos, porém em número substancial (PUTIGNANI; MENICHELLA, 2010). O Centro de Vigilância de Doenças de Notificação do Wales, Inglaterra relatou um total de 18.235 casos de infecções por *Cryptosporidium* na região no período de 2000 a 2003 (CHALMERS et al., 2009). Na França 407 casos de criptosporidiose foram notificados de janeiro/2006 a dezembro/2009

(The ANOFEL *Cryptosporidium* National Network, 2010). Dados de vigilância dos EUA revelam que, em 2009, 7.656 casos de criptosporidiose foram relatados (2,5 por 100.000 habitantes), já em 2010 houve um aumento para 8.951 casos (2,9 por 100.000 habitantes) (YODER et al., 2012).

Em várias regiões do mundo têm se observado um pico de incidência de criptosporidiose em crianças imunocompetentes, particularmente na faixa etária de 0-5 anos. Na Inglaterra e Gales, de 7.381 casos de criptosporidiose relatados entre os anos de 2000 e 2003, 52,3% (3.863) eram em crianças com idade de 0-9 anos (CHALMERS et al., 2009). Estudos no Brasil também demonstraram maior prevalência de *Cryptosporidium* nessa faixa etária (NASCIMENTO et al., 2009; MEDEIROS et al., 2001). Esse coccídeo é um importante agente etiológico de diarreia infantil no Brasil, com frequências variando de 2-10% em crianças com quadro diarreico (CARVALHO-COSTA et al., 2007; MEDEIROS et al., 2001). Além disso, alguns estudos demonstram que as creches são ambientes propícios a infecção por *Cryptosporidium* na infância (CARVALHO; CARVALHO; MASCARINI, 2006; NASCIMENTO et al., 2009).

Outros grupos de imunocomprometidos, além dos portadores de HIV, são susceptíveis a infecção por *Cryptosporidium* e *I. belli*, como pacientes em quimioterapia para o câncer, pacientes transplantados, desnutridos e pacientes com alguma imunodeficiência primária (PEREIRA et al., 2009; MURO et al., 2010). Além disso, publicações têm destacado esses patógenos como responsáveis pela diarreia dos viajantes (GOODGAME, 2003; AGNAMEY et al., 2010b).

2.5 TRATAMENTO

O tratamento da criptosporidiose e isosporíase é bastante complicado e muitas vezes a doença reincide. Os agentes antiprotozoários usuais, como metronidazol e secnidazol, não são eficazes para tratar essas coccidioses. Além disso, a conduta terapêutica depende do estado imune do hospedeiro (COLLINET-ADLER; WARD, 2010).

Em indivíduos imunocompetentes essas coccidioses são autolimitadas e os sinais e sintomas diminuem espontaneamente em menos de duas semanas. Nesses pacientes a conduta mais importante é a manutenção hidroeletrólítica e uso de agentes antidiarreicos (MURO et al., 2010; LEITCH; HE, 2012). Entretanto, inúmeros estudos têm demonstrado a eficácia de alguns fármacos no tratamento dessas enfermidades.

A isosporíase é tratada com cotrimoxazol, nas dosagens de: 160mg de Trimetoprim + 800mg de Sulfametaxazol em adultos, e 5mg/Kg de Trimetoprim + 25mg/Kg de Sulfametaxazol em crianças, a cada 12 horas por 7-10 dias (ESCOBEDO et al., 2009; MURO et al., 2010). Em pacientes imunossuprimidos, a dose e a duração do tratamento pode ser aumentada (MURO et al., 2010). Pirimetamina e nitazoxanida também têm mostrado efeitos benéficos no tratamento da isosporíase (CABELLO et al., 1997; PÉREZ-MOLINA et al., 2010)

A nitazoxanida é um composto tiazol com amplo espectro de ação contra helmintos e protozoários, inclusive *Cryptosporidium* e *Isospora belli*. É a única droga aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para tratamento da criptosporidiose. Vários estudos apoiam o uso deste fármaco no tratamento da infecção por *Cryptosporidium* entre indivíduos HIV negativos, principalmente em crianças, nas quais a doença pode ser severa. Ensaios clínicos, duplo-cegos e randomizados conduzidos em indivíduos imunocompetentes HIV negativos com criptosporidiose mostram que os grupos tratados com nitazoxanida por 3 dias obtiveram cura clínica e parasitológica da infecção por *Cryptosporidium* significativamente maior que o grupo placebo (ROSSIGNOL et al., 2001; AMADI et al., 2002; ROSSIGNOL et al., 2006).

Por outro lado, a eficácia da nitazoxanida no tratamento da criptosporidiose em pacientes HIV/AIDS ainda é questionável, e os estudos apresentam resultados conflitantes (ROSSIGNOL et al., 1998; ROSSIGNOL, 2006; AMADI et al., 2009; CABADA; WHITE JUNIOR, 2010). De acordo a uma meta-análise publicada em 2007 (ABUBAKAR et al., 2007) não há evidência para apoiar agentes quimioterápicos para tratamento da criptosporidiose em pacientes imunocomprometidos. Nos pacientes com HIV/AIDS o mais importante no combate da criptosporidiose é a restauração do sistema imune com o uso da terapia antirretroviral altamente ativa. Os inibidores de protease (IP), como ritonavir, indinavir e saquinavir, por exemplo, podem ser capazes de erradicar *Cryptosporidium* levando a cura clínica e parasitológica, através da restauração do sistema imune (DEMARCHI et al., 2012). Além disso, os IP afetam diretamente o ciclo de vida do *Cryptosporidium* em modelos *in vitro* e *in vivo* (MELE et al., 2003).

Outros fármacos usados no tratamento da criptosporidiose são paramomicina, azitromicina e claritromicina. A paramomicina, um aminoglicosídeo não absorvível, que age reduzindo a síntese de proteínas do parasito através da ligação ao ribossomo, reduz a diarreia, mas não erradica a doença (CABADA; WHITE JUNIOR, 2010). A maioria dos estudos sugere o uso dessa droga em combinação com azitromicina ou com antirretrovirais em casos de pacientes HIV/AIDS (CHEN et al., 2002).

2.6 DIAGNÓSTICO

Os sintomas clínicos da criptosporidiose e isosporíase são inespecíficos, podendo confundir-se com outras causas de gastroenterites, como por exemplo, quadros infecciosos por *Giardia duodenalis*, *Cyclospora*, *Escherichia coli enteropatogênica*, entre outros (CHALMERS; DAVIES, 2010). Dessa forma, a identificação do agente etiológico torna-se fundamental para direcionar o tratamento e o acompanhamento médico do paciente.

Para o diagnóstico dessas coccidioses, métodos microscópicos, imunológicos e moleculares podem ser utilizados. Cada método apresenta uma finalidade, bem como vantagens e desvantagens.

2.6.1 Métodos microscópicos

O diagnóstico laboratorial da infecção por *Cryptosporidium* e/ou *Isospora belli* é realizado rotineiramente pela identificação microscópica de oocistos do parasito nas fezes, ou mesmo em outros materiais biológicos, como aspirado duodenal e biliar, e material de biopsia intestinal (CHEN et al., 2002; PEREIRA et al., 2009). As técnicas habituais utilizadas para pesquisa de “larvas, ovos e cistos” de parasitos podem ser usados para detecção e identificação dos oocistos de *I. belli*, uma vez que estes são relativamente grandes e visíveis ao microscópio óptico, com ou sem lugol (LINDSAY; DUBEY; BLAGBURN, 1997; NEIRA-OTERO et al., 2010). Entretanto, essas técnicas não são adequadas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, cerca de 5-6 vezes menor que *Isospora* e, tendo em vista a eliminação intermitente e às vezes de pequenas quantidades de oocistos, recomenda-se a combinação entre técnicas de concentração e coloração para o diagnóstico desses coccídeos (HUBER; BONFIM; GOMES, 2003; HUBER; BONFIM; GOMES, 2004; PEREIRA et al., 2009).

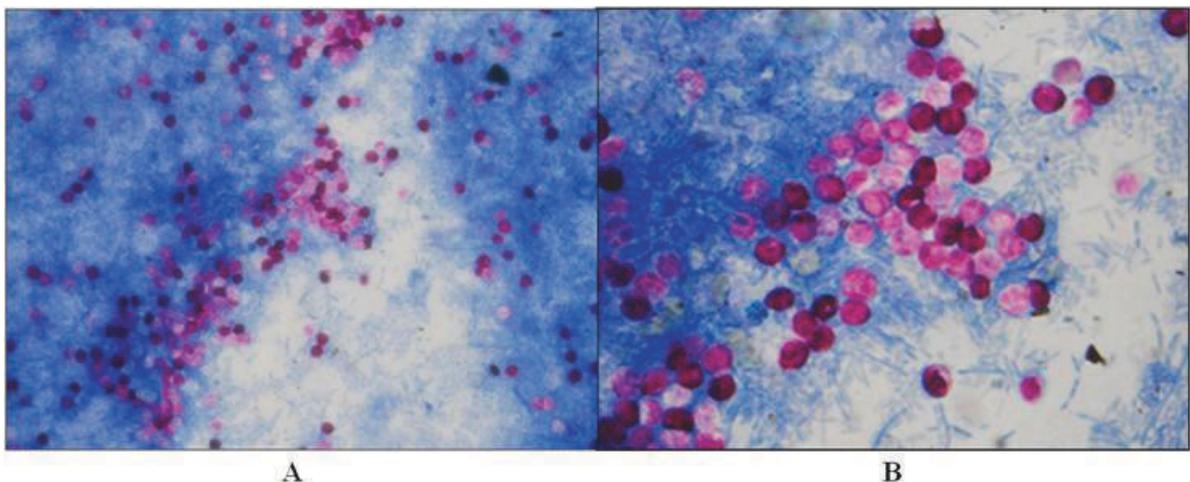
A pesquisa de oocistos em amostras fecais exige frequentemente técnicas de concentração através de flutuação, mediante utilização de soluções saturadas de açúcar, cloreto de sódio ou sulfato de zinco, ou pela sedimentação, geralmente utilizando-se a metodologia do formol-éter ou formol-acetato de etila. Esses métodos aumentam as chances de encontrar oocistos e cistos, principalmente em indivíduos assintomáticos (HUBER; BONFIM; GOMES, 2003; HUBER; BONFIM; GOMES, 2004).

Os métodos de coloração baseados na propriedade álcool-ácido resistência desses coccídeos, como as técnicas de coloração Ziehl-Neelsen e suas variantes são muito usados na rotina (Figura 2 e Figura 3). Outros métodos de coloração de coccídeos incluem Verde Malaquita, Giemsa, Auramina, Safranina, Nigrosin e Light Green (MA; SOAVE, 1983; BAXBY; BLUNDELL; HART, 1984; POHJOLA, 1984; CASEMORE, 1991; IGNATUS et al., 1997a; ELLIOT; MORGAN; THOMPSON, 1999). No entanto, essas técnicas não têm sensibilidade e especificidade devidamente conhecidas, o que dificulta uma padronização da rotina diagnóstica desses protozoários entre os diferentes laboratórios clínicos. Além disso, poucos laboratórios fazem o diagnóstico de *Cryptosporidium* e/ou *I. belli* no Brasil (SODRÉ; FRANCO, 2001).

Outro exame que pode ser usado na rotina é o histopatológico, usado em material de autópsia e biópsia. Neste exame podem-se observar os estágios do ciclo dos parasitos pela coloração hematoxilina-eosina (CHALMERS; DAVIES, 2010).

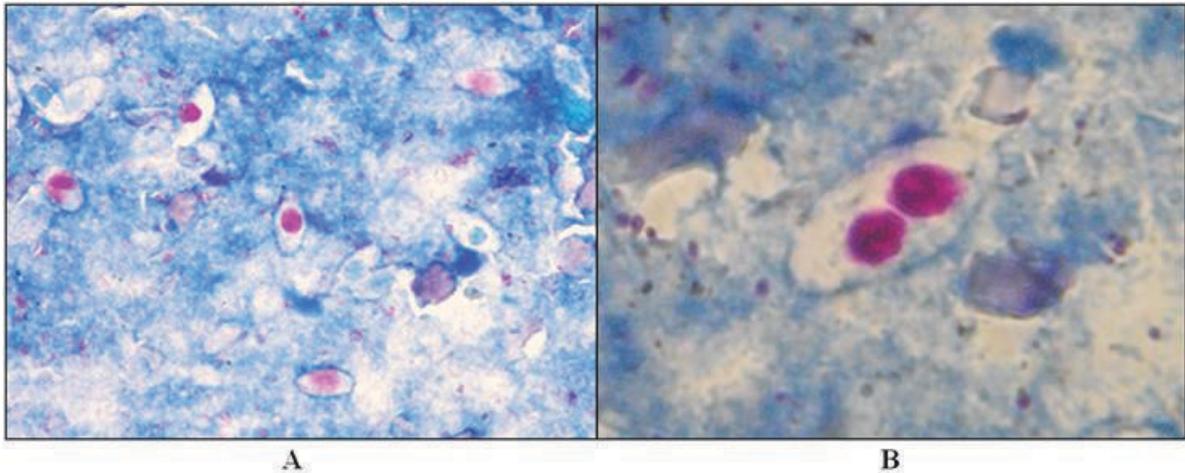
Embora tradicionalmente a detecção de *Cryptosporidium* e *I. belli* seja baseada no exame de fezes frescas ou preservadas em formalina, o diagnóstico parasitológico tem várias limitações: consome tempo, requer um microscopista experiente para identificar os organismos e pode apresentar sensibilidade limitada quando há poucos oocistos nas amostras fecais. Este método também não é útil para avaliar amostras submetidas a condições desfavoráveis, como amostras de fezes congeladas ou amostras ambientais, que podem modificar a morfologia do parasito (JEX et al., 2008). Além disso, os métodos microscópicos não permitem determinar as espécies ou genótipos envolvidos na infecção, fator que é importante principalmente no caso de infecções por *Cryptosporidium*.

Figura 2 – Esfregaços fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium*, corados por Ziehl-Neelsen modificado. Aumento de 400x (A) e 1000x (B).



Fonte: Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFBA.

Figura 3 – Esfregaços fecais contendo oocistos de *Isospora belli*, corados por Ziehl-Neelsen modificado, com um esporoblasto em aumento de 400x (A) e com dois esporoblastos em aumento de 1000x (B).



Fonte: Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFBA.

2.6.2 Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos utilizados incluem ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de antígenos ou anticorpos, imunofluorescência direta (IFD) e indireta (IFI) e testes imunocromatográficos rápidos, que apresentam algumas vantagens sobre a microscopia (IGNATIUS et al., 1997b; FAYER, MORGAN, UPTON, 2000; MAGI et al., 2006; JAYALAKSHMI; APPALARAJU; MAHADEVAN, 2008; COLLINET-ADLER; WARD, 2010; TEIXEIRA et al., 2011).

Os testes imunoenzimáticos têm alta sensibilidade e especificidade para o coprodiagnóstico de antígenos de *Cryptosporidium*, o que independe da detecção morfológica e identificação de oocistos, oferecendo uma alternativa diagnóstica em substituição aos métodos baseados em microscopia e, como detectam antígenos do parasito, um resultado positivo indica infecção recente (IGNATIUS et al., 1997b; JAYALAKSHMI; APPALARAJU; MAHADEVAN, 2008).

O método de IFD utiliza anticorpo monoclonal contra proteínas específicas da parede do oocisto do parasito, sendo considerado o padrão-ouro para diagnóstico de *Cryptosporidium*, e apresenta alta especificidade (96-100%) e sensibilidade (98,5%-100%) para detecção de oocistos em amostras clínicas e ambientais (JEX et al., 2008). Embora a IFD seja considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de infecção por *Cryptosporidium*, trata-se de um método muito caro e pouco usado na rotina diagnóstica.

Uma limitação no diagnóstico laboratorial do *Cryptosporidium*, seja através da microscopia ou da pesquisa de coproantígeno, é que não permite a diferenciação das espécies do gênero, visto que estas são morfológicamente indistinguíveis e que os anticorpos utilizados na pesquisa de antígenos nas fezes são direcionados contra proteínas gênero-específicas (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000).

Os métodos para detecção de anticorpos para *Cryptosporidium* e *I. belli*, como IFI e ELISA são simples, rápidos e específicos, porém geralmente apresentam baixa sensibilidade e problemas de dificuldade de diferenciar infecção recente e antiga, e ainda os testes sorológicos têm valor limitado quando se examina indivíduos em área endêmica com alta circulação de anticorpos. Por exemplo, em pesquisa sorológica em uma favela urbana em Fortaleza, Ceará, revelou mais de 90% de soropositividade para *Cryptosporidium* em crianças no seu primeiro ano de vida (NEWMAN et al., 1994).

2.6.3 Métodos moleculares

As técnicas de biologia molecular podem fornecer informações muito além das oferecidas pela microscopia ou métodos imunológicos. Esses métodos têm ampla aplicação na área da parasitologia, no estudo da sistemática e ecologia dos parasitos, em particular na taxonomia, evolução biológica, genética de populações, epidemiologia e interações com seus hospedeiros, melhorando nosso entendimento sobre a relação do parasito- hospedeiro (JEX et al., 2008; FAYER, 2010). Entre os diferentes métodos moleculares aplicados para detecção e caracterização de *Cryptosporidium* e/ou *I. belli* incluem: reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (Nested-PCR, PCR em tempo real, PCR-RFLP etc), análise de microssatélite e sequenciamento (GARCIA, 2010; SKOTARCZAK, 2010).

Esses coccídeos apresentam um amplo espectro de sinais e sintomas clínicos, dependentes da carga parasitária e do sistema imune do hospedeiro. Entretanto, fatores relacionados ao genótipo do parasito não podem ser desconsiderados. Estudos de caracterização molecular de *I. belli* e *Cryptosporidium* têm demonstrado a heterogeneidade genética entre os isolados clínicos destes coccídeos (CAMA et al., 2007; RESENDE et al., 2011). O polimorfismo genético observado abre novas perspectivas para identificação de possíveis genótipos de *I. belli* e *Cryptosporidium* que podem causar diferentes manifestações clínicas.

Os métodos moleculares, principalmente os baseados na PCR, são altamente sensíveis e específicos no diagnóstico desses coccídeos e têm sido amplamente utilizados na área de pesquisa, mas ainda não é uma realidade na rotina diagnóstica, uma vez que são métodos caros, necessitam de um aparato laboratorial moderno e de pessoal capacitado. Muller et al. (2000) desenvolveram uma técnica molecular para o diagnóstico de infecção por *I. belli*. Esses autores, através da PCR, descreveram pares de iniciadores e uma sonda de hibridização baseada em regiões variáveis da SSU rDNA, para detecção de *I. belli* em humanos. Enquanto a caracterização molecular de *I. belli* ainda é pouco realizada, mesmos nos grupos de pesquisa, a análise molecular por PCR de *Cryptosporidium* está em franco crescimento, e atualmente já é usada na rotina em laboratórios de referências em países desenvolvidos (CHALMERS et al., 2009), devido a grande ocorrência de surtos de criptosporidiose nessas regiões e a possibilidade de transmissão zoonótica deste parasito. As técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas para determinação e resolução de surtos causados por *Cryptosporidium*, permitindo a determinação das fontes de infecção e da dinâmica de transmissão e da relação parasito-hospedeiro (SKOTARCZAK, 2009; FAYER, 2010).

2.7 GENOTIPAGEM DE *Cryptosporidium*

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* estão presentes em mais de 150 espécies de animais vertebrados. Atualmente sabe-se que o gênero *Cryptosporidium* abrange no mínimo 20 espécies distintas que infectam diversos hospedeiros vertebrados. A maioria das espécies têm um hospedeiro dominante, mas podem ser acidentalmente encontradas em hospedeiros não usuais (SUNNOTEL et al., 2006; SNELLING et al., 2007; FAYER, 2010; PUTIGNANI; MENICHELIA, 2010; XIAO, 2010; LEITCH; HE, 2012) (Tabela 1). A vasta maioria dos casos humanos de criptosporidiose é principalmente causada por duas espécies, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis*. Mas outras espécies, como *Cryptosporidium felis* (PEDRAZA-DIAZ et al., 2001a; XIAO et al., 2001; CACCIÓ et al., 2002; CAMA et al., 2007), *Cryptosporidium meleagridis* (CAMA et al., 2007; ESSID et al., 2008), *Cryptosporidium canis* (CAMA et al., 2007), *Cryptosporidium suis* (CAMA et al., 2007; FAYER, 2010), *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium wrairi* (FAYER, 2010) e *Cryptosporidium andersoni* (FAYER 2010; ESSID et al., 2008) podem infectar humanos também, especialmente crianças menores de cinco anos e indivíduos imunocomprometidos

(PUTIGNANI; MENICHELIA, 2010). Recentemente, uma nova espécie de *Cryptosporidium*, *C. viatorum*, foi identificada em humanos, especialmente em viajantes (ELWIN et al., 2012).

