

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses

**Caracterização epidemiológica da criptosporidiose em Portugal, por
estudo molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp.
de humanos e de animais**

Maria Margarida Ferreira Alves

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Doutor
em Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia,
pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e
Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Doutor Francisco José Nunes Antunes

Lisboa
2006

O presente trabalho foi realizado na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e na “Division of Parasitic Diseases” do “Centers for Disease Control and Prevention”. A doutoranda usufruiu de uma Bolsa de Doutorado da Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH / BD / 2898 / 2000)

Aos meus PAIS,
que tantas vezes renunciaram a si mesmos, em
benefício da minha formação.

A DEUS,
pela inspiração e força com que me guiou nesta
caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Francisco Antunes, meu orientador, agradeço a confiança depositada no meu trabalho, o apoio e o incentivo à minha formação e valorização e as oportunidades que me proporcionou.

À Prof.^a Doutora Maria Amélia Grácio, agradeço a amabilidade de ter acedido fazer parte da comissão tutorial deste trabalho de doutoramento.

À Prof.^a Doutora Olga Matos, que co-orientou este trabalho, pelo ânimo, apoio e ensinamentos que me dispensou, o meu muito obrigada.

Ao Doutor Lihua Xiao, agradeço a extraordinária oportunidade de me ter recebido no seu laboratório, os ensinamentos, a pronta disponibilidade e a preciosa ajuda que me concedeu.

Ao Doutor Irshad Sulaiman, expresse o meu reconhecimento pelo modo amigo com que me acolheu, me ensinou e me ajudou durante a minha permanência no CDC.

À Prof.^a Doutora Isabel Fonseca, à Dr.^a Esmeralda Delgado e à Dr.^a Ana Mafalda Lourenço, agradeço a cedência dos isolados de gado bovino e de animais silváticos que foram caracterizados neste trabalho.

À Dr.^a Ana Mafalda Lourenço, ao Dr. Joaquim Henriques e à Dr.^a Maria d'Aires, deixo o meu sincero agradecimento pelo empenho e entusiasmo na recolha de material biológico dos animais de companhia.

À Dr.^a Margarida Barão da Cunha, do Jardim Zoológico de Lisboa, estou grata pelo seu interesse e entusiástica cooperação neste trabalho. Agradeço, ainda, a todos os funcionários do Jardim Zoológico de Lisboa que colaboraram na recolha das amostras.

À Vanessa Lemos, pela inestimável e incansável ajuda em tantos diagnósticos parasitológicos e, também, pela sua alegria, incentivo e amizade, o meu reconhecido agradecimento.

Aos inúmeros colegas que passaram pela Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses e que comigo “dividiram” a bancada de trabalho, em particular, às “residentes” Luísa Lobo e Marina Costa, agradeço a amizade, o companheirismo, a ajuda, a boa disposição e o óptimo ambiente de trabalho.

Ao Sr. Luís Filipe Marto, do Gabinete de Desenho e Audiovisuais do IHMT, que elaborou os desenhos presentes neste trabalho, o meu sincero agradecimento pelo auxílio e disponibilidade dispensados.

A todos os funcionários do IHMT, em particular, a D. Arminda Barbosa, a D. Flora Silva, a D. Florbela Almeida, a D. Gracinda Santos, a D. Leónia Bernardes, a D. Manuela Moniz, a D. Maria da Luz Noras e a D. Rosa Botão o meu agradecimento, pela sã convivência, pela ajuda e pela amizade que sempre me dedicaram.

Aos meus familiares e amigos, pela amizade, incentivo e paciência com que me acompanharam nesta caminhada. Muito obrigada pela vossa presença na minha vida.

Aos meus pais, Armando e Maria do Carmo, sem os quais nada na minha vida teria sido possível, expresso a minha profunda gratidão pelo carinho e dedicação permanentes, pela inestimável ajuda, pela infinita paciência e pelo seu exemplo de integridade, perseverança, generosidade e humildade.

A todos os que, de algum modo, contribuíram para a minha chegada ao fim desta etapa e que, por falha não intencional, não foram aqui mencionados, o meu sincero agradecimento.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, Ministério da Ciência e Ensino Superior, agradeço a atribuição da bolsa de doutoramento.

RESUMO

Cryptosporidium spp. é um protozoário ubíquo causador de patologia gastrointestinal em humanos e animais. A infecção ocorre por ingestão de oocistos, após contacto directo com pessoas – transmissão antroponótica – ou outros animais infectados – transmissão zoonótica – podendo, ainda, ocorrer, indirectamente, através da água ou de alimentos contaminados. A importância relativa dos diferentes modos de transmissão, não se encontra, ainda, esclarecida. A criptosporidiose humana está associada, sobretudo, à infecção por *C. hominis* e por *C. parvum*, embora se encontrem descritos, também, casos de infecção por *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. canis*, *C. suis* e *Cryptosporidium* genótipo cervo.

Com o presente trabalho pretendeu-se determinar as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* que, em Portugal, se encontram associadas, quer à infecção humana, quer à infecção em gado doméstico, animais de companhia e animais silváticos, a fim de identificar, não só os parasitas infectantes para o Homem, como, também, os seus possíveis reservatórios zoonóticos. Para além disso, foi, ainda, objectivo deste trabalho, contribuir para a compreensão do papel desempenhado pelas vias de transmissão zoonótica e antroponótica na epidemiologia da criptosporidiose humana no nosso País.

Na população de infectados por VIH, com sintomatologia gastrointestinal, que estudámos, entre Junho de 2001 e Janeiro de 2005, foi encontrada a percentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp. de 8,3% (18/217). Nos animais de companhia, a taxa de infecção obtida para gatos com dono e para cães com e sem dono foi de, respectivamente, 1,8% (2/109) e 0% (0/157). Nos animais silváticos de vida livre estudados, carnívoros e pequenos mamíferos, não foi encontrada infecção por *Cryptosporidium* spp.. Nos animais do Jardim Zoológico de Lisboa, apenas foram encontrados oocistos em duas amostras fecais de mamíferos, uma de um bisonte americano e, outra, de um gnu de cauda branca, correspondendo a uma percentagem de amostras positivas de 0,9% (2/217); também foram observados oocistos numa amostra fecal de uma tartaruga estrela indiana que havia chegado recentemente ao Jardim Zoológico.

A caracterização molecular de isolados humanos de *Cryptosporidium* spp., detectados entre 1994 e 2005, permitiu identificar, ao nível da espécie, 51 parasitas: 52,9% (27/51) pertenciam à espécie *C. parvum*, 31,4% (16/51) a *C. hominis*, 9,8% (5/51) a *C. felis* e 5,9% (3/51) a *C. meleagridis*. No que se refere aos criptosporídeos de hospedeiros não humanos – gado doméstico e ruminantes silváticos (gamos da Tapada Nacional de Mafra e Bovídeos do

Jardim Zoológico de Lisboa), estudados retrospectivamente, e gatos e animais do Jardim Zoológico, estudados prospectivamente –, nos casos em que a amplificação do DNA foi bem sucedida, os resultados da sua caracterização molecular mostraram que: i) 94% (80/85) dos isolados bovinos e todos os isolados de ovinos (n = 2), de gamos da Tapada de Mafra (n = 4) e de Bovídeos do Jardim Zoológico (n = 11) pertenciam à espécie *C. parvum*; ii) 2,4% (2/85) dos isolados bovinos pertenciam à espécie *C. bovis*; iii) 2,4% (2/85) dos isolados bovinos pertenciam à espécie *C. andersoni*; iv) 1,2% (1/85) dos isolados bovinos pertenciam ao genótipo semelhante ao do gamo; v) os isolados detectados nos dois gatos pertenciam à espécie *C. felis*; vi) os parasitas encontrados nas fezes do bisonte americano, do gnu de cauda branca e da tartaruga estrela indiana pertenciam, respectivamente, ao genótipo rato, a um genótipo novo e ao genótipo tartaruga. Entre as espécies e genótipos identificados nos isolados animais, duas – *C. parvum* e *C. felis* – foram, também, encontradas em infecções humanas, facto que nos leva a considerar os seus respectivos hospedeiros – gado doméstico, ruminantes silváticos e gatos – como possíveis reservatórios zoonóticos da infecção humana.