Devido à habilidade de *Cryptosporidium* para infectar vários animais e a presença de oocistos no ambiente, seres humanos podem adquirir infecções através de diferentes rotas de transmissão, seja antroponótica ou zoonótica. A importância de cada uma dessas rotas de transmissão na epidemiologia da criptosporidiose não é muito clara, devido ao fato de que ferramentas de diagnóstico tradicionais não têm habilidade para diferenciar a fonte de contaminação pelo parasito (XIAO, 2010). Assim, ferramentas moleculares são essenciais para determinação das espécies/genótipos de *Cryptosporidium* presentes em nosso meio para um melhor entendimento da biologia, epidemiologia e importância clínica das várias espécies de *Cryptosporidium*. Essas técnicas têm sido essenciais nas investigações de surtos veiculados por água ou alimentos e em estudos de dinâmica de transmissão deste parasito (MATTSSON et al., 2008; KASPER et al., 2012; NG et al., 2012; CACCIÓ et al., 2013).

Tabela 1 – Espécies relatadas de *Cryptosporidium*, seus principais hospedeiros e localização.

Espécies de <i>Cryptosporidium</i>	Hospedeiro Principal	Localização
<i>C. andersoni</i> *	Bovinos	Abomaso
<i>C.baileyi</i>	Aves	Cloaca, trato respiratório
<i>C. canis</i> *	Canídeos	Intestino delgado
<i>C. felis</i> *	Felídeos	Intestino delgado
<i>C. galli</i>	Aves	Proventriculos
<i>C. hominis</i>	Humanos	Intestino delgado
<i>C. meleagridis</i> *	Aves	Intestino
<i>C. molnari</i>	Peixes	Estôgamo
<i>C. muris</i> *	Roedores	Estômago
<i>C. parvum</i>	Ruminantes e humanos	Intestino
<i>C. varanii</i>	Lagartos e cobras	Mucosa intestinal e cloacal
<i>C. serpentis</i>	Lagartos e cobras	Mucosa intestinal e cloacal
<i>C. suis</i> *	Porcos	Estômago
<i>C. wrairi</i>	Porcos	Intestino delgado
<i>C. bovis</i>	Ruminantes	Intestino delgado
<i>C. macropodum</i>	Canguru	Desconhecido
<i>C. scophthalmi</i>	Peixe	Intestino
<i>C. fayeri</i>	Canguru	Desconhecido
<i>C. viatorum</i>	Humanos (viajantes)	Intestino delgado
<i>C. ryanae</i>	Gado	Desconhecido

Adaptado de FAYER, 2010; XIAO, 2010 E ELWIN et al., 2012.

* Espécies já relatadas em humanos.

Numerosas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para diferenciação das espécies/genótipos de *Cryptosporidium*, a maioria baseadas na PCR dos genes codificadores de subunidade pequena do RNA ribossomal (18S rRNA ou SSU rRNA), proteína de parede de oocisto do *Cryptosporidium* (COWP), proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70), dihidrofolato redutase (DHFR), glicoproteína de 60kDa (GP60) e β -tubulina. A maioria dessas ferramentas é desenhada para detectar e diferenciar *C. hominis* e *C. parvum* em amostras clínicas, mas é importante que sejam capazes de diferenciar também outras espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* que podem ocasionalmente infectar o homem (SULAIMAN; XIAO; LAL, 1999). A técnica de nested-PCR-RFLP dos genes COWP (SPANO et al., 1997a; PEDRAZA-DIAZ et al., 2001b) e 18S rRNA (XIAO et al., 1999a; 2001), com o auxílio das enzimas de restrição *RsaI*, *SspI* e *VspI* permite diferenciar as principais espécies que infectam o homem (SULAIMAN; XIAO; LAL, 1999). A análise genética de vários loci por PCR ou sequenciamento é uma ferramenta muito utilizada para genotipar isolados de *Cryptosporidium* de diferentes áreas geográficas. Em muitos casos, utiliza-se apenas um único locus para discriminação das espécies/genótipos de *Cryptosporidium*, entretanto, é recomendado que mais de um locus seja caracterizado, uma vez que os genes utilizados como marcadores podem sofrer mutações, o que pode produzir resultados aleatórios e ambíguos (XIAO et al., 2004; SILVA, 2004).

O gene codificante da subunidade menor ribossomal de *Cryptosporidium* foi primeiro descrito por Le Blancq et al. (1997), permitindo que diversos estudos fossem realizados a partir deste momento. Há cinco cópias deste gene do genoma deste coccídeo e estão dispersos em três cromossomos. Este locus é amplamente utilizado na caracterização molecular de *Cryptosporidium* (XIAO et al., 1999a; 2001; STURBAUM et al., 2001; WARD et al., 2002).

O gene codificador da proteína de parede do oocisto (COWP) foi clonado e descrito por Spano et al. (1997b). Este gene consiste de uma sequência aberta de leitura de 4866 nucleotídeos, e codifica um polipeptídeo de 1622 aminoácidos. A proteína codificada por este gene é rica em cisteína, que confere rigidez a parede do oocisto através de pontes dissulfeto. Este gene se apresenta com uma única cópia no genoma (SILVA, 2004). Muitos grupos de pesquisa estudam esse gene para análise de polimorfismo de isolados de *Cryptosporidium* (SPANO et al., 1997a; PEDRAZA-DIAZ et al., 2001b; LEONE et al., 2009).

A Nested-PCR é um método sensível e específico no qual há duas reações de amplificação acopladas. O produto da primeira PCR (amplicon) é submetido a um segundo processo de amplificação, utilizando outro conjunto de iniciadores homólogos a uma

sequencia interna ao segmento inicialmente amplificado. Esse método é mais sensível e específico do que a realização de apenas uma reação de PCR (SKOTARCZAK, 2010).

A técnica de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição ou RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) é um dos métodos mais utilizados para a determinação de espécies de *Cryptosporidium*. Seu princípio é a digestão com enzimas de restrição dos produtos da PCR ou Nested-PCR. Estas enzimas são endonucleases que clivam o DNA em sítios específicos resultando em fragmentos de vários tamanhos que, quando analisados em gel de agarose ou policrilamida, resulta em diferentes padrões de bandas que possibilitam a diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* (GRECA, 2010). A análise de RFLP dos genes 18S rRNA com enzimas *SspI* e *VspI* e COWP com *RsaI*, permite a diferenciação da maioria das espécies de *Cryptosporidium* já isoladas em humanos (Tabela 2).

No Brasil existem poucos estudos sobre genotipagem de *Cryptosporidium*. Em Fortaleza (Ceará) de 42 isolados de *Cryptosporidium* em crianças de uma favela urbana, 24 (57,1%) foram caracterizados como *C. hominis* e 18 (42,9%) como *C. parvum* (BUSHEN et al., 2007). Em estudo realizado com pacientes portadores de HIV em São Paulo, de 27 isolados, 17 (63%) foram caracterizados como *C. hominis*, 4 (14,8%) *C. parvum*, 5 (18,5%) *C. felis* e um (3,7%) *C. canis* (LUCCA et al., 2009). Na Bahia, onde este estudo foi desenvolvido, até então eram desconhecidas as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* que circulam nessa área.

Tabela 2 – Fragmentos gerados dos genes COWP e 18S rRNA amplificados por PCR, após digestão com enzimas de restrição.

Espécie	Gene COWP (~553pb)	Gene 18S rRNA (~825pb)	
	<i>RsaI</i> ¹	<i>SspI</i> ²	<i>VspI</i> ²
<i>C. hominis</i>	284, 129, 106 and 34pb	448, 247 e 106, 11, 12pb	561, 116, 104, 70pb
<i>C. parvum</i>	413, 106 and 34pb	448, 247 e 106, 11, 12pb	628, 116, 104pb
<i>C. meleagridis</i>	372, 147 and 34pb	448, 247, 106, 11, 11pb	456, 171, 104, 102pb
<i>C. canis</i>	-	417, 254, 105, 33, 20pb	633,102, 94pb
<i>C. suis</i>	-	453, 365, 11, 9pb	632, 104, 102pb
<i>C. muris</i>	-	385,448pb	731, 102pb
<i>C. felis</i>	-	426, 390, 33, 15pb	476, 182, 104, 102pb

1 Pedraza-Diaz et al. (2001b); ² Xiao et al. (1999b, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes metodologias de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e *Isospora belli* em amostras fecais e caracterizar genotipicamente isolados de *Cryptosporidium*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar quantitativa e qualitativamente as técnicas de concentração de formol-acetato de etila e sedimentação por centrifugação, bem como as técnicas de coloração de Ziehl-Neelsen modificado, auramina e safranina para o diagnóstico parasitológico de *Cryptosporidium* e *Isospora belli*.
- Avaliar a perda de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* no anel de detritos gordurosos, formado durante a concentração de fezes pela técnica de formol-acetato de etila.
- Comparar o método parasitológico por microscopia para detecção de *Cryptosporidium* com a pesquisa de coproantígeno através de ensaio imunoenzimático (ELISA) e avaliar os resultados discordantes utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- Caracterizar as espécies de *Cryptosporidium* de amostras fecais humanas, através da PCR, seguida da avaliação do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A realização deste estudo abrangeu dois momentos distintos. Inicialmente, foi realizada a avaliação de diferentes técnicas parasitológicas para a identificação de *Cryptosporidium* e *Isospora belli* em amostras fecais, com objetivo de determinar qual o melhor método parasitológico para o diagnóstico simultâneo desses coccídeos intestinais. O método parasitológico considerado mais eficiente foi comparado com a pesquisa de antígenos nas fezes através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Posteriormente, foi realizada a genotipagem por PCR-RLFP de isolados de *Cryptosporidium* de amostras fecais humanas, para determinar as espécies de *Cryptosporidium* predominantes em nosso meio. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB) (ANEXO A).

4.1 COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* E *Isospora belli* EM AMOSTRAS FECAIS

4.1.1 Amostras fecais

Para o estudo comparativo entre os diferentes métodos de detecção de oocistos, 27 amostras fecais positivas para *Cryptosporidium* e 15 amostras positivas para *I. belli*, conservadas em formalina a 10% foram utilizadas em todas as análises. As amostras positivas usadas nessa fase do estudo foram obtidas do Setor de Parasitologia do Laboratório Central de Saúde Pública da Bahia (LACEN-BA), durante rotina laboratorial de pesquisa desses coccídeos em amostras fecais de pacientes com AIDS ou de crianças com diarreia. Não houve acesso a qualquer outra informação sobre os pacientes.

4.1.2 Métodos parasitológicos avaliados

Cinco diferentes métodos utilizados no diagnóstico de *Cryptosporidium sp* e *I. belli* foram testados. Inicialmente, as amostras foram submetidas a duas técnicas de concentração de oocistos: sedimentação por centrifugação (SC) e formol-acetato de etila (FE). Para cada

amostra foram feitos três esfregaços fecais, um para a SC e dois para FE (um da porção do anel de detritos gordurosos e o outro do sedimento fecal), e depois corados pelo método de Ziehl-Neelsen modificado (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981). Em uma segunda etapa, foi realizada a comparação entre técnicas de coloração de oocistos, utilizando 26 amostras positivas para *Cryptosporidium* e 15 amostras positivas para *I. belli*. As amostras foram concentradas inicialmente pelo método de SC, e foram confeccionados três esfregaços fecais para cada amostra e cada um deles foi submetido às técnicas de coloração de Ziehl-Neelsen modificado (ZN) (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), Safranina (SF) (BAXBY; BLUNDELL; HART, 1984) e Auramina (AR) (WIN et al., 2008). Para tornar as metodologias comparáveis, utilizou-se um volume fixo de cinco mililitros de amostra fecal preservadas em formalina, e os esfregaços foram confeccionados com 25µL de amostra, espalhados em uma área de 2,5 x 1,5cm na lâmina de vidro. Na Tabela 3 segue a descrição das técnicas utilizadas na comparação.

Tabela 3 – Descrição dos procedimentos das técnicas comparadas neste estudo.

Técnica	Procedimento
<i>Sedimentação por centrifugação (SC)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 5 mL de amostra de fezes filtrada e diluída em formalina 10% em tubo Falcon - Centrifugar a 400 x g por 2 minutos - Desprezar sobrenadante - Confeccionar o esfregaço fecal usando 25µL do sedimento.
<i>Formol-acetato de etila (FE)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 5 mL de amostra de fezes filtrada e diluída em formalina 10% em tubo Falcon - 2,5mL de acetato de etila - Homogeneizar - Centrifugar a 400 x g por 2 minutos -Aspirar 25µl do sedimento do anel de detritos gordurosos para confecção de esfregaço - Desprezar todo o sobrenadante - Confeccionar o esfregaço fecal usando 25µL do sedimento.
<i>Ziehl-Neelsen modificado (ZN)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fixar esfregaços fecais com metanol - Cobrir esfregaço com papel filtro - Adicionar carbofucsina, corar por 15 min - Retirar o papel, - Enxaguar o esfregaço com álcool a 50% para retirar o excesso de corante e água corrente - Descorar com álcool-ácido sulfúrico por 2 min - Lavar em água corrente - Contracorar o esfregaço com azul de Loeffler por 3 min - Lavar em água corrente - Secar ao ar - Leitura em microscópio óptico (Olympus CX31RTSF) na objetiva de 400x.

<i>Auramina (AR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fixar esfregaços fecais com metanol - Adicionar o corante Auramina O sobre o esfregaço, deixar corar por 15 min - Lavar com água corrente - Descorar com álcool-ácido clorídrico por 2 min - Lavar em água corrente - Contracorar o esfregaço com permanganato de potássio por 3 min - Lavar em água corrente - Secar no escuro - Leitura no período máximo de 2 horas após coloração, em microscópico de fluorescência (Olympus BX41) na objetiva de 400x.
<i>Safranina (SF)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fixar esfregaços fecais com metanol - Adicionar o corante Safranina sobre o esfregaço - Aquecer o corante na chama até início da fervura - Lavar com água corrente - Contracorar o esfregaço com azul de Löffler por 3 min - Lavar em água corrente - Secar ao ar - Leitura em microscópico óptico (Olympus CX31) na objetiva de 400x.

4.1.3 Análise comparativa entre os métodos parasitológicos

Para a análise comparativa entre os métodos de concentração e de coloração de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* avaliados, foram examinados 20 campos microscópicos com aumento de 400x. Os esfregaços fecais foram examinados por dois microscopistas diferentes, sem conhecimento prévio das amostras. Em casos de discordância igual ou superior a 10% no número de oocistos detectados, um terceiro analista fazia a releitura dos esfregaços. O poder de detecção dos métodos foi avaliado pela quantidade total de oocistos visualizados em 20 campos microscópicos, e a qualidade pela presença de impurezas, nível de impregnação do corante pelos oocistos e o contraste com a coloração de fundo dos esfregaços fecais. Os esfregaços fecais com mais de 50% dos campos avaliados apresentando dificuldades na identificação microscópicas dos parasitos (presença de oocistos descorados, de artefatos confundentes e/ou contracoloração inadequada, com pouco contraste em relação a cor dos oocistos), receberam a classificação INFERIOR; entre 25-50%, REGULAR; e abaixo de 25% dos campos avaliados, foram considerados de qualidade microscópica SUPERIOR.

Para apresentação dos dados da análise qualitativa, foi calculado o percentual de esfregaços fecais classificados nas diferentes categorias, de acordo com o método utilizado. Nesse estudo foi definido como método ideal ou superior aquele que diferenciava bem os

oocistos da coloração de fundo do esfregaço, e de partículas (leveduras, precipitados de corante e detritos alimentares) com tamanhos e formas semelhantes aos oocistos, dificultando a visualização ou se confundindo com estes, durante a leitura pelo microscopista. Foi analisada também a perda de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* no anel de detritos gordurosos, produzido normalmente na técnica de concentração FE, e se essa perda era significativa de forma a influenciar no desempenho do método.

4.1.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5.0. O teste de normalidade d'Agostino-Pearson foi usado para designar qual o teste estatístico mais apropriado para cada situação. Uma vez que o número de oocistos detectados em 20 campos microscópicos não seguiu a distribuição normal, esta variável foi expressa como mediana, valores máximo e mínimo de oocistos. O teste não paramétrico pareado Wilcoxon foi usado para comparar o número de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* detectados nas mesmas amostras por SC e FE. O teste não paramétrico ANOVA de Friedman foi usado para comparar o número de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* obtidos pelos três métodos de coloração. Adotou-se o nível de significância estatística de 5% para todos os testes.

4.2 COMPARAÇÃO ENTRE O ZIEHL NEELSEN MODIFICADO E A PESQUISA DE COPROANTÍGENO POR ELISA NO DIAGNÓSTICO DA CRIPTOSPORIDIOSE E GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE *Cryptosporidium* DETECTADOS

4.2.1 Origem das amostras

Para esta fase do trabalho, foram utilizadas amostras de fezes provenientes de outro estudo em andamento sobre infecções parasitárias em crianças. Amostras fecais foram coletadas de 626 crianças. Os seguintes grupos foram examinados: 258 crianças de creche de Salvador; 171 crianças com diarreia e 88 com desnutrição internadas na Unidade Metabólica do Centro Pediátrico Prof. Hosanah de Oliveira, Universidade Federal da Bahia (CPPHO-UFBA); 79 crianças com câncer e 30 crianças portadoras de HIV. Os responsáveis pelas

crianças foram informados da natureza do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

4.2.2 Comparação entre o método parasitológico e a pesquisa de coproantígeno por ELISA para identificação de *Cryptosporidium* em amostras fecais

Amostras fecais dos diferentes grupos descritos acima foram concentradas através da sedimentação por centrifugação (SC), coradas pelo Ziehl Neelsen modificado (ZN) (HENRIKSEN, POHLENZ, 1981) e examinadas por microscopia óptica em aumento de 400x, como descrito no item 4.1.2.

No momento do processamento das amostras, alíquotas das fezes brutas foram armazenadas em microtubos a -20°C para posterior realização de pesquisa de coproantígeno de *Cryptosporidium* através de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Wampole *Cryptosporidium* II, TECHLAB, Blacksburg, VA, USA), que utiliza anticorpos monoclonal e policlonal para a detecção de antígeno de *Cryptosporidium*. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, uma quantidade de, aproximadamente, 100mg ou 100µL de fezes foi diluída em 400µL solução tampão diluente. 50µL das amostras fecais diluídas foram adicionadas nos poços da placa de ELISA contendo 100µL do tampão diluente, e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após a primeira incubação, os poços foram lavados cinco vezes com solução tampão de lavagem (fosfato tamponado, detergente e timerosal 0,2%), e 50µL do conjugado, contendo anticorpo policlonal contra o antígeno de oocisto de *Cryptosporidium* e marcado com peroxidase, foi distribuído nos poços. Após segunda incubação por 30 minutos, os poços foram lavados como acima e 100µL do substrato cromógeno (tetrametilbenzidina e peróxido) foram colocados no poço, seguido da incubação das placas por 10 minutos. A reação foi parada com 50µL de solução de ácido sulfúrico 0,6N. O valor da densidade óptica (DO) foi determinado usando espectrofotômetro (Awareness Technology Inc, USA), zerando contra o ar a 620nm e lido a 450nm. O “cut-off” fornecido pelo fabricante foi de 0,090. Para amostra com DO superior ao cut-off, esta foi considerada positiva. Ao contrário, para amostra com DO inferior ao cut-off, esta foi considerada negativa. Todas as amostras com até duas vezes o valor do cut-off (DO = 0,180), tiveram os ensaios repetidos três vezes.

A sensibilidade e especificidade do ELISA foram calculadas considerando o método microscópico como o padrão-ouro. Nos casos de discordâncias entre o método microscópico e a pesquisa de coproantígeno, a análise da amostra foi repetida, por ambos os métodos.

4.2.3 Extração de DNA dos isolados de *Cryptosporidium*

Todas as amostras positivas para *Cryptosporidium* obtidas no estudo, juntamente com outras amostras positivas disponíveis no laboratório (cinco isolados de crianças do interior da Bahia, dois de crianças de creche de Salvador e dois de adultos portadores de HIV), dando um total de 25 amostras, foram submetidas à extração de DNA, amplificação por nested-PCR e análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) para determinação das espécies de *Cryptosporidium*.