A determinação da diversidade intra-específica de *C. hominis* e de *C. parvum* foi realizada por caracterização molecular de um *locus* de microssatélites – ML2 – e do gene GP60. A análise de fragmentos por metodologia fluorescente do STR ML2, revelou a ausência de variabilidade genética em *C. hominis* e permitiu caracterizar, somente, 47% (8/17) dos isolados de *C. parvum* humanos estudados; a presença de múltiplos picos nos electroforetogramas dos restantes parasitas de origem humana e nos de todos os outros animais impediu a identificação dos seus alelos. Os dois alelos identificados nos oito isolados de *C. parvum* humanos – ML2-176 e ML2-191 – não foram encontrados em nenhum dos parasitas de gado doméstico ou de ruminantes silváticos. Em virtude da impossibilidade de identificar o alelo de todos os parasitas da espécie *C. parvum* em estudo, a caracterização do *locus* ML2 mostrou ser de pouca utilidade para o nosso trabalho. A caracterização do gene GP60, permitiu identificar nove famílias de subtipos, quatro em *C. parvum* e cinco em *C. hominis*. Entre os parasitas da espécie *C. parvum*, os de origem humana apresentaram maior variabilidade de subtipos do que os de gado bovino e de ruminantes silváticos. A maioria dos isolados de gado bovino (61/72), um de gado ovino, um de gamos da Tapada de Mafra e todos os dos Bovídeos do Jardim Zoológico (n = 9) apresentaram o mesmo subtipo – IIaA15G2R1 –, o qual foi, também, encontrado em nove isolados humanos. O segundo subtipo de *C. parvum* mais frequente em isolados bovinos – IIaA16G2R1 – não foi

encontrado em isolados humanos. Os dois subtipos menos frequentes em gado bovino e ovino – IIdA17G1 e IIdA21G1 – foram, também, identificados em isolados humanos. Em alguns parasitas humanos de *C. parvum* foram, ainda, encontrados quatro subtipos, pertencentes a três famílias, não identificados nos isolados de gado doméstico ou de ruminantes silváticos – IIbA14, IIcA5G3, IIdA19G1 e IIdA22G1. O facto de, em Portugal, isolados de *C. parvum* com o mesmo subtipo terem sido encontrados em infecções, não só humanas, como, também, de gado doméstico e de ruminantes silváticos indica que a sua transmissão ao Homem pode ocorrer pela via zoonótica e, também, pela antroponótica. Ainda, a identificação, em isolados de *C. parvum* humanos, de famílias/subtipos não encontrados nos animais, coloca a hipótese destes parasitas serem transmitidos ao Homem, unicamente, pela via antroponótica. Em suma, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que, em Portugal, a transmissão de *C. parvum* ao Homem envolve dois grupos de parasitas, um constituído por aqueles que são transmitidos, quer pela via zoonótica, quer pela antroponótica e, outro, composto pelos que são veiculados, exclusivamente, pela via antroponótica.

SUMMARY

Cryptosporidium species are protozoan parasites that emerged worldwide as a cause of diarrhoeal disease in humans and animals. Infection can be transmitted through person-to-person – anthroponotic transmission –, animal-to-person contact – zoonotic transmission – or by ingestion of contaminated water or food. The influence of each transmission route in the transmission dynamics of cryptosporidiosis is not yet fully understood. Although human infections are caused, mainly, by *C. parvum* and *C. hominis*, several other species have also been associated with human disease – *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. canis*, *C. suis* and *Cryptosporidium* cervine genotype.

With this work we intended to identify the *Cryptosporidium* species and genotypes responsible for human infections in Portugal as well as those that parasitize cattle, pets and wild animals, in order to determine which ones are infectious for humans and also their possible zoonotic reservoirs. In addition, we also intended to establish the role of each transmission route in the epidemiology of cryptosporidiosis in Portugal.

The rate of *Cryptosporidium* spp. infection in the HIV-infected patients with gastrointestinal symptoms, studied between June 2001 and January 2005, was 8,3% (18/217). In pets, 1,8% (2/109) of the privately owned cats and 0% (0/157) of the privately owned and shelter dogs were excreting *Cryptosporidium* spp. oocysts. In free-ranging wild animals, carnivores and small mammals, no oocysts were found in the faecal samples studied. In animals kept at the Lisbon Zoo, the rate of positive faecal samples among the mammals examined was 0,9% (2/217), corresponding to a black wildebeest and a prairie bison excreting oocysts in their faeces; *Cryptosporidium* spp. was also found in the faeces of an indian star tortoise newly arrived at the Zoo.

Molecular characterization of human *Cryptosporidium* spp. isolates, detected between 1994 and 2005, was successfully accomplished for fifty-one parasites: 52,9% (27/51) were identified as *C. parvum*, 31,4% (16/51) as *C. hominis*, 9,8% (5/51) as *C. felis* and 5,9% (3/51) as *C. meleagridis*. Concerning the parasites from non-human hosts – cattle and wild ruminants (fallow deers from Tapada Nacional de Mafra and Bovids from the Lisbon Zoo), studied retrospectively, and cats and Zoo animals, studied prospectively – in those with positive DNA amplification, the results of its molecular characterization showed that: i) 94% (80/85) of the bovine isolates and all the isolates from sheep (n = 2), fallow deers from

Tapada de Mafra (n = 4) and Bovids from the Zoo (n = 11) were identified as *C. parvum*; ii) 2,4% (2/85) of the bovine isolates were identified as *C. bovis*; iii) 2,4% (2/85) of the bovine isolates were identified as *C. andersoni*; iv) 1,2% (1/85) of the bovine isolates were identified as *Cryptosporidium* deer-like genotype; v) the isolates from cats were identified as *C. felis*; vi) the isolates from the black wildebeest, the prairie bison and the indian star tortoise were identified as the mouse genotype, a novel unidentified genotype and the tortoise genotype, respectively. Two of the species found in animal infections – *C. parvum* and *C. felis* – were also found to cause human disease, suggesting that these species' hosts – cattle, wild ruminants and cats – may act as zoonotic reservoirs for human cryptosporidiosis.

The evaluation of the intra-specific heterogeneity within *C. hominis* and *C. parvum* was achieved by molecular characterization of a microsatellite locus – ML2 – and the GP60 gene. The fragment analysis of the ML2 STR showed no genetic variation within *C. hominis* and enabled allele identification only in 47% (8/17) of the studied human *C. parvum* isolates; the presence of stutter bands in the electrophoretograms from the remaining human parasites and in those from all the animal isolates impaired the identification of their alleles. The two alleles found in the eight human *C. parvum* parasites – ML2-176 and ML2-191 – were not found in any *C. parvum* isolate from cattle or wild ruminants. As the genetic characterisation of all *C. parvum* parasites was not achieved, the ML2 approach had little usefulness for our study. The PCR and sequencing of the GP60 gene enabled the identification of nine subtype families, four in *C. parvum* and five in *C. hominis*. We found higher subtype variability among human *C. parvum* isolates than in those from cattle and wild ruminants. Most of the *C. parvum* isolates from cattle (61/72), one isolate from sheep, one isolate from a fallow deer and all the isolates from the Lisbon Zoo Bovids (n = 9) presented the same subtype – IIaA15G2R1 –, the one that was also found in nine human isolates. The second most frequent *C. parvum* subtype found in cattle isolates – IIaA16G2R1 – was not identified in human parasites. The two less frequent subtypes found in cattle and sheep – IIdA17G1 and IIdA21G1 – were also present in isolates from humans. In some human *C. parvum* parasites, we found four subtypes, belonging to three subtype families, which were not identified in isolates from cattle or wild ruminants – IIbA14, IIcA5G3, IIdA19G1 and IIdA22G1. Finding *C. parvum* isolates with the same subtype in human, cattle and wild ruminant infections indicates that these parasites may be transmitted to humans by zoonotic as well as by anthroponotic transmission. Also, the identification of human *C. parvum* isolates with families/subtypes that were not found in