Amostras fecais congeladas, positivas para *Cryptosporidium*, foram submetidas à extração de DNA utilizando o QIAamp DNA mini KIT (QIAGEN, Valencia, CA), de acordo com a recomendação do fabricante. Resumidamente, a aproximadamente 200 mg de fezes foram adicionados 1,4 mL de tampão de lise (ASL), em cada amostra e homogeneizado com vórtex. A suspensão foi aquecida a 70°C por 5 minutos e centrifugada a 25200 x g por 1 minuto para sedimentar as partículas fecais. Cerca de 1,2 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo um comprimido de InhibitEx, que tem a função de adsorver inibidores da PCR presentes nas fezes. Após homogeneização em vórtex, a suspensão foi centrifugada a 25200 x g por 3 minutos para sedimentar os inibidores que se ligaram a matriz do InhibitEx. Posteriormente, 200 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo contendo proteinase K para degradação das proteínas ligadas ao DNA, e incubado a 70°C por 10 minutos. Após incubação, foram adicionados 200 µL de etanol ao lisado, o qual foi transferido para a coluna QIAamp e centrifugado a 25200 x g por 1 minuto. A coluna foi lavada para retirada de impurezas usando o tampão AW1 e centrifugação a 25200 x g por 1 minuto, seguido por AW2 e centrifugação a 25200 x g por 3 minutos. Por fim, o DNA purificado foi eluído da coluna com 100 µL de tampão de eluição, sob centrifugação a 25200 x g por 1 minuto. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até realização da PCR.

4.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A manipulação das reações foi realizada em fluxo laminar de uso específico para PCR, previamente esterilizado com solução de etanol a 70% e irradiado com luz ultravioleta (UV) por 20 minutos. O DNA foi aplicado nos tubos de reação em área separada e em bancada limpa. Todos os materiais usados para PCR eram novos, livres de DNase e RNase e previamente autoclavados.

Durante as reações de PCR foram utilizados controles positivo e negativo. Os DNAs utilizados como controles positivos foram provenientes de oocistos isolados de criança com diarreia ou de criança do interior da Bahia, analisados por PCR em Tempo Real em colaboração com Dr. Alexandre Bello, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, e classificados como *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum*, respectivamente. O controle negativo consistiu de todos os reagentes do PCR, exceto o DNA.

a. Amplificação do gene COWP

A amplificação do gene COWP foi realizada como descrito por Spano et al. (1997a) e Pedraza-Diaz et al. (2001b), com algumas modificações. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 50µl. Para a PCR primária foram utilizados: 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,1µM dos oligonucleotídeos (primers) BCOWP-F (5'-ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCCCTC-3') e BCOWP-R (5'-CGCACCTGTTCCCCACTCAATGTAAACCC-3') (Invitrogen), 5 a 10µL de DNA genômico, 2,5U de Taq DNA polimerase (Platinum; Invitrogen) e água para PCR livre de DNase e RNase (qsp 50µL). Os tubos contendo a mistura reacional foram levados ao termociclador (MyCycler thermal cycler, BioRad) e submetidos a uma partida de 98°C por 2 minutos, e posteriormente a 30 ciclos termais de desnaturação (94°C/ 1 min), hibridização (65°C/1 min) e extensão dos produtos formados (72°C/ 1 min), mais uma etapa adicional de extensão a 72°C por 10 minutos no final dos ciclos. Os produtos da amplificação primária foram submetidos a uma reação de nested-PCR, utilizando os oligonucleotídeos Cry-9 (5'-GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3') e Cry-15 (5'-GTAGATAATGAAGAGATTG TG-3') (Invitrogen), internos à região de 769 pares de base (pb) do primeiro produto de PCR, para amplificar um fragmento de aproximadamente 553pb. As condições de realização do Nested-PCR foram semelhantes ao PCR primário, com algumas modificações: o DNA (amplicons da reação primária) foram diluídos 1:100 ou 1:10 e os ciclos termais foram os

seguintes: desnaturação a 94°C por 50 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos em 55°C por 30 segundos e extensão da cadeia a 72°C por 50 segundos, em um total de 30 ciclos, seguido por extensão final a 72°C por 10 minutos.

b. Amplificação do gene 18S rRNA

As reações de amplificação do gene 18S rRNA foram realizadas como descrito por Xiao et al. (1999a, 2001), em um volume total de 50µl. Para a PCR primária foram utilizados: 4mM de MgCl₂, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,2µM dos oligonucleotídeos (primers) 18S-F (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') e 18S-R (5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3') (Invitrogen), 2µL de DNA genômico, 2,5U de Taq DNA polimerase (Platinum; Invitrogen) e água para PCR livre de DNase e RNase (qsp 50µL). Os tubos contendo a mistura reacional foram levados ao termociclador (MyCycler thermal cycler, BioRad) e submetidos a uma partida de 94°C por 3 minutos, e posteriormente a 30 ciclos termais de desnaturação (94°C/ 45s), hidridização (55°C/ 45s) e extensão dos produtos formados (72°C/ 1 min), com uma etapa adicional de extensão a 72°C por 7 minutos. Os produtos da amplificação primária foram submetidos a uma reação de nested-PCR, utilizando 3 mM de MgCl₂, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,1µM dos oligonucleotídeos (primers) 18SN-F (5'-GGAAGGGTGTATTTATTAGATAAAG-3') 18SN-R (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3') (Invitrogen), internos à região de 1325pb do primeiro produto de PCR, para amplificar um fragmento de 819-825pb, 1µL de amplicon da reação primária diluído 1:100 ou 1:10, 2,5U de Taq DNA polimerase e água para PCR livre de DNase e RNase (qsp 50µL). As condições do ciclo de realização do Nested-PCR foram idênticas a reação primária.

c. Análise dos amplicons gerados

Todos os produtos gerados nas reações de nested-PCR dos genes COWP e 18S rRNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio. Resumidamente, as amostras de amplicons foram ressuspensas em tampão carregador de amostra (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,125% e xileno cianol 0,125%) e aplicadas em gel de agarose 1%. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1x (Tampão Tris-Acetato-Tris 40mM, ácido acético 20mM e EDTA 1mM) e a condição de corrida de 100V por aproximadamente 90 minutos. O marcador de peso molecular (1Kb DNA

ladder - Invitrogen) e as bandas de DNA das amostras foram coradas pela submersão em solução de brometo de etídio 0,5µg/mL por 15 minutos, e, após descoloração, visualizadas por transiluminação em luz ultravioleta, quando foram fotografadas e registradas em sistema de fotodocumentação (Loccus Biotecnologia).

4.2.5 Digestão dos produtos de nested-PCR com enzimas de restrição

O tratamento dos produtos do nested-PCR com enzimas de restrição foi empregado para avaliar os polimorfismos existentes dentro dos genes estudados, buscando diferenciar as espécies de *Cryptosporidium*. Os produtos obtidos para o gene COWP foram submetidos ao tratamento com enzima de restrição *RsaI* 10U/µL (Fermentas), e aqueles obtidos para o gene 18S rRNA foram digeridos com as enzimas *SspI* 10U/µl e *VspI* 10U/µl (Fermentas). Todas as reações foram realizadas com volume final de 32µl. Nos tubos de reação foram adicionados 10µL de produto amplificado, 2µL do tampão da enzima 10x (fornecido pelo fabricante), 1U da enzima de restrição e água livre de DNase e RNase qsp 32µL. Após colocar todos os reagentes, os tubos foram incubados a 37°C por um período de 16 horas. Após inativação da enzima, a 65°C por 20 minutos, os produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%, utilizando como tampão de corrida o TAE 1x e voltagem de 100V por 2 horas. O marcador de peso molecular utilizado foi o 50pb DNA ladder (Invitrogen). O DNA digerido, corado em imersão em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL por 15 minutos, e, após descoloração, foi fotografado e registrado em sistema de fotodocumentação (Loccus Biotecnologia).

Para amostras que apresentaram digestão incompleta com alguma das enzimas de restrição, as reações foram repetidas utilizando 5µL do produto amplificado, 2µL do tampão da enzima, 1U de enzima, para um volume final de reação de 20µL.

5. RESULTADOS

5.1 COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS PARA DIAGNÓSTICO DE *Cryptosporidium* E *Isospora belli*

5.1.1 Avaliação de técnicas de concentração de oocistos em amostras fecais

a. Análise quantitativa

Os números totais de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* detectados em 20 campos microscópicos são mostrados na Tabela 4. A Tabela 5 apresenta a mediana, os valores máximo e mínimo do número total de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* nas diferentes amostras fecais avaliadas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as técnicas de SC e FE na concentração de oocistos de *Cryptosporidium* ($p>0,05$), porém o método de concentração SC foi significativamente melhor que o FE para concentração de oocistos de *I. belli* ($p<0,0001$). Além disso, o método SC detectou maior número de oocistos em 59,3% (16/27) das amostras positivas para *Cryptosporidium* e em 100% (15/15) das amostras positivas para *I. belli* (Figura 4).

Tabela 4 – Número total de oocistos de *Cryptosporidium* e *Isospora belli* detectados em 20 campos microscópicos de esfregaços fecais concentrados pelas técnicas de sedimentação por centrifugação (SC) ou formol-acetato de etila (FE). Aumento de 400x.

<i>Cryptosporidium sp</i>						<i>Isospora belli</i>		
Método de Concentração			Método de Concentração			Método de Concentração		
Amostra	SC	FE	Amostra	SC	FE	Amostra	SC	FE
Número de oocistos			Número de oocistos			Número de oocistos		
C1	54	18	C16	444	292	I1	68	28
C2	636	38	C17	290	68	I2	158	28
C3	16	15	C18	326	1380	I3	39	11
C4	874	690	C19	1628	1624	I4	114	48
C5	708	3958	C20	848	924	I5	138	35
C6	1560	2700	C21	1108	910	I6	152	51
C7	4038	4554	C22	610	1120	I7	89	17
C8	512	1272	C23	380	120	I8	47	22
C9	496	1406	C24	60	220	I9	29	24
C10	726	330	C25	144	120	I10	5	1
C11	50	48	C26	154	80	I11	45	31
C12	186	230	C27	86	80	I12	318	137
C13	120	138	----	----	----	I13	105	45
C14	28	10	----	----	----	I14	9	6
C15	172	6	----	----	----	I15	36	32

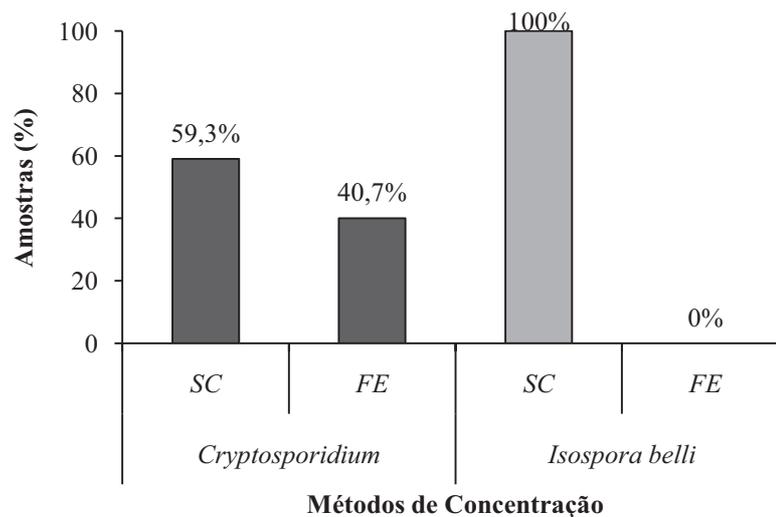
Tabela 5 – Mediana e valores mínimo e máximo do número total de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* em 20 campos microscópicos das amostras analisadas.

Protozoário/ Método de Concentração	SC	FE	p
	Mediana da contagem de oocistos (Mínimo - Máximo)		
<i>Cryptosporidium sp</i> (n=27)	380 (16 - 4038)	230 (6 - 4554)	0,714
<i>Isohora belli</i> (n=15)	68 (5 - 318)	28 (1 - 137)	*<0,0001

As amostras foram concentradas através das técnicas SC e FE, e depois coradas por ZN.

*Um número significativamente maior de oocistos de *I. belli* foi detectado após concentração por SC do que por FE (Teste de Wilcoxon).

Figura 4 – Percentual de amostras fecais com maior quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* e *Isohora belli* detectados, de acordo com a técnica de concentração utilizada. As amostras fecais de *Cryptosporidium* e *I. belli* foram concentradas por SC ou FE e coradas por Ziehl- Neelsen modificado como descrito em Material e Métodos.



Para avaliar as variações no desempenho dos métodos de concentração, de acordo com a carga de oocistos na amostra, as amostras positivas para *Cryptosporidium* foram escalonadas usando o método de concentração SC como padrão (Tabela 6). Foi observado que não houve diferença estatística entre os métodos de concentração SC e FE para *Cryptosporidium*, independente da densidade parasitária das amostras. Essa avaliação não foi realizada para as amostras de *I. belli* devido a maior homogeneidade no número de oocistos entre as amostras.

Tabela 6 – Avaliação dos métodos de concentração de acordo com a densidade de oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras fecais concentradas através das técnicas SC e FE, e corados por ZN. O escalonamento das amostras teve como base o método SC.

Densidade parasitária das amostras	Métodos de concentração		p*
	SC	FE	
	Mediana da contagem de oocistos (Mínimo e Máximo)		
1 - 150 oocistos (n=8)	57 (16 - 144)	64 (10 - 220)	0,46
151 - 500 oocistos (n=8)	308 (154 - 496)	175 (6 - 1406)	0,84
Mais que 501 oocistos (n=11)	848 (512 - 4038)	1120 (38 - 4554)	0,32

*Teste de Wilcoxon

b. Análise qualitativa

Na avaliação qualitativa dos métodos de concentração de oocistos, os esfregaços fecais depois de corados foram classificados como INFERIOR, REGULAR ou SUPERIOR, de acordo a presença de impurezas coradas no esfregaço e a contracoloração de fundo do mesmo, que poderiam dificultar a identificação do parasito, como mostrado na Figura 5. Esfregaços classificados como INFERIOR apresentavam muitas impurezas (leveduras, grãos de pólen e precipitados de corante) que coravam com a fucsina, além de uma contracoloração ruim, muito escura ou exatamente da cor do oocisto, o que dificultava muito a identificação do parasito. Esfregaços classificados como SUPERIOR apresentavam pouca ou nenhuma dessas características, e aqueles considerados de qualidade microscópica REGULAR, quando apresentavam alguns desses componentes, porém em menor quantidade. Alguns exemplos dessa avaliação são apresentados na Figura 5.

Na avaliação qualitativa dos métodos de concentração, o método FE apresentou o maior percentual de esfregaços fecais classificados como superior para ambos os parasitos, 63% (n=17) para *Cryptosporidium* e 80% (n=12) para *I. belli* (Figura 6). O método de SC mostrou uma maior variabilidade na análise qualitativa para *Cryptosporidium* do que para *I. belli*, com 25,9% e 12,5% dos esfregaços classificados como inferior, respectivamente (Figura 6).

Figura 5 – Características microscópicas avaliadas na classificação dos esfregaços fecais quanto à qualidade para fins diagnósticos. Esfregaços de qualidade **INFERIOR**: presença constante de detritos corados pela fucsina, como leveduras (a); oocistos descorados ou pouco corados (b); contracoloração ruim e escura, que dificulta a visualização dos parasitos (c); e precipitados de corante (d). Esfregaço **REGULAR** : presença dessas alterações em menos da metade dos campos microscópicos lidos. Esfregaço **SUPERIOR**: excelente qualidade diagnóstica, sem dificuldades na identificação dos oocistos.

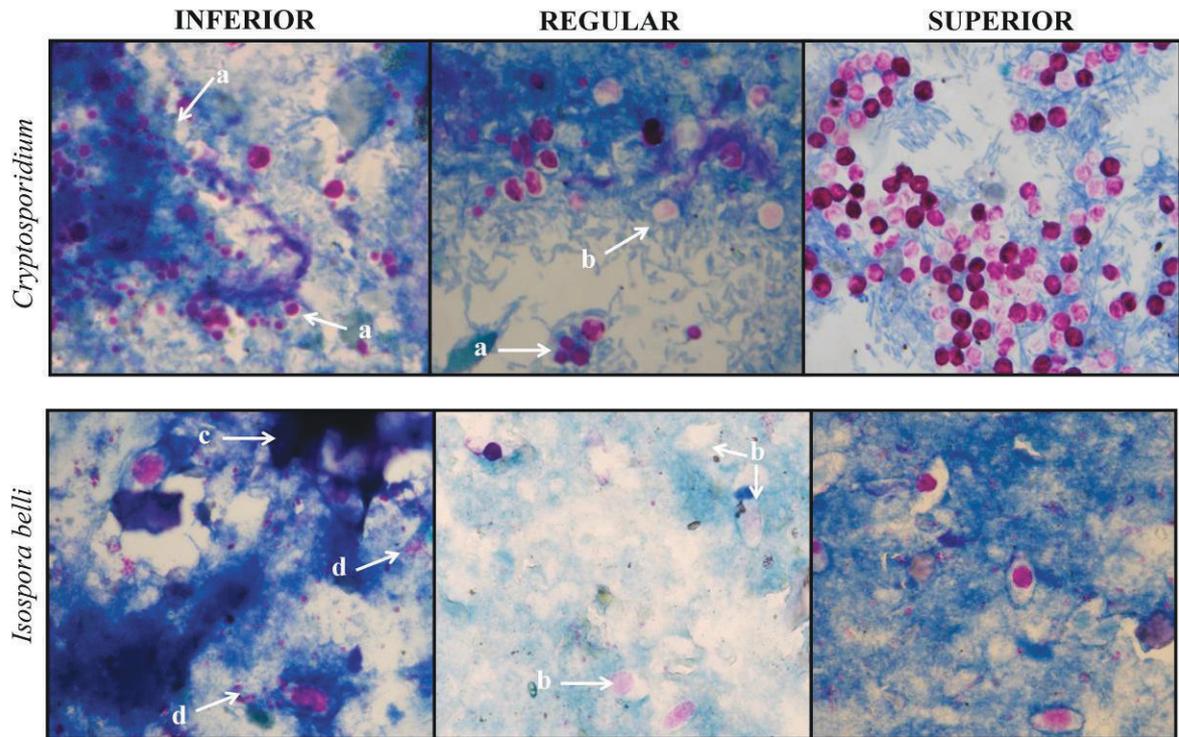
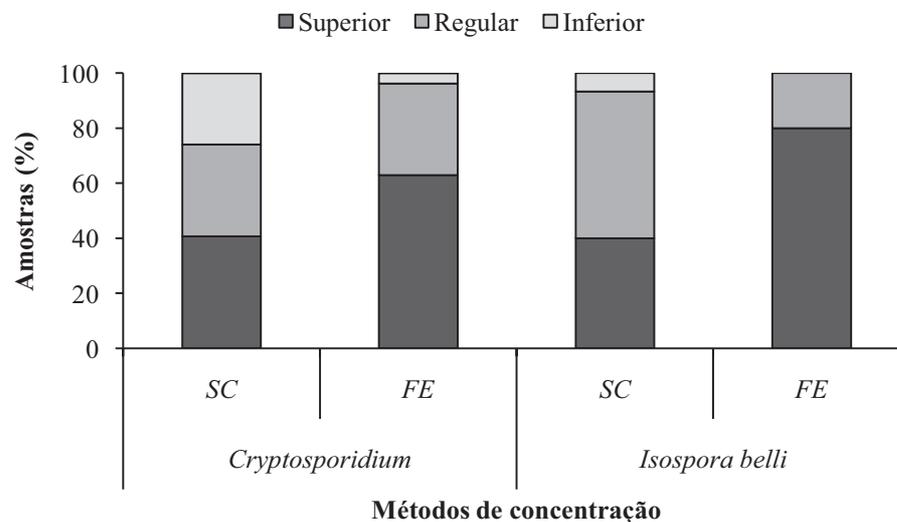


Figura 6 – Avaliação qualitativa das técnicas de concentração SC e FE, para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e *Isospora belli*. Após concentração das fezes por SC, os esfregaços fecais foram corados por ZN e classificados microscopicamente como **SUPERIOR**, **REGULAR** e **INFERIOR**, como descrito em Material e Métodos.



c. *Análise da perda de oocistos no anel de detritos gordurosos*

Para avaliar o potencial de perda de oocistos durante concentração pelo método de FE, nós examinamos simultaneamente a camada de detritos gordurosos, produzida na técnica e que geralmente é desprezada, e o sedimento fecal. O número total de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* em 20 campos microscópicos no anel de detritos gordurosos e no sedimento, além do percentual de perda de oocistos no anel em cada amostra analisada, são mostrados na Tabela 7. A análise da perda de oocistos na técnica de FE mostrou que em praticamente todas as amostras positivas para *Cryptosporidium* (96,3%; n=26) e para *I. belli* (93,3%, n= 14) houve detecção de oocistos na faixa de detritos gordurosos. Para *Cryptosporidium* essa perda variou de 0 a 96,7% dos oocistos totais, e para *I. belli* variou de 0% a 84,4%. Além disso, em 25,9% (7/27) das amostras de *Cryptosporidium* e em 46,6% (7/15) das amostras de *I. belli*, houve maior concentração de oocistos no anel do que no sedimento (Figura 7). Uma distribuição significativamente mais alta de oocistos de *Cryptosporidium* no sedimento do que na área de detritos gordurosos foi observado ($p=0,0042$). Já para *I. belli*, não houve diferença entre a distribuição dos oocistos em ambas as áreas analisadas ($p=0,35$) (Tabela 8).

Tabela 7 – Avaliação da perda de oocistos de *Cryptosporidium* e *Isospora belli* em esfregaços fecais concentrados pelo método formol-acetato de etila (FE).

<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Isospora belli</i>							
Número de oocistos				Número de oocistos				Número de oocistos			
Amostra	FE-AG	FE-SE	% perda	Amostra	FE-AG	FE-SE	% perda	Amostra	FE-AG	FE-SE	% perda
C1	33	18	64.7	C16	318	292	52.1	I1	53	28	65,4
C2	822	38	95.6	C17	192	68	73.8	I2	152	28	84,4
C3	3	15	16.7	C18	51	1380	3.6	I3	12	11	52,2
C4	504	690	42.2	C19	1502	1624	48.0	I4	36	48	42,8
C5	269	3958	6.4	C20	0	924	0.0	I5	189	35	84,4
C6	820	2700	23.3	C21	335	910	26.9	I6	77	51	60,1
C7	81	4554	1.7	C22	119	1120	9.6	I7	69	17	80,2
C8	4	1272	0.3	C23	64	120	34.8	I8	18	22	45
C9	770	1406	35.4	C24	4	220	1.7	I9	9	24	27,3
C10	450	330	57.7	C25	44	120	26.8	I10	0	1	0.0
C11	10	48	17.2	C26	45	80	36.0	I11	23	31	42.6
C12	216	230	48.4	C27	49	80	38.0	I12	168	137	55.1
C13	20	138	12.6	----				I13	31	45	40.8
C14	40	10	80.0	----				I14	5	6	45.4
C15	176	6	96,7	----				I15	16	32	33.3

* Amostras fecais de *Cryptosporidium* (C1 – C27) e *I. belli* (I1 – I15) foram concentradas pela técnica de FE e coradas por Ziehl-Neelsen modificado como descrito em Material e Métodos. Esfregaços fecais foram preparados das áreas do anel de gordura (FE-AG) e do sedimento (FE-SE) após concentração. O número de oocistos em 20 campos microscópicos e o percentual de perda de oocistos na área FE-AG foram avaliados.

Figura 7 – Representação gráfica da técnica de formol-acetato de etila (FE) e percentual de amostras com maior número de oocistos de *Cryptosporidium* ou *Isospora belli* detectados, de acordo com a área examinada (anel de detritos gordurosos ou sedimento).

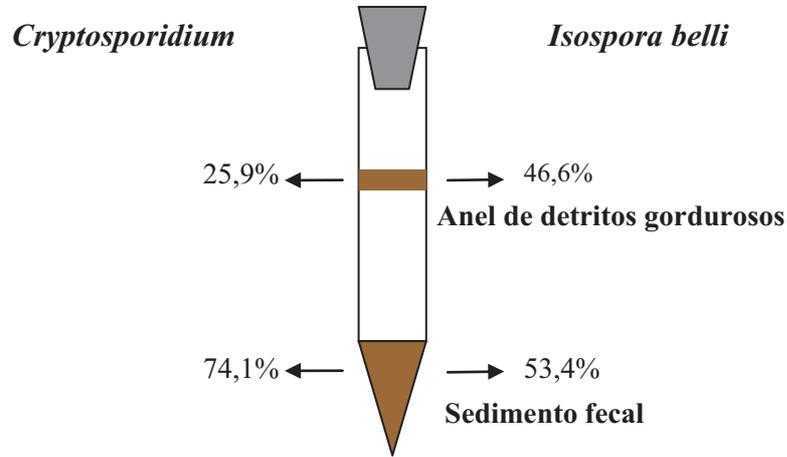


Tabela 8 – Mediana, mínimo e máximo do número de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* detectados em 20 campos microscópicos, de acordo com a área analisada, após concentração pela técnica de FE.

Protozoário/ Método	Anel de Detritos Gordurosos do FE	Sedimento Fecal do FE	p
	Mediana da contagem de oocistos (Mínimo – Máximo)		
<i>Cryptosporidium</i> (n=27)	81 (0-1502)	230 (6 - 4554)	*0,0042
<i>Isospora belli</i> (n=15)	31 (0 – 189)	28 (1 - 137)	0,35

* Concentração significativamente maior de oocistos de *Cryptosporidium* no sedimento fecal (Teste de Wilcoxon).

5.1.2 Avaliação de métodos de coloração de oocistos em amostras fecais

a. Análise quantitativa

Os números totais de oocistos de *Cryptosporidium* e *Isospora belli* em 20 campos examinados dos esfregaços fecais corados por ZN, SF ou AR, são apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. A Tabela 11 mostra a mediana e os valores máximo e mínimo do

número total de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli*. A análise estatística evidenciou que não houve diferença entre as três técnicas de coloração para o diagnóstico das amostras positivas para *I. belli*, enquanto que para *Cryptosporidium* o método de coloração pela SF foi significativamente inferior aos outros dois métodos, ZN e AR, sendo que entre estes últimos, não houve diferença estatística no número de oocistos detectados. Por outro lado, o método de coloração ZN identificou um maior número de oocistos que os outros dois métodos em 57,7% (n= 15) e 53,3% (n=8) das amostras positivas para *Cryptosporidium* e *I. belli*, respectivamente. A coloração Safranina, por sua vez, foi melhor que os outros dois métodos de coloração apenas para uma amostra de *Cryptosporidium* e duas de *I. belli* (Figura 7).

Tabela 9 – Número total de oocistos de *Cryptosporidium* detectados em 20 campos microscópicos de esfregaços fecais corados por ZN, SF e AR. Aumento de 400x.

Amostra	Métodos de coloração			Amostra	Métodos de coloração		
	ZN	SF	AR		ZN	SF	AR
Número de oocistos				Número de oocistos			
C1	36	22	119	C14	194	85	89
C2	152	249	620	C15	127	96	24
C3	9	7	12	C16	265	237	232
C4	117	85	388	C17	167	141	126
C5	113	378	726	C18	200	178	188
C6	566	1400	584	C19	1343	1538	4505
C7	2740	1659	1758	C20	1738	204	1845
C8	521	210	424	C21	985	156	3740
C9	780	396	428	C22	462	298	416
C10	1194	575	522	C23	309	82	0
C11	30	20	38	C24	398	17	32
C12	213	227	336	C25	97	14	52
C13	93	4	22	C26	198	104	30

Tabela 10 – Número total de oocistos de *I. belli* detectados em 20 campos microscópicos de esfregaços fecais corados por ZN, SF e AR. Aumento de 400x.

Amostras	Métodos de coloração		
	ZN	SF	AR
	Número de oocistos		
I1	57	51	76
I2	122	90	144
I3	27	17	0
I4	60	41	31
I5	78	97	77
I6	62	92	120
I7	36	23	29
I8	18	7	6
I9	41	17	17
I10	11	22	19
I11	53	64	55
I12	144	187	234
I13	156	76	30
I14	17	11	5
I15	68	33	46

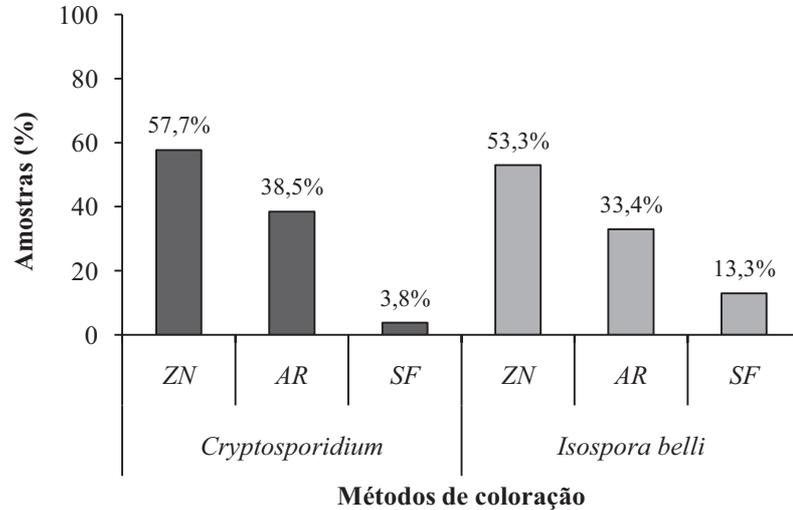
Tabela 11 – Mediana, mínimo e máximo do número total de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli*, observados em 20 campos microscópicos dos esfregaços fecais corados por ZN, SF e AR.

Protozoário/ Método de Coloração	Método de coloração			p ZN x SF	p ZN x AR	p SF x AR
	ZN	SF	AR			
	Mediana da contagem de oocistos (Mínimo -Máximo)					
<i>Cryptosporidium sp</i> (n=26)	206,5 (9 - 2740)	167 (4 - 1659)	284 (0 - 4505)	*<0,01	>0,05	*<0,05
<i>Isospora belli</i> (n=15)	57 (11 - 156)	41 (7 - 187)	31 (0 - 284)	>0,05	>0,05	>0,05

As amostras foram concentradas por SC, e depois os esfregaços foram corados por ZN, AR e SF.

* Os métodos ZN e AR detectaram significativamente maior número de oocistos que o método SF (Teste ANOVA de Friedman)

Figura 8 – Percentual de amostras fecais com quantidade maior de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* detectados por campo, de acordo com a técnica de coloração utilizada. As amostras fecais de *Cryptosporidium* e *I. belli* foram concentradas por SC, e os esfregaços foram corados por ZN, AR e SF, como descrito em Material e Métodos.



Para as amostras positivas para *Cryptosporidium* foi feito um escalonamento de acordo com a densidade de oocistos na amostra, usando o método de coloração ZN como padrão (Tabela 12). Foi observado que o método ZN foi significativamente melhor ($p=0,03$) que os outros dois métodos de coloração para amostras com menor carga parasitária (1 – 150 oocistos), enquanto que para amostras com maior concentração de oocistos não houve diferença entre os três métodos de coloração analisados (Tabela 12).

Tabela 12 – Avaliação dos métodos de coloração de acordo com a densidade de oocistos nas amostras. As amostras fecais foram concentradas através das técnicas SC e coradas por ZN, AR ou SF. O escalonamento das amostras teve como base o método ZN.

Densidade parasitária das amostras	Métodos de coloração			p*
	ZN	SF	AR	
	Mediana da contagem de oocistos (Mínimo - Máximo)			
1 - 150 oocistos (n=8)	95 (9 - 127)	21 (4 - 378)	45 (12 - 726)	0,03
151 - 500 oocistos (n=10)	206,5 (152 - 462)	159,5 (17 - 298)	157 (0 - 620)	0,06
> 501 oocistos (n=8)	1089,5 (521 - 2740)	485,5 (156 - 1659)	1171 (424 - 4505)	0,28

*Teste ANOVA de Friedman.

b. Análise qualitativa

Na avaliação qualitativa dos métodos de coloração, os esfregaços fecais depois de corados foram classificados da mesma forma que na análise dos métodos de concentração. A Figura 9 mostra representações de esfregaços classificados como INFERIOR, REGULAR e SUPERIOR para cada método de coloração analisado para *Cryptosporidium* e *I. belli*.

Esfregaços fecais corados com AR apresentaram menor quantidade de impurezas e melhor contraste entre a cor dos oocistos de *Cryptosporidium* e a coloração de fundo. Em todas as amostras positivas para *Cryptosporidium*, este método teve classificação como superior, porém apenas três amostras contendo *I. belli* foram consideradas de alta qualidade para a identificação do parasito. O método ZN produziu esfregaços fecais de boa qualidade para ambos os parasitos, apresentando classificação como superior para 80,8% (21) e 66,7% (10) das amostras positivas para *Cryptosporidium* e *I. belli*, respectivamente. Já os esfregaços corados por SF apresentaram grande quantidade de impurezas e um contraste que dificultava a visualização dos oocistos de ambos coccídeos na maioria das amostras (Figura 9).

Figura 9 – Avaliação qualitativa das técnicas de coloração. Após concentração das fezes por SC, os esfregaços fecais foram corados por ZN, AR e SF para a identificação de *Cryptosporidium* e *I. belli* e classificados, quanto a qualidade microscópica, como SUPERIOR, REGULAR E INFERIOR, como descrito em Material e Métodos.

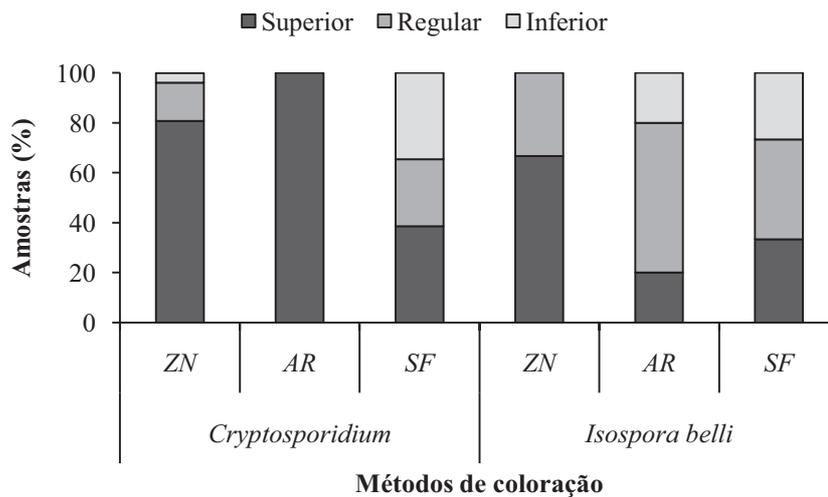
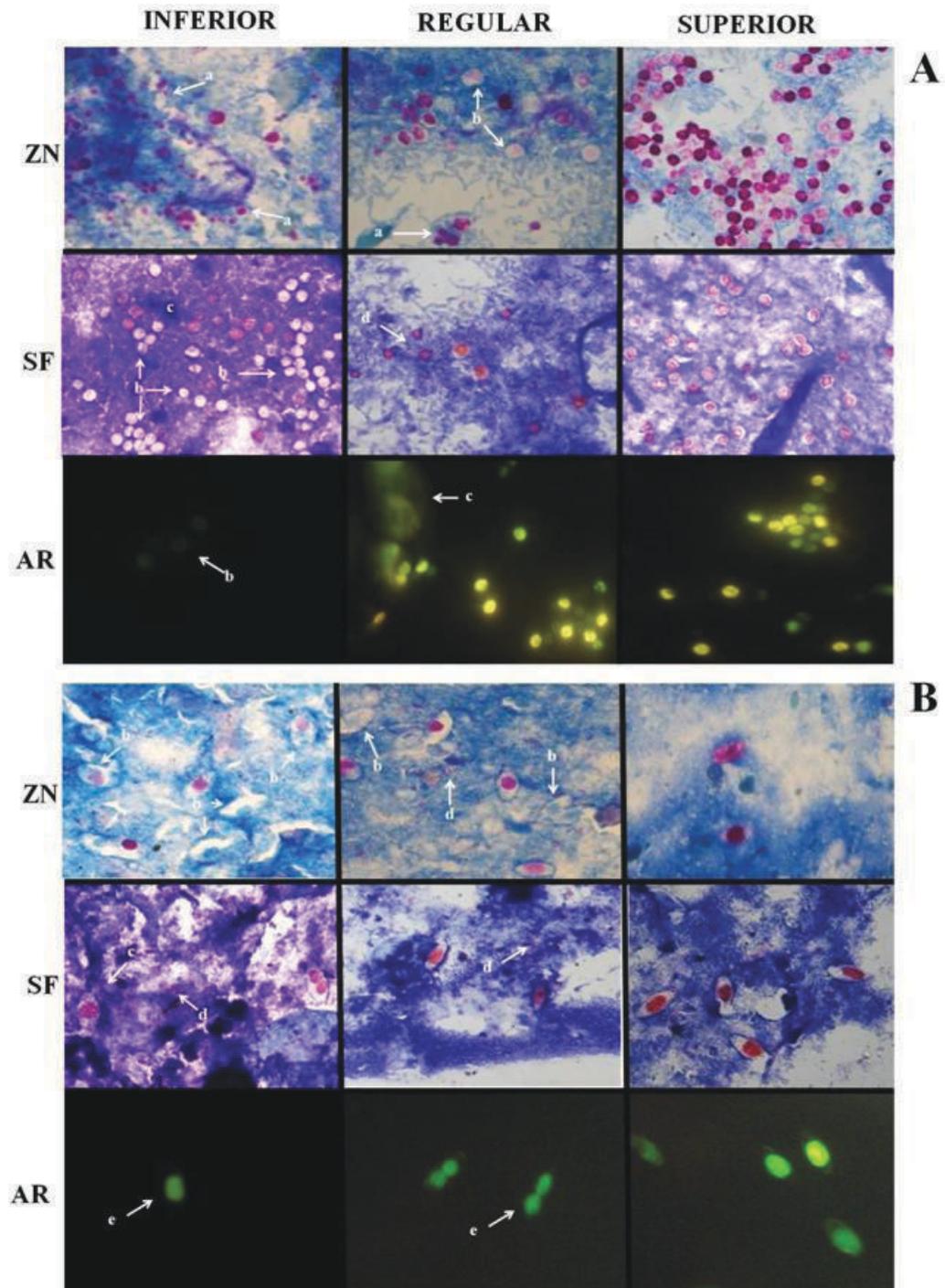


Figura 10 – Características microscópicas avaliadas na classificação dos esfregaços fecais quanto à qualidade das colorações ZN, SF e AR, para diagnóstico de *Cryptosporidium* (A) e *I. belli* (B). Esfregaços de qualidade INFERIOR: presença constante de detritos corados pela fucsina, como leveduras (a); oocistos descolorados ou pouco corados (b); contracoloração ruim e escura, que dificulta a visualização dos parasitos (c); precipitados de corante (d); e falta de coloração da membrana do oocisto (e). Esfregaço REGULAR : presença dessas alterações em menos da metade dos campos microscópicos lidos. Esfregaço SUPERIOR: excelente qualidade diagnóstica, sem dificuldades na identificação dos oocistos.



5.2 COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO PARASITOLÓGICO E A PESQUISA DE COPROANTÍGENO POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA O DIAGNÓSTICO DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS FECAIS DE DIVERSOS GRUPOS DE CRIANÇAS

A avaliação microscópica e/ou por ELISA das fezes detectou 16 amostras positivas para *Cryptosporidium*, dando uma frequência de aproximadamente 2,6% (16/626) na população total desse estudo. As frequências relativas de *Cryptosporidium* de cada grupo de acordo com o método diagnóstico utilizado (ZN e ELISA) são mostradas na Tabela 13. A maior frequência de *Cryptosporidium* foi observada no grupo de crianças com diarreia (8/171; 4,7%), seguido por crianças HIV positivas (1/30; 3,3%). A frequência menor de infecção por *Cryptosporidium* foi em crianças de creche (3/258; 1,1%) (Tabela 13).

Tabela 13 – Frequência de *Cryptosporidium* em diferentes grupos de crianças.

Grupo de pacientes	Frequência de <i>Cryptosporidium</i>		
	ZN n (%)	ELISA n (%)	ZN + ELISA n (%)
Crianças com diarreia (n=171)	7 (4,1)	7(4,1)	8 (4,7)
Crianças com desnutrição (n=88)	2 (2,3)	1 (1,1)	2 (2,3)
Crianças com Câncer (n=79)	2 (2,5)	2 (2,5)	2 (2,5)
Crianças portadoras de HIV (n= 30)	0 (0,0)	1 (3,3)	1 (3,3)
Crianças de creche (n=258)	3 (1,1)	3 (1,1)	3 (1,1)
Total	14 (2,2)	14 (2,2)	16 (2,6)

Do total de 626 amostras, tanto o método de coloração ZN quanto o ELISA revelaram 14 (2,2%) amostras positivas para *Cryptosporidium*, sendo que duas amostras foram diagnosticadas apenas através da microscopia e duas apenas pelo ELISA (Tabela 14). Considerando o método microscópico como padrão-ouro, a sensibilidade e especificidade do ELISA foram de 85,7% e 99,7%, respectivamente (Tabela 14).