parasites from cattle or wild ruminants points out the hypothesis that these parasites may be transmitted to humans exclusively by anthroponotic transmission. So, the results of the present study suggest that, in Portugal, transmission of *C. parvum* to humans involves two groups of parasites, one containing those that can be transmitted by both zoonotic and anthroponotic cycles and another comprising the parasites that are transmitted exclusively by anthroponotic cycles.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	–	Porcentagem
% m/v	–	Porcentagem massa/volume
% v/v	–	Porcentagem volume/volume
A, C, G, T	–	Bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, citosina, guanina, timina)
BLAST		acrónimo anglo-saxónico para “Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	–	Albumina de soro bovino, sigla anglo-saxónica para “bovine serum albumine”
CDC	–	sigla anglo-saxónica para “Centers for Disease Control and Prevention”
Céls/mm ³	–	Células por milímetro cúbico
COWP	–	Proteína da parede do oocisto de <i>Cryptosporidium</i> , acrónimo anglo-saxónico para “ <i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein”
dATP	–	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	–	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	–	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DHFR	–	Dihidrofolato reductase, sigla anglo-saxónica para “dihydrofolate reductase”
dITP	–	2'-desoxi-inosina 5'-trifosfato
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxiribonucleico, sigla anglo-saxónica para “deoxyribonucleic acid”
dNTP	–	2'-desoxinucleótido 5'-trifosfato
DTT	–	Ditiotreitol
dTTP	–	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
dUTP	–	2'-desoxiuridina 5'-trifosfato
EDTA	–	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>et al.</i>	–	E outros, da locução latina <i>et alii</i>
EUA	–	Estados Unidos da América
<i>g</i>	–	Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
GP60	–	Glicoproteína de 60-kDa

HAART	– Terapêutica anti-retroviral potente, acrónimo anglo-saxónico para “highly active antiretroviral therapy”
HCl	– Ácido clorídrico
HSP70	– Proteína de choque térmico de 70-kDa, sigla anglo-saxónica para “heat shock protein 70-kDa”
ICAT	– Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia
IHMT	– Instituto de Higiene e Medicina Tropical
ITS	– Espaçadores internos transcritos, sigla anglo-saxónica para “internally transcribed spacers”
K ₂ Cr ₂ O ₇	– Dicromato de potássio
kDa	– Quilodalton
KOH	– Hidróxido de potássio
L	– Litro
M	– Molar
MgCl ₂	– Cloreto de magnésio
MIF	– Mertiolato/iodo/formaldeído
min.	– Minutos
ml	– Mililitro
ML2	– Microssatélite 2
mm	– Milímetro
mM	– Milimolar
nt	– Nucleótido
°C	– Grau Celsius
pb	– Par de bases
PCR	– Reacção em cadeia da polimerase, sigla anglo-saxónica para “polymerase chain reaction”
pH	– Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica de uma solução (-log [H ⁺])
pmol	– Picomole
pp.	– Páginas
RAPD	– Amplificação de polimorfismos de distribuição aleatória, acrónimo anglo-saxónico para “random amplified polymorphic DNA”

rDNA	– Ácido desoxirribonucleico ribossómico, sigla anglo-saxónica para “ribosomal deoxyribonucleic acid” (designação do gene que codifica o ácido ribonucleico ribossómico – rRNA)
RFLP	– Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição, sigla anglo-saxónica para “restriction fragment length polymorphism”
RNA	– Ácido ribonucleico, sigla anglo-saxónica para “ribonucleic acid”
rRNA	– Ácido ribonucleico ribossómico, sigla anglo-saxónica para “ribosomal ribonucleic acid”
seg.	– Segundos
SIDA	– Síndrome de imunodeficiência adquirida
sp.	– Espécie
spp.	– Espécies
SSU-rRNA	– Subunidade pequena do ácido ribonucleico ribossómico, sigla anglo-saxónica para “small subunit ribosomal ribonucleic acid”
STR	– Repetição curta aleatória, sigla anglo-saxónica para “short tandem repeat”
TAE	– Tampão tris-acetato-EDTA
TRAP-C1	– Proteína de adesão relacionada com a trombospondina de <i>Cryptosporidium-1</i> , acrónimo anglo-saxónico para “thrombospondin-related adhesive protein of <i>Cryptosporidium-1</i> ”
TRAP-C2	– Proteína de adesão relacionada com a trombospondina de <i>Cryptosporidium-2</i> , acrónimo anglo-saxónico para “thrombospondin-related adhesive protein of <i>Cryptosporidium-2</i> ”
Tris	– Tris(hidroximetilo)aminometano
Tris-HCl	– Tris(hidroximetilo)aminometano-ácido clorídrico
U	– Unidade de actividade enzimática
UV	– Ultravioleta
V	– Volt
VIH	– Vírus da imunodeficiência humana
µg/ml	– Micrograma por mililitro
µl	– Microlitro
µm	– Micrómetro

ÍNDICE

PRIMEIRA PARTE – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1. Perspectiva histórica	2
2. Ciclo de vida	4
3. Classificação taxonómica	8
4. Apresentação clínica da criptosporidiose humana	13
5. Tratamento da criptosporidiose humana	16
6. Diagnóstico da criptosporidiose	18
6.1 Diagnóstico histológico	18
6.2 Diagnóstico coprológico	19
7. Modos de transmissão da criptosporidiose humana	23
7.1 Transmissão antroponótica	24
7.2 Transmissão zoonótica	25
7.3 Transmissão hídrica	25
7.4 Transmissão através de alimentos contaminados	27
8. Controlo e prevenção da criptosporidiose	29
9. Epidemiologia da criptosporidiose	32
9.1 A criptosporidiose no Homem	33
9.1.1 Estudos seroepidemiológicos	34
9.1.2 Estudos coprológicos	35
9.1.3 Factores de risco	40
9.1.4 Variação sazonal	42
9.2 A criptosporidiose noutros animais	43
9.2.1 Gado doméstico	43
9.2.2 Animais de companhia	46
9.2.3 Animais silváticos	47
9.3 Contaminação dos recursos hídricos	49
10. Epidemiologia molecular da criptosporidiose	52
10.1 Identificação da diversidade genética do género <i>Cryptosporidium</i>	52
10.2 Espécies que causam infecção humana e epidemiologia da sua transmissão	57

10.3 Espécies e génotipos encontrados em outros hospedeiros vertebrados	62
10.4 Identificação de espécies e de génotipos encontrados na água	65
10.5 Variação intra-específica em <i>C. parvum</i> e <i>C. hominis</i>	67
SEGUNDA PARTE – CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA CRIPTOSPORIDIOSE EM	
PORTUGAL	70
CAPÍTULO I – OBJECTIVOS	71
CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS	73
1. População estudada	74
1.1 População humana	74
1.2 População animal	74
1.2.1 Gado bovino e ovino	75
1.2.2 Animais de companhia	75
1.2.3 Animais silváticos de vida livre	76
1.2.4 Animais silváticos em cativeiro	77
2. Diagnóstico parasitológico	80
2.1 Concentração das amostras fecais	80
2.2 Coloração diferencial	80
2.3 Observação microscópica	81
3. Extracção de DNA genómico de <i>Cryptosporidium</i> spp.	82
3.1 Preparação dos oocistos para extracção de DNA	82
3.2 Método Mini-BeadBeater/Sílica	82
3.3 Método KOH/Qiagen	83
4. Caracterização molecular de isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp.	85
4.1 Amplificação de DNA genómico por PCR	85
4.2 Visualização do DNA amplificado	88
4.3 Hidrólise do DNA amplificado por endonucleases de restrição – RFLP	88
4.4 Purificação e sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR	89
4.5 Análise bioinformática	90
5. Caracterização molecular intra-específica de <i>C. parvum</i> e <i>C. hominis</i>	91
5.1 Análise de microssatélites	91
5.2 Caracterização molecular do gene GP60	93

5.2.1 Amplificação de DNA genómico por PCR	93
5.2.2 Purificação e sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR	95
5.2.3 Análise bioinformática	97
CAPÍTULO III – INFECÇÃO POR <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. EM DOENTES INFECTADOS POR VIH	98
1. Introdução	99
2. Resultados	99
3. Discussão	101
CAPÍTULO IV – INFECÇÃO POR <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. EM ANIMAIS DE COMPANHIA E SILVÁTICOS	104
1. Introdução	105
2. Resultados	106
2.1. Animais de companhia	106
2.2. Animais silváticos de vida livre	107
2.3. Animais silváticos em cativeiro	107
3. Discussão	108
3.1. Animais de companhia	108
3.2. Animais silváticos de vida livre	110
3.3. Animais silváticos em cativeiro	113
CAPÍTULO V – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS HUMANOS DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP.	116
1. Introdução	117
2. Resultados	119
3. Discussão	129
CAPÍTULO VI – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS ANIMAIS DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP.	137
1. Introdução	138
2. Resultados	139
3. Discussão	146
CAPÍTULO VII – CARACTERIZAÇÃO INTRA-ESPECÍFICA DE <i>C. HOMINIS</i> E <i>C. PARVUM</i>	155
1. Introdução	156
2. Resultados	158

2.1. Análise de microssatélites	158
2.2. Caracterização do gene GP60	162
3. Discussão	173
CAPÍTULO VIII – CONCLUSÃO	184
CAPÍTULO IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	188

- Primeira Parte -

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

Os microrganismos do género *Cryptosporidium* foram descritos, pela primeira, vez em 1907, pelo parasitologista americano Ernest Tyzzer, após observação, na mucosa gástrica de murganhos (*Mus musculus*), diversas formas de desenvolvimento sexuadas e assexuadas que resultavam na formação de oocistos contendo quatro esporozoítos livres. O autor identificou os parasitas como sendo coccídeos de estatuto taxonómico indefinido e deu-lhe o nome de *Cryptosporidium muris* [Tyzzer, 1907]. Em 1910, Tyzzer fez a descrição detalhada do ciclo de vida e das formas de desenvolvimento de *C. muris* e propôs a criação do género *Cryptosporidium* (que significa esporocisto escondido ou ausente), pertencente à classe Sporozoa e à subclasse Coccidia. O mesmo autor descreveu, ainda, em 1912, uma nova espécie, que designou de *Cryptosporidium parvum*, que se desenvolve no epitélio intestinal de murganhos e cujos oocistos possuem dimensões inferiores às de *C. muris* [Tyzzer, 1912].

Nos anos seguintes, em mamíferos, aves, répteis e peixes, foram descritas 21 novas espécies pertencentes ao género *Cryptosporidium*, assumindo-se que cada hospedeiro animal era parasitado por uma espécie diferente de *Cryptosporidium* spp.. No entanto, estudos subsequentes mostraram tratar-se, algumas delas, de esporocistos de *Sarcocystis*. Do mesmo modo, na sequência de estudos de transmissão cruzada, outras espécies foram invalidadas e sinonimizadas com *C. parvum* [Levine, 1984; O'Donoghue, 1995; Fayer *et al.*, 1997].

A identificação, em 1971, de parasitas do género *Cryptosporidium*, como causa de diarreia em vitelos, marcou o início do interesse da Medicina Veterinária por estes microrganismos e, desde então, muitos autores descreveram casos de diarreia aguda provocados por estes agentes em animais domésticos e silváticos [Casemore *et al.*, 1985b; Current e Garcia, 1991].

Os dois primeiros casos conhecidos de criptosporidiose humana foram relatados em 1976. O primeiro foi registado numa criança de três anos, residente numa zona rural de Nashville, nos Estados Unidos da América (EUA), que apresentava diarreia severa [Nime *et al.*, 1976]. O segundo foi descrito, também nos EUA, num agricultor de 39 anos de idade que desenvolveu diarreia severa após cinco semanas de terapêutica imunossupressora, para tratamento de doença auto-imune [Meisel *et al.*, 1976]. Nos seis anos seguintes foram documentados oito casos de criptosporidiose, cinco em imunocomprometidos e três em

imunocompetentes [Centers for Disease Control and Prevention, 1982a; Reese *et al.*, 1982; Sloper *et al.*, 1982; Tzipori, 1983]. Em 1982, dois relatórios do “U.S. Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) reportaram a ocorrência de um surto de criptosporidiose no Alabama, em 12 indivíduos imunocompetentes, todos tratadores de vitelos com diarreia [Centers for Disease Control and Prevention, 1982a] e de diarreia severa crônica por *Cryptosporidium* spp. em 21 doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) [Centers for Disease Control and Prevention, 1982b]. Após estas duas últimas referências, as comunidades médica e científica tomaram, finalmente, consciência da importância deste parasita para a saúde humana. Mais tarde, em 1993, em Milwaukee, EUA, através da rede de abastecimento público de água à cidade, 403.000 pessoas foram infectadas por *Cryptosporidium* spp.. Nos dois anos que se seguiram a este surto, o número de óbitos por criptosporidiose foi 13,5 vezes superior ao registado nos dois anos anteriores, tendo 85% dos mesmos ocorrido entre a população de doentes com SIDA [Hoxie *et al.*, 1997]. Desde então, o interesse por este protozoário passou a envolver, também, as entidades distribuidoras de água e as autoridades de saúde pública [MacKenzie *et al.*, 1994].

O reconhecimento gradual da importância dada a este microrganismo, ao longo do último século, reflectiu-se no aumento exponencial de publicações presentes na “National Library of Medicine” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) que, sendo de 100 até 1982, aumentou para 5.019, em Dezembro de 2005. Essas publicações documentam, não só a infecção por *Cryptosporidium* spp. no Homem e noutros animais e a presença deste parasita na água e nos alimentos, como dão conta de vários aspectos da sua biologia e do desenvolvimento de métodos de diagnóstico, detecção, prevenção, controlo e tratamento da criptosporidiose.

2. CICLO DE VIDA

Os parasitas do género *Cryptosporidium* apresentam um ciclo de vida monoxénico, que se inicia após a ingestão de oocistos por parte de um hospedeiro susceptível (figura 1). As condições de temperatura, de pH e a presença de sais biliares e enzimas pancreáticas, encontradas no lúmen intestinal, induzem a libertação dos quatro esporozoítos existentes em cada oocisto. Através de um processo ainda pouco compreendido, mediado por proteínas produzidas pelo esporozoíto e por receptores específicos existentes na célula hospedeira, determinados organelos do complexo apical (localizado na extremidade anterior dos esporozoítos) iniciam o processo de invasão das células do epitélio intestinal. Estas últimas começam, então, um processo de reorganização do seu citosqueleto, ao mesmo tempo que a sua membrana celular envolve o esporozoíto, formando um vacúolo parasitóforo, em que o parasita permanece numa posição intracelular, mas extracitoplasmática, passando, nesta altura, a designar-se de trofozoíto. Com excepção dos merozoítos e dos microgametas, que se libertam da célula hospedeira para invadirem novas células, todo o desenvolvimento endógeno se processa no interior das células epiteliais. Pensa-se que a chave da resistência aos fármacos, apresentada por estes microrganismos, possa encontrar justificação nesta localização particular, entre o lúmen intestinal e o citoplasma da célula hospedeira, que os protege do ambiente intestinal hostil e da resposta imunológica do hospedeiro. Na base de cada vacúolo parasitóforo desenvolve-se uma estrutura denominada organelo alimentador (do inglês, “feeder organelle”) que separa os citoplasmas da célula hospedeira e do parasita e que é o responsável pela entrada de energia e de nutrientes (figura 2b) [Ward e Cevallos, 1998; Tzipori e Ward, 2002; Petry, 2004].

A fase assexuada do desenvolvimento parasitário inicia-se dentro do vacúolo parasitóforo, quando o trofozoíto sofre três divisões nucleares (merogonia), originando os merontes tipo I, que contêm seis a oito merozoítos (figuras 1 e 2c), os quais são libertados para o lúmen intestinal. Cada novo merozoíto invade uma célula epitelial adjacente (figuras 1 e 2d) e, após maturação e duas ou três gerações de merogonia, origina, respectivamente, um meronte tipo I (constituindo uma fonte interna de auto-infecção) ou um meronte tipo II. Este último contém quatro merozoítos que, ao infectarem novas células, se diferenciam em microgamontes (células masculinas) e macrogamontes (células femininas) e vão iniciar a fase

sexuada do desenvolvimento (gametogonia). Os microgamontes tornam-se multinucleados, sendo cada núcleo incorporado num microgâmeta que vai fertilizar um macrogamonte (figuras 1 e 2e), formando o zigoto. Este, por sua vez, sofre duas divisões nucleares (esporogonia) dando origem ao oocisto, que contém no seu interior quatro esporozoítos. Durante a esporogonia formam-se dois tipos de oocistos, os de parede fina (cerca de 20%), que permanecem no hospedeiro, constituindo uma segunda fonte de auto-infecção e os de parede grossa (cerca de 80%), que são excretados nas fezes, já sob a forma infectante (esporulados) e que, após ingestão, vão infectar novos hospedeiros susceptíveis [O'Donoghue, 1995; Fayer *et al.*, 1997; Kosek *et al.*, 2001; Carey *et al.*, 2004].