Tabela 14 – Correlação entre ELISA e ZN para detecção de *Cryptosporidium*.

ELISA	ZN		Total	Sensibilidade*	Especificidade*
	Positivo	Negativo			
Positivo	12	2	14		
Negativo	2	610	612	85,7%	99,7%
Total	14	612	626		

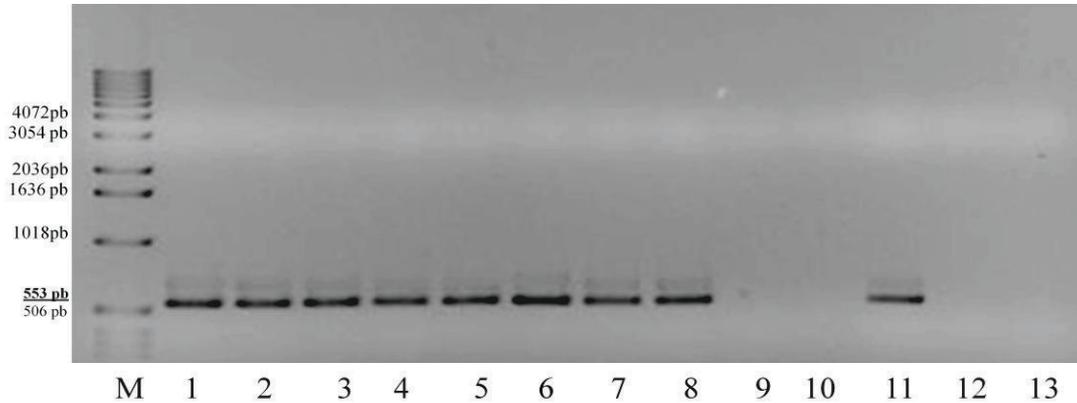
*A sensibilidade e especificidade foram calculadas considerando o ZN como o padrão-ouro

5.3 GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Cryptosporidium*

5.3.1 Amplificação e avaliação do polimorfismo do gene COWP para caracterização das espécies de *Cryptosporidium*

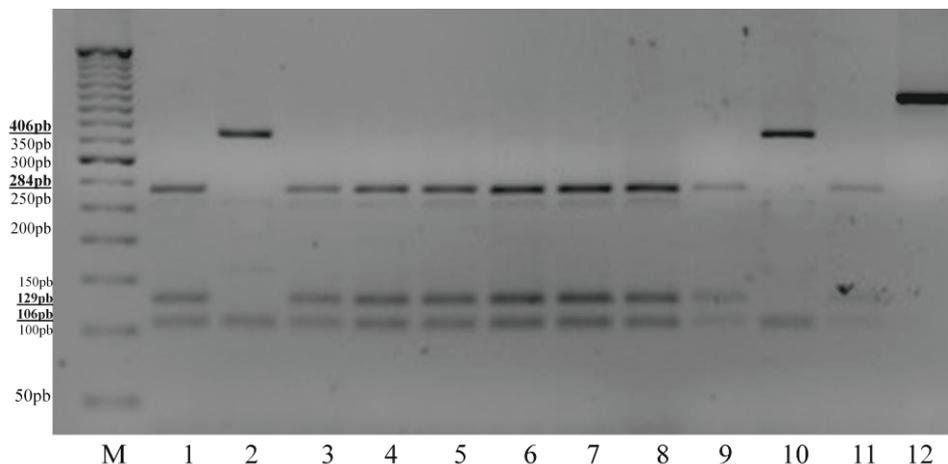
Todas as 16 amostras positivas para *Cryptosporidium* descritas acima, e nove isolados disponíveis no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia, provenientes de outros estudos, foram submetidas à Nested-PCR para amplificação do gene COWP. Das 25 amostras analisadas, 21 (84%) produziram amplicons com pesos moleculares na faixa esperada de, aproximadamente, 553 pb (Figura 11). Quatro amostras, A17, Q285, R02 e L02, não amplificaram este gene (Tabela 15).

Figura 11 – Amplificação pelo Nested-PCR do gene COWP. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Os DNAs amplificados a partir dos isolados de *Cryptosporidium* foram aplicados aos canais do gel na seguinte ordem: M - marcador de peso molecular (1kb DNA ladder), canal 1 - controle positivo, canais 2-12 – amostras C71, C72, C23, B59, B35, Q345, Q89, A17, R02, C181 e L02; canal 13 – controle negativo.



A Figura 12 mostra um gel de agarose a 3% contendo os produtos da digestão do gene COWP com a enzima *RsaI*. Como esperado, o controle positivo de *C. hominis* evidenciou a presença de dois sítios de restrição, gerando três bandas com pesos moleculares de aproximadamente 284pb, 129pb e 106pb, e o controle positivo de *C. parvum* apresentou apenas um sítio de restrição, gerando duas bandas com aproximadamente 406 e 106pb. Na Tabela 15 encontram-se os resultados do RFLP de todas as amostras amplificadas. Dos 21 isolados que amplificaram o gene COWP, 20 (95,2%) exibiram padrão de *C. hominis*, e apenas um isolado (1,8%), Q345, apresentou padrão de *C. parvum*.

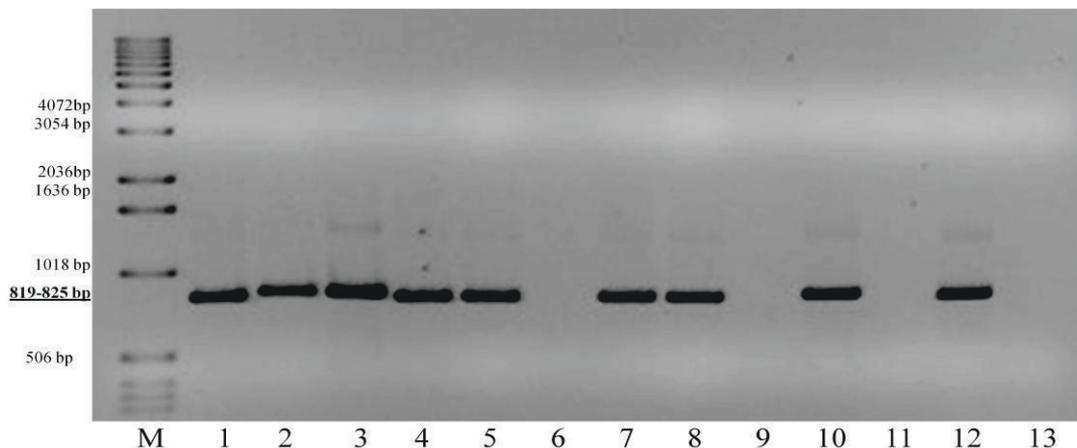
Figura 12 – Avaliação por RFLP do polimorfismo do gene COWP de diferentes isolados de *Cryptosporidium*. Os produtos de digestão com enzima *RsaI* do DNA de *Cryptosporidium* amplificado foram aplicados aos canais do gel a 3%, na seguinte ordem: M - marcador de peso molecular (50pb DNA ladder), canal 1 - controle positivo *C. hominis* (284, 129 e 106pb), canal 2 – controle positivo *C. parvum* (406 e 106pb), canais 3- 11– amostras C71, C72, C23, B59, B35, Q89, C181, Q345 e 025; canal 12 - amplicon do gene COWP 553pb.



5.3.2 Amplificação e avaliação do polimorfismo do gene 18S rRNA para caracterização das espécies de *Cryptosporidium*

Todas as amostras submetidas à amplificação para o gene COWP também foram avaliadas para o gene 18S rRNA. Das 25 amostras analisadas, 21 (84%) resultaram em amplicons com pesos moleculares na faixa de 819-825pb (Figura 13). A Figura 13 mostra um gel de agarose representativo dos amplicons do gene 18S rRNA gerados no nested-PCR. Quatro amostras, A17, Q285, C181 e B35, não apresentaram amplificação do gene.

Figura 13 – Amplificação pelo Nested-PCR do gene 18S rRNA. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Os DNAs amplificados a partir dos isolados de *Cryptosporidium* foram aplicados aos canais do gel na seguinte ordem: M - marcador de peso molecular (1kb DNA ladder), canal 1 - controle positivo, canais 2-12 – amostras C71, C72, C23, B59, B35, Q345, Q89, A17, R02, C181 e L02; canal 13 – controle negativo.



Os produtos gerados pela digestão dos amplicons do gene 18S rRNA com as enzimas *SspI* e *VspI* são mostrados na Figura 14. Após digestão com *SspI* as amostras padrão de *C. hominis* e *C. parvum* evidenciaram o mesmo perfil de bandas, evidenciando a presença de dois sítios de restrição, gerando três bandas de aproximadamente 448, 247 e 106pb. Quatro amostras apresentaram padrão de bandas após digestão com enzima *SspI* compatível com *C. felis* (426 e 390pb) (Figura 14A). A análise de RFLP com enzima *VspI* permitiu diferenciar os padrões de *C. hominis* e *C. parvum*. A amostra padrão de *C. hominis* evidenciou a presença de dois sítios de restrição, gerando três bandas de aproximadamente 561, 116 e 70pb, e a de *C. parvum*, a presença de apenas um sítio de restrição, gerando duas bandas com aproximadamente 628 e 116pb (Figura 14B). Os isolados identificados como *C. felis* apresentaram digestão incompleta com enzima *VspI*, apresentando bandas fracas de 476, 182 e 104pb. Dos 21 isolados que amplificaram o gene 18S rRNA, 16 (76,2%) exibiram padrão

genotípico de *C. hominis*, um isolado (4,8%), Q345, apresentou genótipo de *C. parvum*, e quatro (19%), C71, C72, R02 and L02, foram identificados como *C. felis* (Tabela 15).

Figura 14 – Avaliação por RFLP do polimorfismo do gene 18S rRNA nos diferentes isolados de *Cryptosporidium* com enzimas *SspI* (A) e *VspI* (B). Gel de agarose 3%. Os produtos de digestão foram aplicados aos canais do gel na seguinte ordem: M - marcador de peso molecular (50pb DNA ladder), canal 1 - controle positivo *C. hominis*, canal 2 – controle positivo *C. parvum*, canais 3-11 – amostras C71, C72, C23, B59, L02, R02, C28, Q345 e O25; canal 12 – amplicon do gene 18S rRNA de 819-825pb.

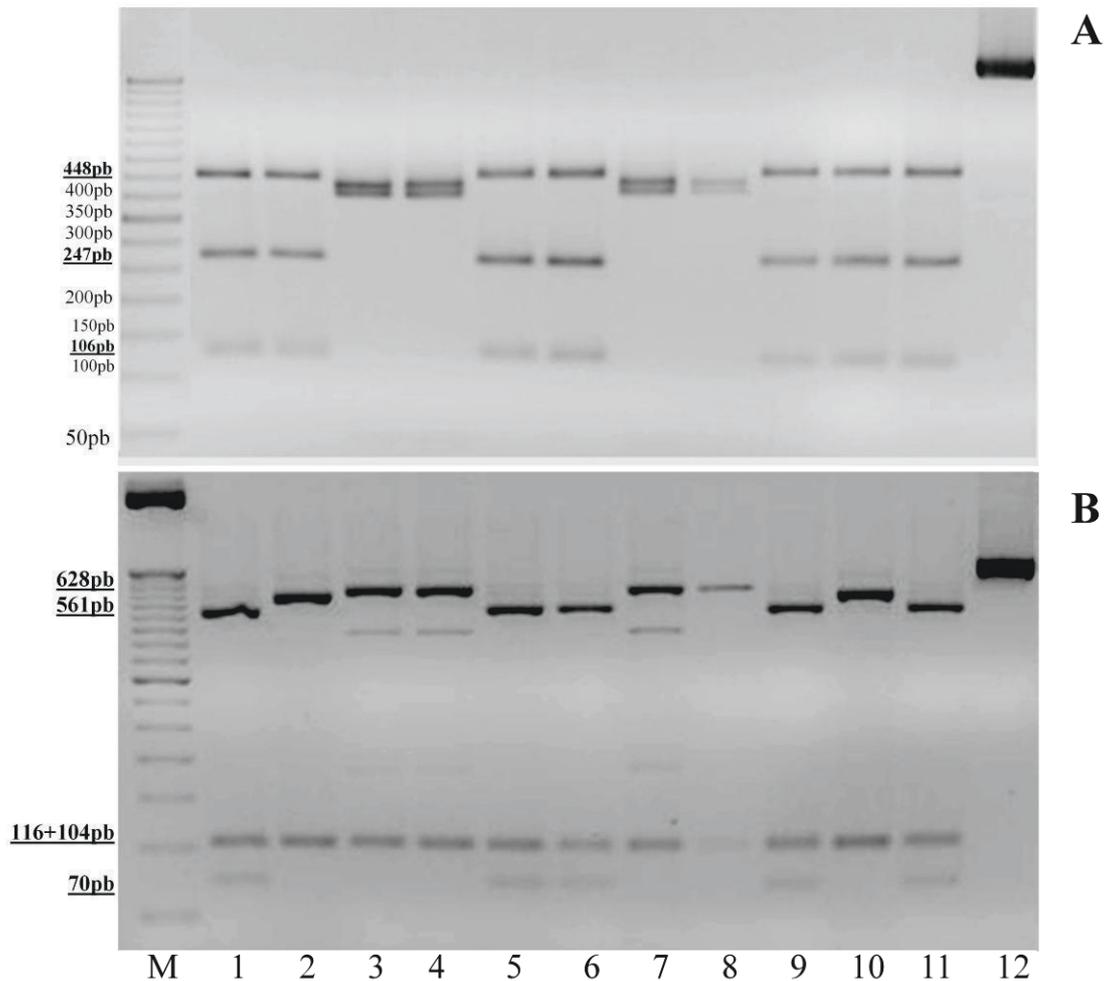


Tabela 15 – Dados gerais das análises das amostras positivas para *Cryptosporidium*, incluindo origem da amostra, resultados dos diferentes métodos diagnósticos empregados e a genotipagem dos isolados pela análise dos genes COWP e 18S rRNA.

Amostra positiva (ELISA e/ou ZN)	Origem da amostra	ELISA	ZN	Gene COWP	Genótipo	Gene 18S rRNA	Genótipo
C13	Criança com diarreia	-	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
C23	Criança com diarreia	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
C28	Criança com diarreia	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
C71	Criança com diarreia	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. felis</i>
C72	Criança com diarreia	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. felis</i>
C143	Criança com diarreia	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
C164	Criança com diarreia	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
C181	Criança com diarreia	+	-	+	<i>C. hominis</i>	-	NA
O25	Criança com câncer	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
O55	Criança com câncer	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
A17	Criança HIV +	+	-	-	NA	-	NA
B59	Criança desnutrida	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
B35	Criança desnutrida	-	+	+	<i>C. hominis</i>	-	NA
L01	Adulto HIV+	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
L02	Adulto HIV+	+	+	-	NA	+	<i>C. felis</i>
E284	Criança de creche	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
E306	Criança de creche	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
Q89	Criança do interior da Bahia	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
Q215	Criança do interior da Bahia	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
Q272	Criança do interior da Bahia	+	-	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
Q285	Criança do interior da Bahia	+	+	-	NA	-	NA
Q345	Criança do interior da Bahia	+	+	+	<i>C. parvum</i>	+	<i>C. parvum</i>
R02	Criança de creche	+	+	-	NA	+	<i>C. felis</i>
R07	Criança de creche	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>
R228	Criança de creche	+	+	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. hominis</i>

NA: Não amplificou; +: positivo; -: negativo

5.3.3 Avaliação das discordâncias entre ZN e ELISA no diagnóstico de *Cryptosporidium* utilizando a PCR

A Tabela 15 mostra um sumário das análises de amostras positivas para *Cryptosporidium* pelos diferentes métodos, incluindo os resultados de genotipagem dos genes COWP e 18S rRNA. Nesta tabela podemos observar algumas discordâncias nos resultados entre os métodos. Amostras Q272 e C181, positivas no método de ELISA, mas negativa na microscopia, e amostras C13 e B35, positiva apenas na microscopia, amplificaram pelo menos um dos genes analisados por PCR. Por outro lado, as amostras Q285 e A17, positiva para *Cryptosporidium* na microscopia e/ou no ELISA, não amplificaram nenhum dos genes.

Foi também observado discordâncias na amplificação de diferentes genes, duas amostras, B35 e C181, que amplificaram o fragmento do gene COWP, não apresentaram amplicons após nested-PCR do gene 18S rRNA. Por outro lado, amostras R02 e L02 amplificaram este último, mas não o gene COWP.

Somando os resultados de amplificação de ambos os genes analisados obtemos uma eficiência de amplificação de 92% (23/25). A maioria das amostras que amplificaram ambos os genes não apresentaram discordâncias nas espécies identificadas, exceto as amostras C71 e C72, que apresentaram perfil de *C. hominis* após RFLP com *RsaI* do gene COWP, mas teve padrão de *C. felis* após RFLP com enzimas *SspI* e *VspI* do gene 18S rRNA, provavelmente essas amostras continham uma mistura de espécies. Compilando as análises dos dois genes, a frequência de cada espécie identificada foi: *C. hominis* (78,3%; 18/23), *C. felis* (8,7%; 2/23), *C. parvum* (4,3%; 1/23) e mistura *C. felis* + *C. hominis* (8,7%; 2/23).

6. DISCUSSÃO

Devido a excreção irregular e distribuição heterogênea de oocistos de coccídeos oportunistas nas amostras de fezes de hospedeiros infectados, é recomendado que as amostras sejam concentradas por métodos de flutuação ou sedimentação, antes da coloração de esfregaço fecal. Os métodos de concentração têm como objetivo eliminar detritos fecais, eliminando partículas que podem confundir com oocistos e aumentar as chances de encontrar o parasito, especialmente em indivíduos assintomáticos, com baixa carga parasitária (HUBER; BONFIM; GOMES, 2003; HUBER; BONFIM; GOMES, 2004). A técnica de concentração formol-éter ou formol-acetato de etila tem a vantagem de remover gorduras e fibras presentes nas fezes e é altamente recomendada para o diagnóstico de coccídeos em humanos (HUBER; BONFIM; GOMES, 2003). Entretanto, estudos comparativos usando esta técnica têm mostrado resultados inconsistentes para o diagnóstico de *Cryptosporidium*. Alguns estudos mostram que a técnica de formol-éter ou formol-acetato de etila é melhor que a técnica de flutuação em solução de sacarose (CASEMORE; ARMSTRONG; SANDS, 1985; MTAMBO et al., 1992), outros estudos relatam que os métodos de flutuação são mais eficientes que o formol-éter (GARCIA et al., 1983; HUBER; BONFIM; GOMES, 2003), e outros não relatam diferenças entre essas técnicas (McNABB et al., 1985). Porém, não existem estudos que comparem os diferentes métodos de concentração por sedimentação de oocistos, como os métodos de formol-éter/acetato de etila e a sedimentação por centrifugação. Neste trabalho avaliamos essas duas técnicas para concentração de oocistos de *Cryptosporidium* e *I. belli* em amostras de fezes de indivíduos infectados, diagnosticados no LACEN-BA.

Em nosso estudo as fezes positivas processadas pelo método SC tiveram maior contagem de oocistos nos campos microscópicos analisados do que por FE, e isto foi particularmente significativo para detecção de *I. belli*, onde todas as amostras testadas apresentaram mais oocistos nos esfregaços concentrados por SC. Por outro lado, fezes processadas por FE tiveram menor quantidade de impurezas, realçando a presença dos oocistos nas amostras, sendo, a maioria dos esfregaços concentrados por FE classificados com qualidade microscópica superior ou regular. Como já descrito na literatura, o acetato de etila usado na técnica tem a função de remover detritos gordurosos presente nas fezes, fornecendo um esfregaço mais limpo, facilitando a identificação dos oocistos (CASEMORE; ARMSTRONG; SANDS, 1985; HUBER; BONFIM; GOMES, 2003).

Alguns estudos sugerem que a eficiência dos métodos de concentração diminui com a redução da carga parasitária (WEBER; BRYAN; JURANEK, 1992). Em nosso estudo não houve diferença estatística entre os métodos de concentração SC e FE para *Cryptosporidium*, independente da densidade parasitária das amostras. Essa avaliação não foi realizada para as amostras de *I. belli* devido a maior homogeneidade no número de oocistos presentes.