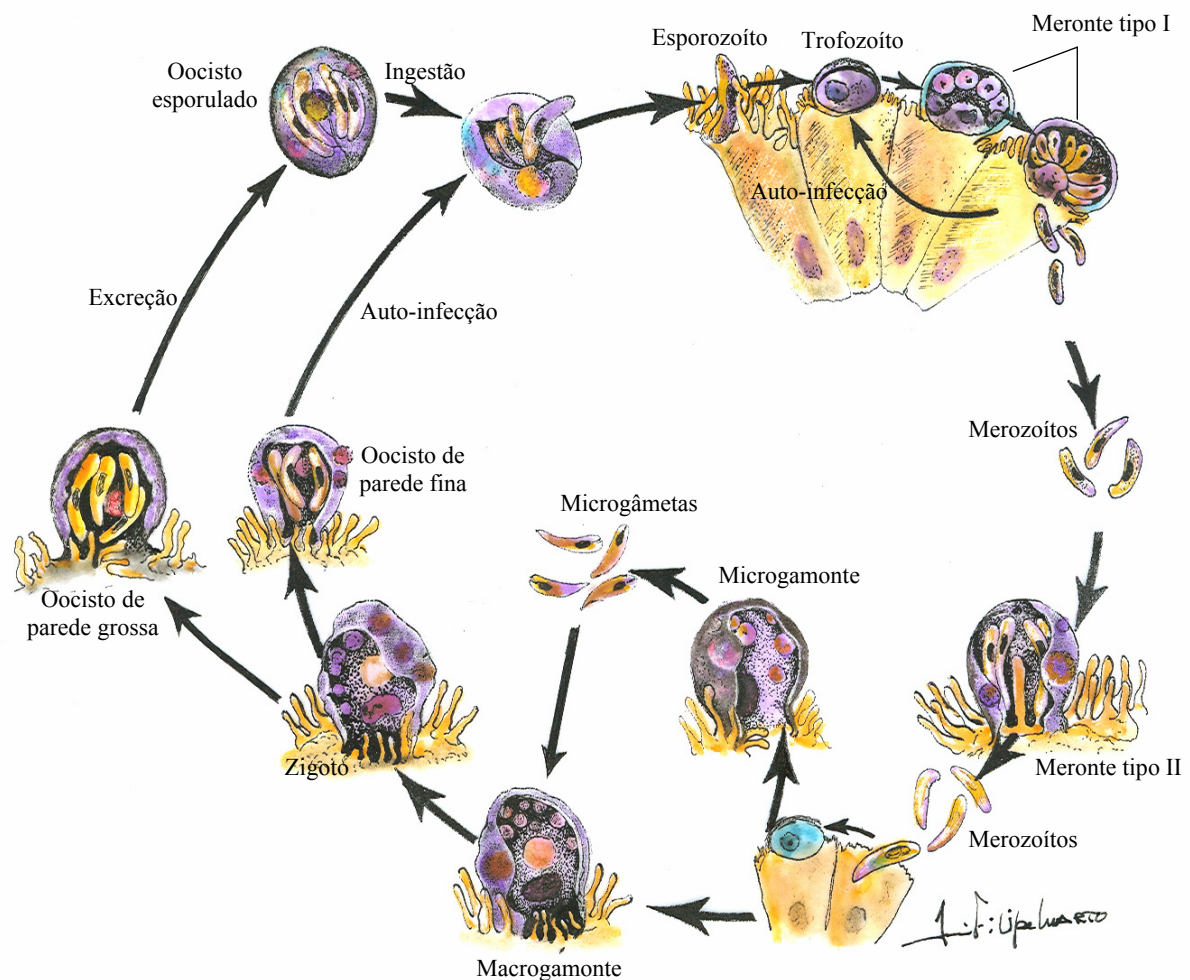


FIGURA 1 – Representação esquemática do ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.

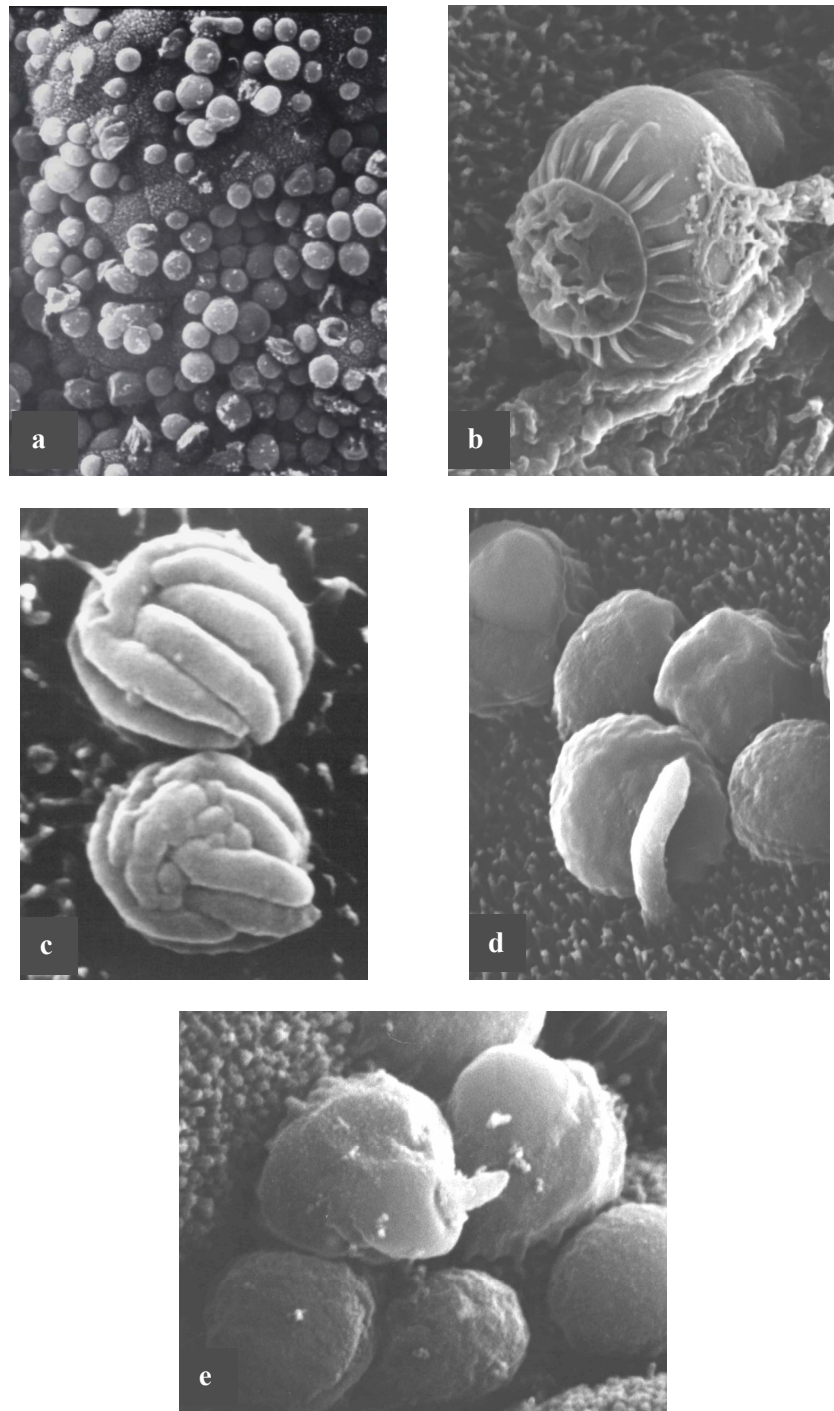


FIGURA 2 – *Cryptosporidium baileyi* observado em microscopia electrónica de varrimento: **a)** elevada carga parasitária na superfície epitelial; **b)** região basal do organelo alimentador; **c)** merontes tipo I; **d)** merozoíto a penetrar na célula hospedeira; **e)** microgâmeta a fertilizar um macrogamonte [adaptado de <http://www.ksu.edu/parasitology/625tutorials/Cbaileyi.html>, consultado a 10 de Novembro de 2004]

Os oocistos apresentam forma redonda a ovalada, com dimensões que variam entre 4 a 8 μm , dependendo da espécie. No seu interior encontram-se quatro esporozoítos vermiformes e um corpo residual contendo um vacúolo lipídico e alguns grânulos de amilopectina (figura 3) [Petry, 2004].

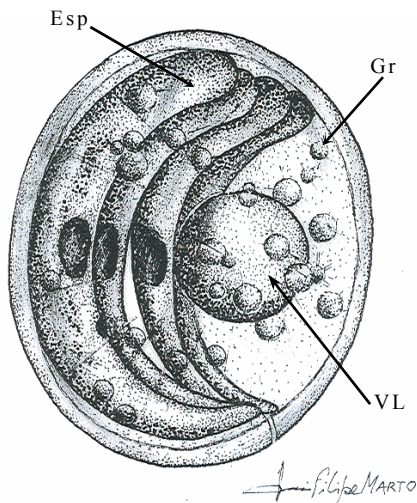


FIGURA 3 – Representação esquemática de um oocisto de *Cryptosporidium* spp.. Esp – esporozoíto, Gr – grânulo de amilopectina, VL – vacúolo lipídico

Num estudo recente, após infecção experimental em ratinhos e vitelos, foi descrita, respectivamente, em *C. parvum* e *C. andersoni*, a existência de formas de desenvolvimento extracelulares semelhantes aos gamontes dos gregarinas, algumas das quais em sizígia. Contudo, a sua origem, o seu destino e o seu papel no ciclo de vida daqueles parasitas não é, ainda, conhecido [Hijjawi *et al.*, 2002]. Rosales *et al.* (2005) também observaram, em culturas celulares de *C. parvum*, a presença de formas de desenvolvimento extracelulares semelhantes aos gamontes dos gregarinas e de zigotos e oocistos com oito esporozoítos; algumas das formas extracelulares foram, igualmente, observadas em sizígia. Estes resultados apontam para a necessidade de revisão do ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. o que, no entanto, só poderá ser conseguido após a realização de estudos *in vitro* e *in vivo* adicionais e da análise ultra-estrutural destas novas formas de desenvolvimento [Hijjawi *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2005].

3. CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA

Os elementos do género *Cryptosporidium* são microrganismos eucariotas, pertencentes ao reino Protozoa, cuja classificação tem por base as suas características morfológicas, o seu ciclo de vida e o local de infecção no hospedeiro [O'Donoghue, 1995; Fayer *et al.*, 1997]. Assim, pertencem ao subfiló Apicomplexa (presença de complexo apical nas formas infectantes), classe Conoidasida (a locomoção das formas infectantes faz-se por flexão, deslizamento ou flutuação), subclasse Coccidiasina (ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia), ordem Eucoccidiorida (ocorrência de merogonia e infecção de hospedeiros vertebrados), subordem Eimeriorina (desenvolvimento independente dos gâmetas femininos e masculinos) e família Cryptosporidiidae (ciclo de vida monoxénico, com formas de desenvolvimento localizadas sob a membrana da célula hospedeira, microgâmetas não flagelados e presença de quatro esporozoítos livres no interior do oocisto) (figura 4) [Current e Garcia, 1991; O'Donoghue, 1995; Tenter e Johnson, 1997].

Todavia, a classificação destes parasitas como coccídeos tem vindo a ser questionada, em virtude de apresentarem algumas características diferentes das dos restantes microrganismos da subclasse Coccidiasina, nomeadamente: i) a localização intracelular mas extracitoplasmática das formas de desenvolvimento endógeno; ii) a ligação do parasita à célula hospedeira com envolvimento de um organelo alimentador na base do vacúolo parasitóforo; iii) a presença de dois tipos distintos de oocistos, sendo um deles responsável por um processo de auto-infecção; iv) o pequeno tamanho dos oocistos e a ausência de algumas estruturas morfológicas, como o esporocisto e o apicoplasto; v) a insensibilidade aos fármacos utilizados no combate a outros coccídeos [Carreno *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000a, 2000b; Hijjawi *et al.*, 2002; Abrahamsen *et al.*, 2004; Petry, 2004]. Para além disso, estudos de análise filogenética com base na sequência do gene que codifica a subunidade pequena ou SSU (sigla anglo-saxónica para “small subunit”) do ácido ribonucleico ribossómico ou rRNA (sigla anglo-saxónica para “ribosomal ribonucleic acid”) têm mostrado que as espécies de *Cryptosporidium*, não só constituem um grupo separado dos restantes coccídeos, como se encontram geneticamente mais próximas dos gregarinas (subclasse Gregarinasina – parasitas de artrópodes, anelídeos e moluscos) do que dos coccídeos [Escalante e Ayala, 1995; Morrison e Ellis, 1997; Carreno *et al.*, 1998, 1999; Leander *et al.*, 2003]. A descoberta recente, em *C. parvum* e *C.*

andersoni, de formas de desenvolvimento extracelulares, semelhantes aos gamontes dos gregarinas, vem, também, argumentar contra a presente classificação de *Cryptosporidium* spp. como coccídeo e sustentar a hipótese da sua proximidade com os gregarinas [Hijjawi *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2005].

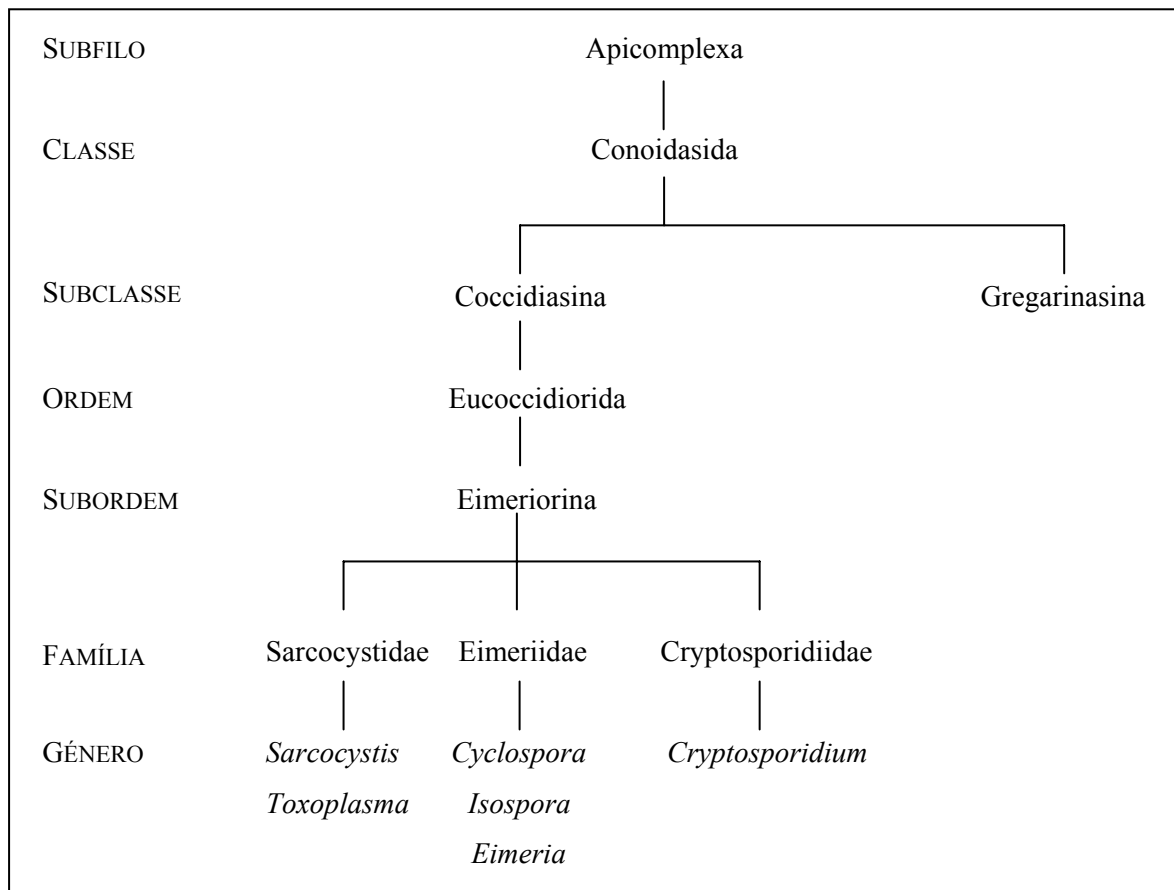


FIGURA 4 – Esquema abreviado da classificação taxonómica do género *Cryptosporidium* [Tenter e Johnson, 1997; <http://sn2000.taxonomy.nl>, consultado a 15 de Agosto de 2005]