Alguns estudos relatam que o método de concentração formol-éter/acetato de etila pode resultar em uma perda de oocistos, quando comparado a outros métodos de concentração (CASEMORE; ARMSTRONG; SANDS, 1985; CASEMORE, 1991; WEBER et al., 1991; WEBER; BRYAN; JURANEK, 1992). Para avaliar a perda de oocistos durante a técnica de FE, nós examinamos simultaneamente o anel de gordura e o sedimento. Observamos que em praticamente todas as amostras houve perda de oocistos na camada de gordura. A distribuição de oocistos de *Cryptosporidium* ou *I. belli* no anel de gordura variou consideravelmente, de 0 - 96,7% ou 0 - 84,4%, respectivamente, do número total de oocistos identificados, dependendo da amostra analisada. A enorme variação de perda de oocistos na camada de gordura entre as diferentes amostras de fezes indica a necessidade de examinar esta área durante rotina diagnóstica para evitar resultados falso-negativos, especialmente no caso de amostras contendo *I. belli*, onde observamos em quase metade das amostras um número maior de oocistos no anel de detritos gordurosos do que no sedimento fecal. A falta de diferença estatística na contagem de oocistos de *I. belli* entre essas áreas reforça a ocorrência de perda de parasitos para o anel de gordura. Isto é principalmente importante em pacientes com baixa carga parasitária, tais como pacientes assintomáticos, ou aqueles pacientes com síndrome de má absorção com alta concentração de gordura nas fezes. Além disso, é importante mencionar que esfregaços concentrados por FE apresentavam mais frequentemente “oocistos fantasmas”, que são oocistos com coloração muito fraca ou não corados, o que pode dificultar muito o diagnóstico. Esses oocistos descorados têm sido associados com infecções resolvidas (HARRINGTON, 2009). Entretanto, é possível que resíduos de acetato de etila, usado no procedimento, possa ter afetado a composição da membrana lipídica dos oocistos, alterando suas propriedades tintoriais. Considerando esses resultados, para a avaliação dos métodos de coloração, os esfregaços fecais foram preparados após concentração por SC.

Este estudo comparou três diferentes métodos de coloração de oocistos, comumente usados em laboratórios clínicos. O desempenho das técnicas variou de acordo com o parasito testado. Por exemplo, os métodos de coloração ZN e AR foram significativamente melhores, detectando número maior de oocistos de *Cryptosporidium*, do que SF. Por outro lado, não

houve diferença significativa entre os métodos para identificação de oocistos de *I. belli*, embora o ZN tenha apresentado uma mediana maior de oocistos detectados.

Estudos anteriores relataram que a coloração de esfregaços fecais com safranina a quente foi mais sensível que os métodos baseados em carbofucsina (BAXBY; BLUNDELL; HART, 1984; KASHYAP et al., 2010). Além disso, a variação safranina-tricromo tem sido considerada um método simples, barato e fornece resultados similares àqueles específicos, distinguindo parasito de fungos e elementos fecais (PONCE; FLAHERTY; ZDERO, 1999). Entretanto, este método, recomendado para *Cyclospora*, não é amplamente usado para *Cryptosporidium* porque oocistos podem não corar apropriadamente (MOODLEY et al., 1991; VIVESVARA et al., 1997; ABD-EL-WAHED, 1999; TULI et al., 2010). A coloração de safranina é realizada por aquecimento da solução corante sobre o esfregaço até fervura. Este procedimento pode não corar uniformemente os oocistos e pode induzir a precipitação de resíduos de corante sobre o esfregaço, devido à evaporação da solução. Em nosso estudo, a técnica de coloração SF revelou muitos artefatos nos esfregaços fecais, precipitado de corante e coloração de fundo ruim, dificultando a visualização dos oocistos.

Alguns estudos comparando a sensibilidade do ZN com outros métodos, tais como epifluorescência e enzima imunoensaio não mostraram diferenças significantes no diagnóstico de *Cryptosporidium* (KEHL; CICIRELLO; HAVENS, 1995; IGNATIUS et al., 1997b; WEITZEL et al., 2006; BROOK et al., 2008; JAYASLAKSHMI; APPALARAJU; MAHADEVAN, 2008). Rigo e Franco (2002) compararam as técnicas de coloração ZN e AFT (acid-fast trichrome), em que o método ZN detectou 100%, enquanto o método AFT detectou apenas 42% das amostras positivas, reforçando a maior sensibilidade do método ZN frente a outros métodos de coloração. Por outro lado, a auramina tem sido usada em substituição a carbofucsina, devido à fácil avaliação dos esfregaços em baixo poder de resolução (HANSCHIED; CRISTINO; SALGADO, 2008). Apesar do bom desempenho da coloração AR, também observado nesse estudo, para análise de amostras fecais, o exame microscópico com coloração de ZN é atualmente visto como um método mais rápido e barato para diagnóstico de *Cryptosporidium* e *I. belli* em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (IGNATUS et al., 1997a; MAGI et al., 2006; BROOK et al., 2008; TULI et al., 2010). Além de fácil execução, a coloração por ZN necessita apenas de microscópio óptico para leitura dos esfregaços e permite o arquivamento da lâmina corada, enquanto que o método da AR requer um microscópio com luz UV, nem sempre disponível em laboratórios de análises clínicas de pequeno porte, e as lâminas coradas devem ser lidas em no máximo 2 horas,

não permitindo arquivamento das mesmas (BROOK et al., 2008). Além disso, em nosso estudo, o método ZN detectou significativamente mais oocistos de *Cryptosporidium* ($p=0,03$) em amostras com baixa carga parasitária quando comparado com AR e SF.

Neste trabalho, a coloração pela AR para o *Cryptosporidium* apresentou melhor qualidade microscópica, tendo classificação como método superior em todos os esfregaços fecais. Os esfregaços corados por essa técnica apresentaram pouca ou nenhuma impureza, sendo que apenas o parasito apresentava-se fluorescente, contrastando com a técnica SF, em que foram observados outros detritos fecais corados inespecificamente, com tamanho e formas semelhantes aos oocistos de *Cryptosporidium*. Qualitativamente, a coloração de ZN foi a segunda mais bem pontuada para a identificação de *Cryptosporidium* e *I. belli*. Já o método SF foi o mais inferior, apresentando pontos vermelho-alaranjados nos esfregaços devido a precipitados de corante, além da falta de uniformidade na coloração de oocistos, dificultando a identificação dos parasitos. A variação no padrão tintorial de oocistos, quando corados por ZN ou SF, já foi relatada anteriormente (ELLIOT; MORGAN; THOMPSON, 1999; HARRINGTON, 2009; BROOK et al., 2008). Oocistos de *I. belli* também podem ser detectados por epifluorescência ou com lugol (BIALEK et al., 2002; PEREIRA et al., 2009). Entretanto, o primeiro necessita de um microscópio de luz UV e o último é menos sensível que os métodos de coloração devido a parede fina e frágil do oocisto de *I. belli*, que pode ser encoberto por outros elementos fecais, dificultando o diagnóstico (LINDSAY; DUBEY; BLAGBURN, 1997; PEREIRA et al., 2009).

Muitos estudos que avaliam a eficiência de métodos para o diagnóstico de *Cryptosporidium* usam a estratégia de contaminação de amostras fecais com oocistos purificados ou por divisão de uma única amostra fecal positiva para testar diferentes técnicas (WEBER et al., 1991; WEBER; BRYAN; JURANEK, 1992; KUCZYNSKA; SHELTON, 1999; KVIC et al., 2003). Essas abordagens desconsideram as diferenças na composição das fezes ou mesmo a natureza do coccídeo isolado. Diferentes parasitos apresentam requisitos específicos para concentração ou coloração dos oocistos, como observado nesse estudo com as amostras de *Cryptosporidium* e *I. belli*. Uma peculiaridade de nosso estudo foi a utilização de fezes de diferentes pacientes, reproduzindo o que acontece em um laboratório clínico de rotina. Além disso, a padronização de um protocolo de processamento de fezes que permita a identificação de ambos os parasitos, pode ser essencial para avaliação parasitológica de indivíduos imunocomprometidos, particularmente aqueles infectados com HIV.

Os dados aqui descritos sugerem que no diagnóstico de rotina de coccídeos em amostras fecais, a sedimentação por centrifugação deve ser utilizada como método de concentração de oocistos ao invés do FE, devido a problemas como perda de oocistos no anel de detritos gordurosos e presença de oocistos descorados nos esfregaços. Esses critérios devem ser observados cuidadosamente, principalmente considerando-se indivíduos assintomáticos que eliminam poucos oocistos nas fezes. Alternativamente, devido a melhor qualidade dos esfregaços fecais concentrados pelo FE, as lâminas podem ser preparadas usando tanto sedimento fecal quanto o anel de detritos gordurosos, para evitar resultados falso-negativos. Além disso, analisando o conjunto de resultados, propomos que o método de concentração de oocistos por SC, seguido da coloração de ZN, podem ser usados como uma ferramenta diagnóstica na rotina em laboratórios clínicos para identificação de *Cryptosporidium* e *I. belli*, reduzindo custos, bem como o tempo para detectar simultaneamente os dois enteroparasitas mais frequentes em pacientes com HIV/AIDS.

Apesar do amplo uso de técnicas parasitológicas para detecção microscópica de *Cryptosporidium*, esses métodos apresentam a desvantagem de necessitarem de um microscopista experiente para a identificação morfológica dos oocistos desse protozoário. Além disso, as amostras são testadas uma de cada vez e alguns relatos apontam uma baixa sensibilidade diagnóstica (IGNATIUS et al., 1997a; JAYALAKSHMI; APPALARAJU; MAHADEVAN, 2008). A utilização de imunoenaios enzimáticos (ELISA) com alta sensibilidade e especificidade para o coprodiagnóstico de antígeno de *Cryptosporidium*, que independem da detecção morfológica dos oocistos nas fezes, oferecem uma alternativa diagnóstica aos métodos microscópicos (JAYALAKSHMI; APPALARAJU; MAHADEVAN, 2008; COLLINET-ADLER; WARD, 2010).

Em nosso estudo utilizamos a técnica microscópica (SC, seguida por coloração de ZN) e pesquisa de coproantígeno por ELISA para detecção de *Cryptosporidium* em 626 amostras fecais de diversos grupos de crianças. Considerando os resultados da microscopia e do ELISA, foi observada a frequência geral de 2,6% para *Cryptosporidium*. A ocorrência do parasito por grupo foi maior em crianças com diarreia (4,4%), seguida por crianças HIV positivas (3,3%). A menor frequência observada de *Cryptosporidium* foi em crianças saudáveis de creche (1,1%). Lander et al. (2012) analisaram 325 amostras de fezes de crianças de creche de Salvador, Bahia, e encontrou uma frequência de *Cryptosporidium* de 0,3%. Estudos realizados no Brasil demonstraram a maior prevalência de *Cryptosporidium* na faixa etária de 0-5 anos de idade, com frequências variando de 2-10% em crianças com quadro

diarreico (MEDEIROS et al., 2001; CARVALHO-COSTA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2009), sendo considerado, portanto um importante agente etiológico da diarreia infantil.

Considerando o método microscópico como padrão-ouro, a sensibilidade e especificidade do ELISA encontrada no nosso estudo foi 85,7% e 99,7%, respectivamente. Vários estudos compararam diversos kits de ELISA com microscopia para detecção de *Cryptosporidium*, principalmente com a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen. Jayalaskhmi; Appalaraju e Mahadevan (2008) analisaram 89 amostras de fezes, obtidas de pacientes HIV positivos com diarreia, através do ELISA (RIDAscreen *Cryptosporidium*), tendo como padrão-ouro a coloração de Ziehl-Neelsen modificado, identificando 12,4% (n=11) amostras positivas para *Cryptosporidium*. A sensibilidade e especificidade do ELISA foi de 90,9% e 98,7%, respectivamente. Elgun e Koltas (2011) analisaram 157 amostras de fezes de pacientes com diarreia através do ELISA e a coloração Ziehl-Neelsen modificado. O ELISA detectou 24,03% das amostras como positivas, enquanto a coloração Ziehl Neelsen modificado detectou como positiva apenas 5,2% das amostras. O ELISA teve uma sensibilidade de 100% e especificidade de 80,1%. Baveja (1998) examinou por coloração de Ziehl-Neelsen e ELISA (ELI-WFLL CRYPTO) 216 amostras de fezes para pesquisa de *Cryptosporidium*, considerando o ZN como padrão-ouro, o ELISA foi 100% sensível e 90,07% específico. Marques et al. (2005) examinaram 94 amostras de fezes de pacientes portadores de HIV por coloração de Ziehl-Neelsen modificado e ELISA (Alexon, Inc., BIOBRAS), a sensibilidade e especificidade do método imunológico foi de 100% e 96%, respectivamente. Geurden et al. (2008) utilizou o mesmo kit de ELISA usado neste estudo para pesquisa de antígeno de *Cryptosporidium* em amostras fecais de bezerro, e obteve uma sensibilidade e especificidade de 95,4% e 92,7%, respectivamente.

Em nosso estudo, analisamos 626 amostras fecais de diferentes grupos de indivíduos, com e sem diarreia, e utilizamos o kit de ELISA da TechLab. A sensibilidade e especificidade podem variar de acordo o kit utilizado, mas não parece existir diferenças significativas entre os kits de pesquisa de coproantígeno de *Cryptosporidium*, sendo todos altamente sensíveis e específicos para o diagnóstico deste coccídeo (GARCIA; SHIMIZU, 1997). Por outro lado, embora o método de pesquisa de coproantígeno por ELISA seja altamente sensível e específico para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, outros estudos comparando várias técnicas diagnósticas mostram que não há diferença na sensibilidade e especificidade entre os métodos de detecção microscópica de oocistos e o ELISA (KEHL; CICIRELLO; HAVENS, 1995; IGNATIUS et al., 1997a). Em nosso estudo, tanto o método

de ELISA quanto o microscópico detectaram 14 amostras positivas, mas com algumas discordâncias entre estes. O ELISA não detectou duas amostras que foram diagnosticada através da microscopia. De fato, o uso de testes imunológicos para pesquisa de antígeno nas fezes deve levar em conta algumas considerações. Primeiro, o desempenho diagnóstico de muitos kits comerciais é frequentemente baseado em testes de amostras diarreicas de pacientes clínicos. Amostras de carreadores assintomáticos, eliminando baixa quantidade de oocistos de *Cryptosporidium*, podem cair abaixo do limite diagnóstico dessas técnicas. Segundo, ensaios comerciais dependem de anticorpos geralmente direcionados contra epítomos específicos, a não acessibilidade ou reconhecimento desta região, ou mesmo degradação do antígeno pode resultar em falso-negativo (JAYALAKSHMI; APPALARAJU; MAHADEVAN, 2008; CARDONA et al., 2011). Por outro lado, resultados falso-positivos em métodos de ELISA também têm sido relatados (DOING et al., 1999), e em nosso estudo detectamos duas amostras positivas no ELISA, mas negativas no método microscópico. Além disso, dos nove isolados de *Cryptosporidium* disponíveis em nosso laboratório, e que também foram analisados por ZN e ELISA, um isolado, Q272, apresentou resultado discordante entre os métodos.

Para solucionar essas discordâncias entre o método microscópico e a pesquisa de antígeno por ELISA, o ideal seria utilizar um terceiro método diagnóstico, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para confirmar o resultado, uma vez que resultados falso-positivos e falso-negativos no ELISA são preocupantes, e podem levar a uma abordagem terapêutica errônea.

Para a PCR dos isolados de *Cryptosporidium* selecionamos os genes 18S rRNA e COWP como alvos para as Nested-PCRs. Esses genes são amplamente utilizados em trabalhos que empregam técnicas de PCR e suas modificações. Em estudo no qual comparam a sensibilidade de vários pares de iniciadores tendo como alvo diferentes regiões do genoma de *Cryptosporidium*, Sulaiman; Xiao e Lal (1999), observaram que os iniciadores para amplificação do gene 18S rRNA, construído por Xiao et al. (1999a), e usado em nosso estudo, foi mais sensível, detectando entre 10000 a 1 oocistos em Nested-PCR, comparado a outros iniciadores aplicados para o mesmo genes. Neste mesmo estudo, a PCR do gene COWP, usando os iniciadores de Spano et al. (1997a), o mesmo usado em nosso estudo, teve alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. (SULAIMAN; XIAO; LAL, 1999). A realização da PCR de todas as amostras positivas permitiu avaliar as discordâncias entre os resultados do exame parasitológico e do ELISA.

Estudos comparando técnicas diagnósticas como ZN, ELISA e PCR, para a detecção de *Cryptosporidium* ainda são escassos. Nesse estudo, nós comparamos o diagnóstico microscópico por coloração de ZN com a pesquisa de antígenos nas fezes por ELISA, e esses forneceram alguns resultados conflitantes, sendo necessário um terceiro método, a PCR, para esclarecer as discordâncias. As amostras Q272 e C181, positivas no ELISA, mas negativa no método microscópico por coloração ZN, amplificaram por PCR pelo menos um dos genes analisados, mostrando que essas amostras eram verdadeiramente positivas, pois continha DNA de *Cryptosporidium*, evidenciando a melhor sensibilidade do ELISA quando comparado ao método ZN. Resultados positivos no ELISA e negativos na microscopia podem ser decorrentes da baixa eliminação do parasito pelo hospedeiro, ausência de oocistos inteiros ou com a integridade morfológica comprometida (UNGAR, 1990; JAYALAKSHMI; APPALARAJU; MAHADEVAN, 2008). Por outro lado, as amostras C13 e B35, que foram positivas no método microscópico e negativas no ELISA, amplificaram por PCR, mostrando que, nessas amostras, o ELISA falhou na detecção de antígenos do parasito. Esta falha pode ser devido a não acessibilidade ou reconhecimento do antígeno pelo anticorpo monoclonal, ou mesmo degradação desse antígeno (UNGAR, 1990; JAYALAKSHMI; APPALARAJU; MAHADEVAN, 2008). Apesar da alta eficiência da PCR, as amostras Q285 e A17, positiva para *Cryptosporidium* em pelo menos um dos métodos diagnósticos, não apresentou amplificação de nenhum dos genes analisados, provavelmente devido à presença de inibidores da DNA polimerase presentes nas fezes ou mesmo degradação ou mutações do DNA, que podem impedir a amplificação do gene-alvo (SLUTER; TZIPORI; WIDMER, 1997).

Apesar de bastante utilizados na rotina diagnóstica, os métodos parasitológico e o ELISA não permitem a diferenciação das espécies de *Cryptosporidium*, o que é importante para entendimento do perfil epidemiológico e transmissão desse parasito (FAYER, 2010; XIAO, 2010). Assim, um dos objetivos desse estudo foi realizar a genotipagem por nested-PCR/RFLP dos isolados de *Cryptosporidium*, a fim de determinar a espécie mais prevalente em nosso meio. Nesta parte do estudo, além dos 16 isolados de *Cryptosporidium* obtidos dos diversos grupos de crianças, foram incluídos nove isolados disponíveis no nosso laboratório, proveniente de outros estudos, destes, sete eram de crianças saudáveis e dois de adultos com HIV. Todos esses isolados foram analisados por coloração de ZN e por ELISA para pesquisa de coproantígeno de *Cryptosporidium*.

Pouco é conhecido sobre a circulação e os padrões de transmissão da criptosporidiose nos países em desenvolvimento. A aplicação de caracterização genética de *Cryptosporidium*

na epidemiologia molecular pode levar a abordagens mais racionais de controle da doença. No Brasil existem poucos estudos que determinam as espécies de *Cryptosporidium*, e nosso estudo é o primeiro realizado no Estado da Bahia.