Estas descobertas sustentam a necessidade de rever a posição do género *Cryptosporidium* dentro do filo Apicomplexa, sendo, no entanto, necessários mais estudos ultra-estruturais, bioquímicos, genéticos e filogenéticos, de modo a que as muitas incertezas ainda existentes possam ser esclarecidas. Este debate reveste-se de grande importância, na medida em que poderá permitir o desenvolvimento, não só de fármacos mais eficazes no tratamento da criptosporidiose, como de métodos de detecção imunológicos e de biologia molecular mais

específicos, nomeadamente em amostras de água, onde a abundância de gregarinas pode levar à ocorrência de reacções cruzadas e, conseqüentemente, de resultados positivos falsos [Carreno *et al.*, 1999; Hijjawi *et al.*, 2002].

Outro grande desafio que, actualmente, se coloca a taxonomistas e epidemiologistas moleculares, prende-se com a caracterização e definição das espécies de *Cryptosporidium*. De entre as 21 novas espécies, descritas após as descobertas de Tyzzer, apenas algumas são hoje consideradas válidas, nomeadamente *C. meleagridis* em perus, *C. wrairi* em porquinhos-da-índia, *C. muris* em roedores, *C. felis* em gatos, *C. serpentis* em cobras e *C. baileyi* em galinhas [Tyzzer, 1907; Iseki, 1979; Levine, 1980; Current *et al.*, 1986; Fayer e Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995; Fayer *et al.*, 1997]. Diferenças biológicas em relação às espécies aceites como válidas levaram, ainda, à recente descrição de *C. saurophilum* em lagartos [Koudela e Modrý, 1998].

Com o advento das técnicas de biologia molecular teve início a caracterização genética de inúmeros isolados de *Cryptosporidium* spp. e encetaram-se esforços no sentido de se clarificar a confusão estabelecida à volta da definição das espécies pertencentes a este género. Com base nestes estudos e noutros sobre as características ultra-estruturais, a especificidade de hospedeiro e a histopatologia destes parasitas foram descritas, recentemente, mais sete novas espécies: *C. andersoni* [Lindsay *et al.*, 2000] e *C. bovis* [Fayer *et al.*, 2005] em gado bovino, *C. canis* em cães [Fayer *et al.*, 2001], *C. hominis* (anteriormente designado *C. parvum* genótipo humano) em humanos [Morgan-Ryan *et al.*, 2002], *C. molnari* [Alvarez-Pellitero e Sitjà-Bobadilla, 2002] e *C. scophthalmi* [Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004] em peixes e *C. suis* em suínos [Ryan *et al.*, 2004] e foi reescrita a espécie *C. galli* em aves [Ryan *et al.*, 2003a].

No quadro I é apresentado um resumo das 16 espécies de *Cryptosporidium* actualmente consideradas válidas, os hospedeiros onde, até à data, foram encontradas e algumas das suas características biológicas e morfológicas.

Um dos grandes problemas associados à definição das espécies de *Cryptosporidium* tem sido a dificuldade em aplicar o conceito biológico de espécie – grupo de organismos capazes de se cruzar entre si e que apresentam isolamento reprodutivo em relação a outros grupos – dada a impossibilidade de se realizarem estudos de cruzamento genético entre isolados. Este problema advém da impossibilidade de criopreservação e de propagação contínua dos criptosporídeos *in vitro* e reflecte-se na ausência de isolados de referência que representem diferentes espécies ou genótipos. Assim, é importante que a identificação, descrição e classificação de novas espécies de *Cryptosporidium* seja feita através de uma caracterização

polifásica dos isolados, utilizando critérios relacionados com a morfologia dos oocistos, especificidade de hospedeiro, local de infecção no hospedeiro, patogenicidade, carga de oocistos excretados e caracterização molecular de vários *loci* genéticos. Contudo, esta avaliação integrada tem sido, até à data, aplicada a um número restrito de isolados. Para além disso, apresenta algumas limitações, designadamente: i) ausência de diferenças morfométricas significativas entre os oocistos de algumas espécies (quadro I); ii) de, nos estudos de infecciosidade, o desenvolvimento dos parasitas ser dependente de algumas variáveis (dose do inóculo, tempo e condições de armazenamento dos isolados, método de purificação dos oocistos, idade do hospedeiro e exposição prévia ao microrganismo); iii) da necessidade de um leque considerável de hospedeiros susceptíveis, para a realização dos estudos de transmissão cruzada, e a consequente indispensabilidade de instalações apropriadas para a sua manutenção; iv) da necessidade de elevado número de oocistos para a realização dos estudos de infecciosidade e especificidade de hospedeiro, o que nem sempre é possível obter; v) da dificuldade em distinguir entre diferenças genéticas inter-específicas e diversidade alélica intra-específica e consequente controvérsia quanto à importância a conferir aos resultados de biologia molecular [Fayer *et al.*, 2000; Egyed *et al.*, 2002; Fall *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004a].

A clarificação da taxonomia do género *Cryptosporidium* é essencial para se atingir maior percepção da epidemiologia destes parasitas, possibilitando o controlo da sua transmissão. A identificação e a caracterização polifásica das espécies de *Cryptosporidium* poderá constituir uma excelente base de trabalho para médicos, veterinários, epidemiologistas e restantes profissionais de saúde, na medida em que permitirá, não só ter acesso a espécies/genótipos de referência que possibilitem o desenvolvimento de novos fármacos, como fornecer respostas a questões sobre a patogenicidade e a virulência das várias espécies e o risco que constituem para a saúde pública [Egyed *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004a].

QUADRO I – Espécies de *Cryptosporidium* consideradas válidas, seus hospedeiros e outras características morfológicas e biológicas [Egyed *et al.*, 2003; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2004a; Xiao e Ryan, 2004; Fayer *et al.*, 2005]