Diferente de outros estudos que mostram que a amplificação do gene 18S rRNA por nested-PCR é mais eficiente que o gene COWP (LLORENTE et al., 2007), em nosso estudo as nested-PCRs de ambos os genes tiveram a mesma eficiência de amplificação de 84% (21/25). Porém, a eficiência total de amplificação de ambos os locus analisados foi de 92% (23/25). Neste trabalho a espécie mais prevalente, considerando os resultados de ambos os loci, foi *C. hominis*, encontrado como única espécie presente em 78,3% (20/23), e em provável mistura com *C. felis* em 8,7% (2/23), sugerindo que a transmissão antroponótica de *Cryptosporidium* é mais prevalente em nosso meio. Este dado está em concordância com outros resultados publicados no Brasil. Em estudo realizado no Rio de Janeiro, 1197 amostras fecais de crianças foram analisadas por PCR em tempo real, a frequência de *Cryptosporidium* foi 3,2% (38/1197), e *C. hominis* foi a espécie mais prevalente (73,7%) (ROLANDO et al., 2012). Em um estudo realizado com pacientes portadores de HIV em São Paulo, de 27 isolados, 17 (63%) foram caracterizados como *C. hominis*, 4 (14,8%) *C. parvum*, 5 (18,5%) *C. felis* e um (3,7%) *C. canis* (LUCCA et al., 2009). Em Fortaleza (Ceará) a diferença entre *C. hominis* e *C. parvum* foi menor, de 42 isolados de *Cryptosporidium* em crianças de uma favela urbana, 24 (57,1%) foram caracterizados como *C. hominis* e 18 (42,9%) como *C. parvum* (BUSHEN et al., 2007).

Inúmeros estudos mostram que em casos de criptosporidiose humana, *C. hominis* predomina em nações industrializadas, tais como Austrália (O'BRIEN; McINNES; RYAN, 2008; WALDRON et al., 2011), Holanda (WIELINGA et al., 2008), Japão (YAGITA et al., 2001), Espanha (LLORENTE et al., 2007), e em países em desenvolvimento, como Peru (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2007), Índia (DAS et al., 2006; SHARMA et al., 2013); África do Sul (SAMRA et al., 2013) e Egito (ABD EL KADER et al., 2012) mostrando que a espécie antroponótica é o principal agente da criptosporidiose humana. Entretanto, em outros países o *C. parvum* predomina, como no Canadá (BUDU-AMOAKO et al., 2012) e na França (The ANOFEL *Cryptosporidium* National Network, 2010). Em nosso estudo, apenas um isolado (4,8%) que amplificou por PCR foi identificado como *C. parvum*. Este dado está de acordo com vários estudos que mostram baixa prevalência desta espécie em países em desenvolvimento e industrializados. A espécie *C. parvum* pode infectar inúmeros hospedeiros mamíferos além do humano, sendo o gado bovino um dos principais. Assim essa espécie está

relacionada transmissão zoonótica do parasito. A transmissão direta de *C. parvum* de animais a humanos é bem documentada, e estudos de epidemiologia molecular indicam que a proporção de infecções por *C. parvum* em humanos é muito maior em áreas rurais que em urbanas (LEARMONTH et al., 2004; LLORENT et al., 2007; NG et al., 2012). A maioria da população do nosso estudo é de área urbana de Salvador e região metropolitana, o que justifica a baixa frequência de *C. parvum*. Inclusive, o isolado identificado como *C. parvum* em nosso estudo foi oriundo de uma criança que vivia em uma cidade do interior da Bahia, onde atividades e contato com animais de fazenda são comuns na população em geral. Porém, não podemos concluir que este isolado de *C. parvum* foi proveniente de uma transmissão zoonótica. Atualmente, sabe-se que existem diversos subtipos dessa espécie, sendo que alguns deles estão relacionados à transmissão zoonótica e outros são apenas encontrados em humanos, sendo relacionados à transmissão antroponótica (FAYER, 2010; XIAO, 2010). Mais estudos são necessários para avaliar o perfil de transmissão deste coccídeo em nossa população.

C. hominis e *C. parvum* são responsáveis por cerca de 90% dos casos de criptosporidiose humana. Entretanto, outras espécies ou genótipos de *Cryptosporidium*, tais como, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. canis*, *C. felis*, *C. suis* e *C. andersoni*, podem infectar humanos, especialmente pacientes imunocomprometidos e crianças (CIELOSZYK et al., 2012). Desde 1999, quando Pieniazek et al. descreveram os três primeiros casos de infecção por *C. felis* em pacientes HIV positivos, vários estudos têm confirmado que esta espécie pode infectar humanos (XIAO et al., 2001; LUCCA et al., 2009; CIELOSZYK et al., 2012).

Em quatro isolados do nosso estudo (17,4%), a análise de RFLP do fragmento do gene 18S rRNA mostrou um perfil distinto de *C. parvum* e *C. hominis* e consistente com padrões publicados para *C. felis*. Após digestão com *SspI* observou-se padrão de bandas de 426 e 390pb, consistente com dados publicados para *C. felis* (XIAO et al., 1999b; XIAO et al., 2001; JIANG; XIAO, 2003). De acordo com Huber (2007), *C. felis* pode ser seguramente diagnosticado com a digestão pela enzima *SspI*, possuindo padrão de corte que a diferencia das demais espécies deste gênero. Por outro lado, em nosso estudo, após a digestão com enzima *VspI*, esses isolados apresentaram reação incompleta, observando-se bandas relativamente fracas em 476, 184 e 104pb, em acordo com o padrão de bandas já publicado na literatura (XIAO et al., 1999b; XIAO et al., 2001; JIANG; XIAO, 2003). Reação incompleta com enzima *VspI* em isolados de *C. felis* já foi observado em outros estudos (XIAO et al., 1999b; GRECA, 2010), e todos confirmaram a presença de *C. felis* por sequenciamento. Em

casos de detecção de espécies não *C. parvum* e não *C. hominis*, o ideal é realizar o sequenciamento para confirmação, porém este tipo de análise não foi realizada em nosso estudo. Entretanto, diversos trabalhos mostram que isolados de *C. felis* com mesmo padrão de digestão aqui observado foram confirmados por sequenciamento do gene 18S rRNA (XIAO et al., 1999b; GRECA, 2010).

C. felis é uma espécie que tem como principal hospedeiro o gato doméstico. No Brasil, a prevalência de *C. felis* em gatos varia de 3,9% (COELHO et al., 2009) a 14,44% (GENNARI et al., 1999). *C. felis* já foi identificada em pacientes com AIDS no Brasil (LUCCA et al., 2009) e em crianças imunocompetentes no Peru (XIAO et al., 2001) e na Índia (DAS et al., 2006). A rota de transmissão para espécies não usuais de *Cryptosporidium* não está clara. Devido a infecção humana por espécies não *C. parvum* e não *C. hominis* serem menos comuns, a principal rota de transmissão deste parasito provavelmente é através de contato direto com animais infectados (MATOS et al., 2004). Em nosso estudo não temos dados de contatos desses pacientes com animais. Gatos domésticos são encontrados em muitas residências sem evidência de criptosporidiose humana, portanto, é difícil atribuir a infecção ocasional por *C. felis* ao contato direto com gatos, entretanto a alta prevalência desta espécie em nosso estudo enfatiza a importância deste animal na transmissão de *Cryptosporidium* para criança e a necessidade de estudos epidemiológicos cuidadosos para elucidar as rotas de transmissão de infecções com espécies não usuais de *Cryptosporidium*.

Algumas discordâncias foram também observadas na amplificação dos diferentes genes de *Cryptosporidium*, duas amostras, B35 e C181, que amplificaram o gene COWP, não apresentaram amplicons após nested-PCR do gene 18S rRNA, bem como as amostras R02 e L02, amplificaram o gene 18S rRNA, mas não o COWP. Vários estudos utilizam esses dois genes para genotipagem de *Cryptosporidium*, e alguns encontraram resultados discordantes, tanto em relação a eficiência na amplificação, quanto às espécies identificadas (GONÇALVES et al., 2006; TROTZ-WILLIAMS et al., 2006). Inclusive, em nosso estudo, as amostras R02 e L02 que amplificaram apenas o gene 18S rRNA, foram identificadas como *C. felis*. Análise por RFLP do gene COWP permite a diferenciação apenas entre as espécies *C. hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis*, enquanto que, apenas a análise do polimorfismo do gene 18S rRNA permite diferenciar outras espécies de *Cryptosporidium*, como *C. felis*, *C. muris* e *C. canis* (SULAIMAN; XIAO; LAL, 1999; JIANG; XIAO, 2003; XIAO, 2010). Esses fatores realçam a importância da utilização de mais de um gene para genotipagem desse coccídeo. A análise genética de vários loci por PCR ou sequenciamento é recomendado, uma

vez que os genes utilizados como marcadores podem sofrer mutações, o que eventualmente pode produzir resultados aleatórios e ambíguos.

Nas amostras que amplificaram ambos os genes não foram observadas discordâncias entre as espécies identificadas, exceto nas amostras C71 e C72, que apresentaram perfil de *C. hominis* após RFLP do gene COWP, e foram identificadas como *C. felis* após análise do polimorfismo do fragmento do gene 18S rRNA. Esses isolados provavelmente representam mistura de espécies de *Cryptosporidium*, como já relatado em outros estudos (LEONE et al., 2006; RUCCKER et al., 2011). Mais estudos devem ser realizados para maior entendimento da dinâmica de transmissão e da epidemiologia da criptosporidiose humana em nossa região.

7. CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo nos permitem as seguintes conclusões:

- O método de concentração de fezes SC, seguido da coloração ZN, são eficientes na identificação de oocistos tanto de *Cryptosporidium*, quanto de *Isospora belli*, em amostras fecais. Esses métodos podem ser utilizados no protocolo de rotina de laboratórios clínicos para diagnóstico simultâneo dos dois coccídeos oportunistas mais frequentes em imunocomprometidos.
- A pesquisa de coproantígeno por ELISA para identificação de *Cryptosporidium* apresenta elevadas sensibilidade e especificidade. Positividade em apenas uma das técnicas diagnósticas pode ser observada, sendo necessário o uso de um terceiro método para avaliar resultados conflitantes.
- A amplificação de genes-alvos do *Cryptosporidium* por PCR em amostras fecais é uma alternativa para confirmar resultados discordantes entre a microscopia e o ELISA.
- A espécie de *Cryptosporidium* mais frequente foi *C. hominis*, sugerindo que a transmissão antroponótica desse coccídeo é a mais prevalente em nosso meio.

REFERÊNCIAS

- ABD EL KADER, N. M. et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in human patients in Cairo, Egypt. **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 161-166, 2012.
- ABD-EL-WAHED, M. M. *Cryptosporidium* infection among sheep in Qalubia Governorate, Egypt. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, v. 29, n. 1, p. 113-118, 1999.
- ABDO, A. et al. Reversible sclerosing cholangitis secondary to cryptosporidiosis in a renal transplant patient. **Journal of Hepatology**, v. 38, n. 5, p. 688-691, 2003.
- ABUBAKAR, I. et al. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 387-393, 2007.
- AGNAMEY, P. et al. Childhood Cryptosporidiosis: A Case Report. **Journal of Parasitology Research**, p. 1-3, 2010a.
- AGNAMEY, P. et al. *Cryptosporidium hominis* and *Isospora belli* diarrhea in travelers returning from West Africa. **Journal of Travel Medicine**, v. 17, n. 2, p. 141-142, 2010b.
- ALEMU, A. et al. Opportunistic and other intestinal parasites among HIV/AIDS patients attending Gambi higher clinic in Bahir Dar city, North West Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 8, p. 661-665, 2011.
- AMADI, B. et al. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 360, n. 2, p. 1375-1380, 2002.
- _____. High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian Children: a randomized controlled trial. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 195, p. 1-7, 2009.
- ARAÚJO, R. S. et al. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in São Paulo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p. 824-838, 2011.

ASSEFA, S. et al. Intestinal parasitic infections in relation to HIV/AIDS status, diarrhea and CD4 T-cell count. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 155-160, 2009.

BACHUR, T. P. R. et al. Enteric parasitic infectious in HIV/AIDS patients before and after the highly active antiretroviral therapy. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 115-122, 2008.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of world outbreaks – an update 2004-2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603-6614, 2011.

BAVEJA, U. K. Acid fast staining versus ELISA for detection of *Cryptosporidium* in stool. **The Journal of Communicable Diseases**, v. 30, n. 4, p. 241-244, 1998.

BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C. A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **The Journal of Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 317–323, 1984.

BIALEK, R. et al. Comparison of autofluorescence and iodine staining for detection of *Isospora belli* in feces. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 3, p. 304-305, 2002.

BLACKBURN, B. G. et al. Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 684-686, 2006.

BORAD, A.; WARD, H. Human immune responses in cryptosporidiosis. **Future Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 507-519, 2010.

BOYLES, T. H. et al. Failure to eradicate *Isospora belli* diarrhea despite immune reconstitution in adults with HIV: a cases series. **PlosOne**, v. 7, n. 8, p. 1-4, 2012.

BOX, E. D. et al. Ultrastructure of *Sarcocystis* sporocysts from passerine birds and opossums: Comments on classification of the genus *Isospora*. **Journal of Parasitology**, v. 66, n. 1, p. 68-74, 1980.

BRADY, M. T. et al. Declines in mortality rates and changes in causes of death in HIV-1-infected children during the HAART era. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 53, n. 1, p. 86-94, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dez. de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Brasília, MS, 2011.

BROOK, E. J. *et al.* Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 26-31, 2008.

BUDU-AMOAKO, E. *et al.* Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* in humans on Price Edward Island, Canada: evidence of zoonotic transmission from cattle. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. 6, p. 424-433, 2012.

BUSHEN, O. Y. *et al.* Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 378-384, 2007.

CABADA, M. M.; WHITE JUNIOR, A. C. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 494-499, 2010.

CABELLO, R. R. *et al.* Nitazoxanida for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 6, p. 701-703, 1997.

CACCIÓ, S. M. *et al.* Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 8, n. 1, p. 85-86, 2002.

_____. A rare *Cryptosporidium parvum* genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1, p. 128-131, 2013.

CAMA, V. A. *et al.* Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 5, p. 684-691, 2007.

CAPET, C. *et al.* *Cryptosporidium parvum* infection in suckling rats: impairment of mucosal permeability and Na⁺-glucose co-transport. **Experimental Parasitology**, v. 91, n. 2, p. 119-125, 1999.

CARDONA, G. A. *et al.* Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. **Science of the Total Environment**, v. 412-413, n. 15, p. 101-108, 2011

CARDOSO, L. V. et al. Enteric parasites in HIV-1/AIDS infected patients from a Northwestern São Paulo reference unit in the highly active antiretroviral therapy era. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 665-669, 2011.

CARRENO, R. A. et al. Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 184-188, 1998.

CARVALHO, T. B. de; CARVALHO, L. R. de; MASCARINI, L. M. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. **Revista do Instituto Brasileiro de Medicina Tropical São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 269-273, 2006.

CARVALHO-COSTA, F. A. et al Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 346-348, 2007.

CASEMORE, D. P.; ARMSTRONG, M.; SANDS, R. L. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 38, n. 12, p. 1337-1341, 1985.

CASEMORE, D. P. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 44, n. 6, p. 445-451, 1991.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Parasite: Cystoisosporiasis (formerly know as Isosporiasis). Disponível em: < <http://www.cdc.gov/parasites/cystoisospora/biology.html>>. Acesso em: 10 mai. 2012.

CHALMERS, R. M. et al. Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. **Eurosurveillance**, v. 14, n. 2, p. 1-9, 2009.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 138-146, 2010.

CHEN, X. M. et al. *Cryptosporidium parvum* is cytopathic for cultured human biliary epithelia via an apoptotic mechanism. **Hepatology**, v. 28, n. 4, p. 906-913, 1998.

_____. *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. **American Journal of Physiology**, v. 277, n. 3, p. G599-608, 1999.

_____. Cryptosporidiosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 22, p. 1723-1731, 2002.

CIELOSZYK, J. et al. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 9, p. 549-551, 2012.

CLARK, D. P.; SEARS, C. L. The pathogens of cryptosporidiosis. **Parasitology Today**, v. 12, p. 221-225, 1996.

COELHO, W. M. D. et al. Ocorrência de parasitos gastrointestinais em amostras fecais de felinos do município de Andradina, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 46-49, 2009.

COLLINET-ADLER, S.; WARD, H. D. Cryptosporidiosis: environmental, therapeutic, and preventive challenges. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 8, p. 927-935, 2010.

DAS, P. et al. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. from children in Kolkata, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4246-4249, 2006.

DASSOPOULOS, T.; EHRENPREIS, E. D. Acute pancreatitis in human immunodeficiency virus-infected patients: a review. **The American Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 78-84, 1999.

DEL COCO, V. F.; CÓRDOBA, M. A.; BASUALDO, J. A. Criptosporidiosis: uma zoonosis emergente. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 41, n. 3, p. 185-196, 2009.

DEMARCHI, I. G. et al. Activity of antiretroviral drugs in humans infections by opportunistic agents. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1, 2012.

DESPORTES-LIVAGE, I.; DATRY, A. Infections à microsporidies, *Isospora* et *Sarcocystis*. **EMC-Maladies Infectieuses**, v. 2, n.4, p. 178-196, 2005.

DOBDEL, C. A revision of the *Coccidia* parasitic in Man. **Parasitology**, v. 11, n. 2, p. 147, 1919.

DOING, K. M. et al. False-positive results obtained with the Alexon ProSpecT *Cryptosporidium* enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1582-1583, 1999.

ELGUN, G.; KOLTAS, I. S. Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. **Parasitology Research**, v. 108, n. 2, p. 395-397, 2011.

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Improved staining method for detection *Cryptosporidium* oocysts in stool using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 139-142, 1999.

ELWIN, K. et al. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 7, p. 675-682, 2012.

ESCOBEDO, A. A. et al. Treatment of intestinal protozoan infections in children. **Archives of Disease in Childhood**, v. 94, n. 6, p. 478-482, 2009.

ESSID, R. et al. Identification of *Cryptosporidium* species infecting human in Tunisia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 702-705, 2008.

FAYER, R; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 13, p. 1305-1322, 2000.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, V. 124, n. 1, p. 90-97, 2010.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANSTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 2, p. 109-111, 2001.

FRANZEN, C. et al. Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isoospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. **Parasitology Research**, v. 86, n. 8, p. 669-676, 2000.

FRENKEL, J. K. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. **Journal of Parasitology**, v. 63, p. 611-628, 1977.

FRENKEL, J.K. et al. Presença extra-intestinal de cistos unizóicos de *Isospora belli* em paciente com SIDA. Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n. 6, p. 409-412, 2003.

GARCIA, F. G. **Identificação do perfil de citocinas, quimiocinas e receptores Toll envolvidos na resposta imunológica in vitro à *Cystoisospora belli***. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2010.

GARCIA, L. S. et al. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 185-190, 1983.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1526-1529, 1997.

GARLIPP, C. R.; BOTTINI, P. V.; TEIXEIRA, A. T. L. S. The relevance of laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis and other coccidia. **Revista do Instituto Brasileiro de Medicina Tropical São Paulo**, v. 37, n. 5, p. 467-469, 1995.

GENNARI, S. M. et al. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.

GEURDEN, T. et al. A Bayesian evaluation of four immunological assays for the diagnosis of clinical cryptosporidiosis in calves. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 3, p. 400-402, 2008.

GONÇALVES, E. M. do N. et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, n. 2, p. 119-126, 2006.

GOODGAME, R. W et al. Intestinal function and injury in acquired immunodeficiency syndrome-related cryptosporidiosis. **Gastroenterology**, v. 108, n. 4, p. 1075-1082, 1995.

GOODGAME, R. W. Understanding Intestinal Spore-Forming Protozoa: *Cryptosporidia*, *Microsporidia*, *Isospora*, and *Cyclospora*. **Annals of Internal Medicine**, v. 124, n. 4, p. 429-441. 1996.

_____. Emerging causes of traveler's diarrhea: *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora* and *Microsporidia*. **Current Infectious Disease Reports**, v. 5, n. 1, p. 66-73, 2003.

GORMLEY, F. J. et al. A 17-year review of foodborne outbreaks: describing the continuing decline in England and Wales (1992-2008). **Epidemiology & Infection**, v. 139, n. 5, p. 688-699, 2011.

GRECA, M. de P. S. **Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e região metropolitana**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GUARINO, A. et al. Enterotoxic effect of stool supernatant of *Cryptosporidium*-infected calves on human jejunum. **Gastroenterology**, v. 106, n. 1, p. 28-34, 1994.

_____. Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 4, p. 976-983, 1995.

GUERRANT, D. I. et al. 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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 707-713, 1999.

GUPTA, S. et al. Chronic diarrhea in HIV patients: prevalence of coccidian parasites. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 172-175, 2008.

HACHICH, E. M. **Avaliação da presença de protozoários *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em águas captadas para consumo humano no Estado de São Paulo, São Paulo**. Tese de Doutorado –Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

HACHICH, E. M. et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 230-245, 2004.

HANSCHIED, T.; CRISTINO, J. M.; SALGADO, M. J. Screening of auramine-stained smears of all fecal samples is an inexpensive way to increase the detection of coccidial infections. **International of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 47-50, 2008.

HARRINGTON, B. J. Microscopy of 4 pathogenic enteric protozoan parasites: a review. **LabMedicine**, v. 39, n. 4, p. 231-238, 2008.

HARRINGTON, B. J. The staining of oocysts of *Cryptosporidium* with the fluorescent brighteners Uvitex 2B and calcofluor white. **LabMedicine**, v. 40, n. 4, p. 219-223, 2009.

HENRIKSEN, S.A; POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, n. 1, p. 594-596, 1981.

HUANG, D. B. et al. Cryptosporidiosis in children. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 253-259, 2004.

HUBER, F. **Caracterização genotípica e estudo filogenético de *Cryptosporidium* spp. obtidos de diferentes hospedeiros.** Tese de Doutorado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

HUBER, F.; BONFIM, T. C.; GOMES, R. S. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica e centrífugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp e oocistos de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 2, p. 135-137, 2003.

HUBER, F.; BONFIM, T. C.; GOMES, R.S. Comparação da eficiência da coloração pelo método da Safranina a quente e da técnica de centrífugo-flutuação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n.2, p. 81-84, 2004.

IGNATIUS, R. *et al.* Efficacy of different methods for detection of low *Cryptosporidium parvum* oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 732-736, 1997a.

IGNATIUS, R. *et al.* A new acid fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 446-449, 1997b.

INSULANDER, M. *et al.* An outbreak of cryptosporidiosis associated with exposure to swimming pool water. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p. 354-360, 2005.

IQBAL, J.; KHALID, N.; HIRA, O. R. Cryptosporidiosis in Kuwaiti children: association of clinical characteristics with *Cryptosporidium* species and subtypes. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, n. 5, p. 647-652, 2011.

JAYALAKSHIMI, J.; APPALARAJU, B.; MAHADEVAN, K. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens HIV/AIDS patients. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 137-138, 2008.

JEX, A. R. et al. *Cryptosporidium*: biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p. 304-317, 2008.

JIANG, J.; XIAO, L. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 542-547, 2003.

KASHYAP, B. et al. Efficiency of diagnostic methods for correlation between prevalence of enteric protozoan parasites and HIV/AIDS status - an experience of a tertiary care hospital in East Delhi. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 2, p. 63-67, 2010.

KASPER, M. R. et al. Diarrhea outbreak during U.S. military training in El Salvador. **PlosOne**, v. 7, n. 7, p. 1- 8, 2012.

KEHL, K. S. C.; CICIRELLO, H.; HAVENS, P. L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 416-418, 1995.

KELLY, P. et al. Paneth cell granule depletion in the human small intestine under infective and nutritional stress. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 135, n. 2, p. 303-309, 2004.

KLEIN, O. et al. Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonates calves. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n.1, p. 53-59, 2008.

KOSEK, M. et al. Cryptosporidiosis: an update. **THE LANCET Infectious Diseases**, v. 1, n.4, p. 262-269, 2001.

KUCZYNSKA, E.; SHELTON, D. R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2820-2826, 1999.

KULKARNI, S. V. et al. Opportunistic parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhea by level of immunosuppression. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, n. 1, p. 63-66, 2009.

KVAC, M. et al. Comparison of selected diagnostic methods for identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in routine examination of faeces. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 50, n. 8, p. 405 – 411, 2003.

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 94, n. 5, p. 611-613, 1999.

LANDER, R. L. et al. Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast Region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 28, n. 11, p. 2177-2188, 2012.

LEARMONTH, J. J. et al. Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3973-3978, 2004.

LE BLANCQ, S. M. et al. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 463-478, 1997.

LEITCH, G. J.; HE, Q. Cryptosporidiosis: an overview. **Journal of Biomedical Research**, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2012.

LEONE, A. et al. Detection of *Cryptosporidium* spp. from human faeces by PCR-RFLP, cloning and sequencing. **Parasitology Research**, v. 104, n. 3, p. 583-587, 2009.

LEVINE, N. D. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 35, n.4, p. 518-520. 1988.

LINDSAY, D. S. ; DUBEY, J. P. ; BLAGBURN, B. L. Biology of *Isospora* spp. from Humans, Nonhuman Primates, and Domestic Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 19-34, 1997.

LLORENTE, M. T. et al. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. **Parasitology International**, v. 56, n. 3, p. 201-205, 2007.

LUCCA, P. de et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from HIV infected patients from an urban area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 51, n. 6, p. 341-343, 2009.

MA, P.; SOAVE, R. Three-step, stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 147, n. 5, p.824-828, 1983.

MAC KENZIE, W. R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 3, p. 161-167, 1994.

MAGI, B. et al. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**, v. 98, n. 2, p. 150-152, 2006.

MALIK, S. et al. Refractory isosporiasis. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 72, n. 5, p. 437-440, 2005.

MANTOVANI, C.; ARAUJO, A. J. U. S.; KANAMURA, H. Y. Contaminação por *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em hortaliças comercializadas na cidade de Pindamonhangaba, SP. **Revista Saúde**, v. 4, esp. 1, p. 51, 2010.

MARQUES, F. R. et al. Performance of an immunoenzymatic assay for *Cryptosporidium* diagnosis of fecal samples. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 3-5, 2005.

MARSHALL, M. M. et al. Waterborne protozoan pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 67-85, 1997.

MATHIEU, E. L. S. et al. Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 582-589, 2004.

MATOS, O. et al. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in person with HIV, Portugal. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 10, n. 12, p. 2256-2257, 2004.

MATTSSON, J. G. et al. Molecular typing of *Cryptosporidium parvum* associated with a diarrhea outbreak identifies two sources of exposure. **Epidemiology & Infection**, v. 136, n. 8, p. 1147- 1152, 2008.

- McNABB, S. J. V. et al. Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* sp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 587-589, 1985.
- MEDEIROS, M. I. C. et al. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 21-24, 2001.
- MEISEL, J. L. et al. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v. 70, n. 6, p. 1156-1160, 1976.
- MELE, R. et al. Indinavir reduce *Cryptosporidium parvum* infection in both *in vitro* and *in vivo* models. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 757-764, 2003.
- MICHIELIS, L. A. et al. Intestinal and extraintestinal *Isospora belli* infection in an AIDS patient: a second case report. **Pathology Research and Practice**, v. 190, n. 11, p. 1089-1093, 1994.
- MOODLEY, D. et al. A comparative assessment of commonly employed staining procedures for the diagnosis of cryptosporidiosis. **South African Medical Journal**, v. 79, n. 6, p. 314-317, 1991.
- MOR, S. M. et al. Respiratory cryptosporidiosis in HIV-seronegative children in Uganda: potential for respiratory transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 10, p. 1366-1372, 2010.
- MOYO, S. J. et al. Age specific a etiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. **BMC Pediatrics**, v. 11, n. 19, p. 1-6, 2011.
- MTAMBO, M. M. A. et al. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1, p. 49-57, 1992.
- MULLER, A. et al. Detection of *Isospora belli* by polymerase chain reaction using primers based on small-subunit ribosomal RNA sequences. **European Journal of Clinical Microbiology & Infetious**, v. 19, n. 8, p. 631-634, 2000.
- MURO, A. et al. Infecciones por otros protozoos: criptosporidiosis, isosporosis, ciclosporosis, microsporidiosis y toxoplasmosis. **Medicine**, v. 10, n. 54, p. 3654-3663, 2010.

NASCIMENTO, W. R. C. do et al. Presença de *Cryptosporidium* spp em crianças com diarreia aguda em uma creche pública de Recife, Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 175-178, 2009.

NAVANEETHAN, U. et al. *Isoospora belli* superinfection in a patient with eosinophilic gastroenteritis – a diagnostic challenge. **Journal of Chron's and Colitis**, v. 6, n. 2, p. 236-239, 2012.

NEIRA-OTERO, P. O. et al. Infección por *Isoospora belli* em pacients com infección por VIH. Presentation de dos casos y revisión de la literatura. **Revista Chilena de Infectología**, v. 27, n. 3, p. 219-227, 2010.

NEL, E. D. et al. A retrospective study of cryptosporidial diarrhea in a region with high HIV prevalence. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 57, n. 4, p.289-292, 2011.

NEWMAN, R. D. et al. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in Northeast Brazil. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, n. 6, p. 500-505, 1994.

NEWMAN, R. D. et al. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 1, p. 167-175, 1999.

NG, J. S. Y. et al. Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in northern New South Wales. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 4, p. 437-441, 2012.

NIME, J.M. et al. Acute enterocolitis in a human being infected with protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, n. 4, p. 592-598, 1976.

NOOR, R. et al. Frequency of opportunistic and other intestinal parasitic infections in patients infected with human immunodeficiency virus in Bangladesh. **Tzu Chi Medical Journal**, v.24, n. 4, p. 191-195, 2012.

O'BRIEN, E.; McINNIS, L.; RYAN, U. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 118-121, 2008.

OJCIUS, D. M. et al. Caspase-dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 14, p. 1163-1168, 1999.

OLIVEIRA-SILVA, M. B. de et al. Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triângulo Mineiro region, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 512-515, 2007.

OLUSEGUN, A. F.; OKAKA, C. E.; MACHADO, R. L. D. Isosporiasis in HIV/AIDS patients in Edo State, Nigeria. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 43-46, 2009.

PALMIERI, F. et al. Pulmonary cryptosporidiosis in an AIDS patient: successful treatment with paromomycin plus azithromycin. **International Journal of STD and AIDS**, v. 16, n. 7, p. 515-517, 2005.

PANCIERA, R.; THAMASSEN, R.; GAMER, F. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v. 8, n. 1, p. 479-484, 1971.

PAVIE, J. et al. Prevalence of opportunistic intestinal parasitic infections among HIV-infected patients with low CD4 cells counts in France in the combination antiretroviral therapy era. **International of Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 677-679, 2012.

PEDRAZA-DIAZ, S. et al. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* “dog type” from patients in England. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 293-296, 2001a.

_____. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2001b.

PEREIRA, D. A. et al. *Isospora belli*: aspectos clínicos e diagnóstico laboratorial. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 4, p. 283-286, 2009.

PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, n. 1, p. 44-59, 2010.

PETERS, C. S. et al. Prevalence of enteric parasites in homosexual patients attending an outpatient clinic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 684-685, 1986.

PIENIAZEK, N. J. et al. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 5, n. 2, p. 444-449, 1999.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetics polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 4, p. 187-199, 2009.

POHJOLA, S. Negative staining method with nigrosin for the detection of cryptosporidial oocysts: a comparative study. **Research in Veterinary Science**, v. 36, n. 2, p. 217-219, 1984.

PONCE, P. de L.; FLAHERTY, P.; ZDERO, M. A new trichromic safranin stain for the detection of *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, species of Microsporidia and *Isospora belli* in fecal material. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 41, n. 4, p. 211-214, 1999.

PÔNKA, A. et al. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. **Eurosurveillance**, v. 14, n. 28, p. 1-3, 2009.

PUTIGNANI, L.; MENICHELIA, D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2010, n. 1, p. 1- 39, 2010.

QUIROZ, E. S. et al. An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 2, p. 695-700, 2000.

RAO, A. C. K. et al. Histology as a diagnostic tool for intestinal isosporiasis in immunocompromised patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n.3, p. 251-252, 2012.

RESENDE, D. V. et al. Polymorphism in the 18S rDNA gene of *Cystoisospora belli* and clinical features of cystoisosporosis in HIV-infected patients. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 679-685, 2011.

RIGO, C. R.; FRANCO, R. M. B. Comparação entre os métodos Ziehl-Neelsen modificada e Acid-fast-trichrome para pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 209-214, 2002.

ROCHA, L. G. da; SANTOS, T. de J. A dos. *Isospora belli* em lós pacientes com SIDA: Natal/Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 57, n. 3, p. 161-165, 2002.

ROLANDO, R. F. R. et al. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 107, n. 4, p. 476-479, 2012.

ROSSIGNOL, J. F. et al. A double-blind placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea in AIDS patients in Mexico. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 6, p. 663-666, 1998.

_____. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 1, p. 103-106, 2001.

_____. Effect of Nitazoxanide in diarrhea and enteritis caused by *Cryptosporidium* species. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 3, p. 320-324, 2006.

ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide in the treatment of acquired immune deficiency syndrome-related cryptosporidiosis: results of the United States compassionate use program in 365 patients. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 887-894, 2006.

RUCCKER, N. J. et al. Detection and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 3998-4007, 2011.

SAMRA, N. A. et al. Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. in diarrhoeic children from four provinces in South Africa. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 2, p. 154-159, 2013.

SATO, M. I. Z. et al. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 442, n. 1, p. 389-396, 2013.

SHARMA, P. et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. **International Journal of Infection Diseases** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.12.003>.

SILVA, S. **Caracterização morfológica e avaliação da heterogeneidade molecular de *Cryptosporidium* sp de grupos populacionais do município do Rio de Janeiro**. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

SILVA, C. G. M.; ANDRADE, S. A. C.; STAMFORD, T. L. M. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitos em hortaliças consumidas in natura, no Recife. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 10, Supl. 0, p. 63-69, 2005.

SKOTARCZAK, B. Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2010.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, v. 65, n. 3, p. 262-270, 1955.

SLUTER, S. D.; TZIPORI, S. WIDMER, G. Parameters affecting polymerase chain reaction detection of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 325-330, 1997.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010.

SNELLING, W. J. et al. Cryptosporidiosis in developing countries. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 1, n. 3, p. 242-256, 2007.

SODRÉ, F. C.; FRANCO, R. M. B. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, n. 2, p. 97-107, 2001.

SPANO, F. et al. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocysts wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, n. 2, p. 209-217, 1997a.

_____. Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development. **Parasitology**, v. 114, n. 5, p. 427-437, 1997b.

STURBAUM, G. D. et al. Species-specific, nested-PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2665-2668, 2001.

SULAIMAN, I. M.; XIAO, L.; LAL, A. A. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4431-4435, 1999.

SUNNOTEL, O. et al. *Cryptosporidium*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 7-16, 2006.

TAKAYANAGUI, O. M. et al. Monitoring of vegetables sold in Ribeirão Preto, SP, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n. 1, p. 37-41, 2001.

TEIXEIRA, W. F. P. et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in calf fecal samples by direct immunofluorescence assay. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 20, n. 4, p. 269-273, 2011.

TEN HOVE, R. J. et al. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Isospora belli* in stool samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, n. 3, p. 280–283, 2008.

THE ANOFEL *Cryptosporidium* NATIONAL NETWORK. Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. **Eurosurveillance**, v. 15, n. 33, 2010. Disponível em: < <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19642> >. Acesso em: 20 nov. 2012.

TROTZ-WILLIAMS, L. A. et al. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy and human in Ontario. **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 346-352, 2006.

TULI, L. et al. A multiattribute utility evaluation of different methods for the detection of enteric protozoa causing diarrhea in AIDS patients. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1-7, 2010.

TUMWINE, J. K. et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 6, p. 710–715, 2003.

TYZZER, E. E. A protozoan found in the peptic glands of common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.

_____. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archives Protistenk.**, v. 26, p. 394–412, 1912.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 184-189, 2008.

UNGAR, B. L. P. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 11, p. 2491-2495, 1990.

VALIGUROVÁ, A. et al. Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 8, p. 913-922, 2008.

VISVESVARA, G. S. et al. Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 730-733, 1997.

WALDRON, L. S. et al. Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7757-7765, 2011.

WARD, P. I. et al. Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. **Parasitology**, v. 124, n. 4, p. 359-368, 2002.

WEBER, R. et al. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 1323-1327, 1991.

WEBER, R.; BRYAN, R. T.; JURANEK, D. D. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n.11, p. 2869-2873, 1992.

WEITZEL, T. et al. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 7, p. 656-659, 2006.

WENYON, C. M. Coccidia of genus *Isospora* in cats, dogs and man. **Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 253-266, 1926.

WIELINGA, P. R. et al. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in the Netherlands. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 7, p. 809-817, 2008.

WIN, W. J. et al. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 8th ed. Philadelphia: Lippincott, p. 1484-1485, 2008.

WOODCOOK, H. M. Notes on the protozoan in the excreta, appended to paper by Ledingham and Penfold. **British Medicine**, v. 2, p. 704, 1915.

WOODMANSEE, D. B. Studies of in vitro excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves. **Journal of Protozoology**, v. 34, n. 4, p. 398-402, 1987.

XIAO, L. et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 1578-1583, 1999a.

_____. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999b.

_____. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 3, p. 492-497, 2001.

_____. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for health public. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 309-323, 2008.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010.

YAGITA, K. et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. **Parasitology Research**, v. 87, n. 11, p. 950-955, 2001.

YODER, J. S. et al. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events: United States, 2005-2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Surveillance Summaries**, v. 57, n. 9, p. 39-62, 2008.

_____. Cryptosporidiosis surveillance: United States, 2009-2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Surveillance Summaries**, v. 61, n. 5, p. 1-12, 2012.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Governo do Estado da Bahia
Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Ofício nº144/2007
Ref.: Devolução de Projeto

Salvador, 08 de agosto de 2007.

ESTIMADA
Márcia Cristina Aquino Teixeira
PESQUISADORA RESPONSÁVEL

Projeto de Pesquisa: "Investigação das Enteroparasitoses Oportunistas em Crianças e Indivíduos Imunodeficientes e Caracterização Genotípica dos Isolados de *Cryptosporidium*".

Pesquisador (a) Responsável: Márcia Cristina Aquino Teixeira

Situação do Projeto: APROVADO.

Estamos encaminhando para seu conhecimento e providências, o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da SESAB, reunido em 08 de agosto de 2007.

O projeto pode ter continuidade uma vez que atende aos requisitos éticos para a pesquisa envolvendo seres humanos.

Nesse sentido, o Comitê decidiu por sua aprovação, lembrando ao pesquisador (a) a necessidade de informar esse Comitê do relatório parcial e ou final no período de 6 (seis) meses a 1 (um) ano conforme recomendação da Resolução nº 196/96, IX – 2 c.

Estamos anexando ainda cópia do Parecer elaborado pelo relator e comitê, para o seu conhecimento.

Atenciosamente,

ANA-MÁRIA FERNANDES PITTA
Coordenadora do CEP-SESAB

EESP – Escola Estadual de Saúde Pública.
Rua Conselheiro Pedro Luis, N° 171 – Rio Vermelho.
Tel: (71) 3116-5333 Fax: (71) 3116- 5324
E-mail: cepSESAB@saude.ba.gov.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

INSTITUIÇÕES: Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFBA, Avenida Barão de Geremoabo, s/nº, Campus Universitário de Ondina e Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, UFBA, Rua Padre Feijó, nº 29, Canela, 40110-170, Salvador, Bahia.

PROJETO: “Investigação de Enteroparasitos Oportunistas em Crianças e Indivíduos Imunodeficientes e Caracterização Genotípica dos Isolados de *Cryptosporidium*”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Coordenadora: Dra. Márcia Aquino Teixeira; **Colaboradores:** Dr. Hugo da Costa Ribeiro Junior, Dra. Tereza Cristina Medrado Ribeiro, Dra. Neci Matos Soares, Renata Kelly N. Rodrigues, Flávia Thamires Figueiredo Pacheco.

INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO: Como voluntário, o Senhor (a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que tem como objetivo principal a identificação de parasitos nas fezes de crianças. Esses parasitos causam diarreia, dores de barriga, enjôo, vômitos, perda de peso, e pode se espalhar para outras partes do corpo se não tratados. Estes parasitos só são identificados através de exames especiais. Se o(a) Senhor(a) concordar em participar deste estudo, serão utilizadas as fezes de seu(sua) filho(a) e algumas informações sobre a moradia e a saúde do mesmo (a): se está com diarreia, tomando algum remédio ou sofre de alguma outra doença.

BENEFÍCIOS: A sua participação neste estudo será muito importante para o tratamento e no esclarecimento dos parasitos causadores de diarreia em crianças. Os resultados dos exames serão encaminhados para o médico ou responsável pela criança, sem qualquer custo.

VOLUNTARIEDADE/PRIVACIDADE: O(A) Sr.(a) poderá recusar-se a participar do estudo agora, ou de se retirar em qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer constrangimento ou prejuízo no atendimento pelas instituições envolvidas. Sua identidade será preservada e nenhum resultado obtido com esta pesquisa constará o seu nome. Os pesquisadores responsáveis por este projeto estarão à disposição para esclarecer qualquer dúvida ou questão que o(a) Sr.(a) tenha em relação a este estudo.

Declaro que li e entendi este consentimento e que de livre e espontânea vontade, concordei em participar desta pesquisa como voluntário.

Local/Data _____ Nome: _____

Assinatura (paciente/responsável): _____