ESPÉCIE	DIMENSÃO DOS OOCISTOS (µm)	HOSPEDEIROS		LOCALIZAÇÃO PREFERENCIAL
		PRINCIPAIS	OUTROS	
<i>C. muris</i> Tyzzer, 1907	8,4 × 6,3	roedores, camelos	humanos	estômago
<i>C. parvum</i> Tyzzer, 1912	5,0 × 4,5	bovinos, ovinos, caprinos, outros ruminantes, humanos	roedores, suínos, cavalos, gorilas	intestino
<i>C. meleagridis</i> Slavin, 1955	5,2 × 4,6	perus, humanos	outras aves	intestino
<i>C. wrairi</i> Vetterling, Jervis, Merrill e Sprinz, 1971	5,4 × 4,6	porquinhos-da-índia		intestino
<i>C. felis</i> Iseki, 1979	4,6 × 4,0	gatos	humanos	intestino
<i>C. serpentis</i> Levine, 1980	6,2 × 5,3	cobras, lagartos		estômago
<i>C. baileyi</i> Current, Upton e Haynes, 1986	6,2 × 4,6	galinhas, perus	outra aves	cloaca, bolsa de Fabricius, tracto respiratório
<i>C. saurophilum</i> Koudela e Modry, 1998	5,0 × 4,7	lagartos	cobras	intestino, cloaca
<i>C. galli</i> Pavlasek, 1999	8,25 × 6,30	tentilhões, galinhas, pardais do norte	outras aves	proventrículo
<i>C. andersoni</i> Lindsay, Upton, Owens, Morgan, Mead e Blagburn, 2000	7,4 × 5,5	bovinos, camelos	ovinos	abomaso
<i>C. canis</i> Fayer, Trout, Xiao, Morgan, Lal e Dubey, 2001	4,95 × 4,71	cães	raposas, coiotes, humanos	intestino
<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson, Lal e Xiao, 2002	4,86 × 5,20	humanos, macacos		intestino
<i>C. molnari</i> Alvarez-Pellitero e Sitjà-Bobadilla, 2002	4,72 × 4,47	peixes (dourada, robalo)		estômago e, por vezes, intestino
<i>C. scophthalmi</i> Alvarez-Pellitero, Quiroga, Sitjà-Bobadilla, Redondo, Palenzuela, Padrós, Vázquez e Nieto, 2004	4,44 × 3,91	peixes (pregado)		intestino e, por vezes, estômago
<i>C. suis</i> Ryan, Monis, Enemark, Sulaiman, Samarasinghe, Read, Buddle, Robertson, Zhou, Thompson e Xiao, 2004	4,6 × 4,2	suínos	humanos (1 caso descrito)	intestino
<i>C. bovis</i> Fayer, Santín e Xiao, 2005	4,89 × 4,63	bovinos, principalmente adultos	ovinos	intestino

4. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA CRIPTOSPORIDIOSE HUMANA

Os microrganismos do género *Cryptosporidium* são causadores de diarreia no Homem, dependendo a duração e a gravidade da infecção de diversos factores, entre os quais se destaca, como sendo o mais importante, o estado imunológico do hospedeiro [Chen *et al.*, 2002].

A infecção por *Cryptosporidium* spp. em indivíduos com função imunitária normal, pode ser assintomática ou sintomática, evoluindo, neste último caso, de forma aguda e autolimitada e apresentando diversas manifestações gastroenterológicas. O período de incubação da criptosporidiose pode variar entre quatro a dez dias [Chappell *et al.*, 1996; Casemore, 2000]. A um quadro inicial, caracterizado por desconforto abdominal, náuseas e anorexia, segue-se a diarreia aquosa profusa, com três a seis dejectões diárias, que pode ser acompanhada de febre e perda de peso [Casemore, 2000; Farthing, 2000]. Estes sintomas duram entre três a 14 dias, embora possam ocorrer, ocasionalmente, durante mais alguns dias [Casemore, 2000].

O período de excreção de oocistos coincide com a fase de diarreia, podendo prolongar-se por duas a três semanas após o desaparecimento da sintomatologia gastrintestinal [Chappell *et al.*, 1996; Casemore, 2000]. Chappell *et al.* (1996), efectuaram um estudo em voluntários saudáveis, tendo observado que, após a infecção e durante a fase de diarreia, a eliminação de oocistos nas fezes era, com frequência, intermitente. Os mesmos autores observaram, ainda, que o número de oocistos excretados por doentes com diarreia era cerca de 50 vezes superior ao eliminado por portadores assintomáticos.

O quadro clínico em doentes imunocomprometidos apresenta algumas diferenças em relação ao da população imunocompetente, nomeadamente quanto à gravidade e à cronicidade da diarreia e à localização extra-intestinal da infecção. Nos imunocomprometidos, especialmente nos infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH), a gravidade da doença correlaciona-se com a contagem dos linfócitos TCD4⁺, podendo manifestar-se das seguintes formas:

i) Infecção por *Cryptosporidium* spp., sem diarreia, mas evidenciando perda de peso, febre ou dores abdominais. Na maioria dos casos, a identificação de *Cryptosporidium* spp. nas fezes ou em biopsia intestinal ocorre por acaso. Esta forma regista-se em indivíduos com contagem de linfócitos TCD4⁺ próxima do normal [Blanshard *et al.*, 1992].

ii) Doença autolimitada, caracterizada por diarreia aquosa profusa, com duração inferior a dois meses, seguida de completa remissão dos sintomas e interrupção da excreção de oocistos. Estes casos surgem em indivíduos com contagem de linfócitos TCD4⁺ superior a 180 céls./mm³ [Blanshard *et al.*, 1992; Flanigan *et al.*, 1992].

iii) Doença crónica, caracterizada por diarreia aquosa profusa, com duração superior a dois meses. Estes indivíduos apresentam contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior a 140 céls./mm³ e, concomitantemente, revelam má absorção, desidratação e perda de peso acentuada [Blanshard *et al.*, 1992; Flanigan *et al.*, 1992].

iv) Doença com evolução fulminante, em que a perda de líquidos nas fezes é superior a dois litros por dia. Os doentes revelam desidratação grave, alteração do equilíbrio hidroelectrolítico e caquexia, o que pode conduzir à morte. Estes casos ocorrem, unicamente, em doentes com contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior a 50 céls./mm³ [Blanshard *et al.*, 1992; Flanigan *et al.*, 1992; Casemore, 2000].

Num estudo com duração de seis anos, realizado em Londres, em indivíduos com co-infecção por VIH e *Cryptosporidium* spp., a infecção crónica foi a forma de apresentação mais frequente (59,7%), seguindo-se-lhe os quadros clínicos de doença autolimitada (28,7%), doença de evolução fulminante (7,8%) e, por fim, infecção sem diarreia (3,9%) [Blanshard *et al.*, 1992]. Nos países em vias de desenvolvimento, as formas mais frequentes da criptosporidiose nos infectados por VIH são a doença crónica e a doença com evolução fulminante [Farthing, 2000]. O tempo de sobrevivência dos doentes depende da evolução clínica da infecção, apresentando um valor médio de cinco, 20 e 36 semanas, respectivamente, nos casos de doença com evolução fulminante, crónica e autolimitada [Blanshard *et al.*, 1992].

Os doentes com função imunitária deficiente, principalmente aqueles com infecção por VIH, podem desenvolver localizações extra-intestinais, como o estômago, o tracto biliar, o pâncreas ou os pulmões [Hunter e Nichols, 2002]. A criptosporidiose biliar é a forma mais comum da doença extra-intestinal, embora o número total de casos seja desconhecido, uma vez que o seu diagnóstico depende do recurso a técnicas invasivas, que não são realizadas por rotina [Chen *et al.*, 2002]. Na população afectada pelo grande surto de criptosporidiose de 1993, em Milwaukee, Vakil *et al.* (1996), verificaram que 87,5% dos doentes com manifestações clínicas sugerindo envolvimento das vias biliares, apresentavam contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior a 50 céls./mm³. Apesar de existirem poucas descrições de envolvimento gástrico por *Cryptosporidium* spp., alguns autores consideram que este possa ser mais

frequente do que se pensa, dada, não só a dificuldade da sua identificação, que depende da realização de endoscopia gástrica com biópsia, como a frequente ausência de sintomatologia na criptosporidiose do estômago [Rossi *et al.*, 1998; Hunter e Nichols, 2002]. A infecção do aparelho respiratório, em doentes com SIDA, tem sido descrita por diversos autores, nos casos de identificação de oocistos na expectoração, em aspirado broncoalveolar ou em biópsia pulmonar, sendo caracterizada por tosse, dispneia, febre e dor na região torácica [Farthing, 2000; Hunter e Nichols, 2002]. No entanto, o significado clínico destes achados não se encontra bem esclarecido, uma vez que a infecção respiratória por *Cryptosporidium* spp. se encontra, na maioria dos casos, associada a outros agentes infecciosos do aparelho respiratório, nomeadamente *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jirovecii* e vírus citomegálico [Farthing, 2000; Hunter e Nichols, 2002].

5. TRATAMENTO DA CRIPTOSPORIDIOSE HUMANA

Não existe, actualmente, terapêutica etiotrópica eficaz para o tratamento da criptosporidiose. Nos últimos anos, foram efectuados diversos ensaios, envolvendo mais de 100 fármacos, muitos deles com acção contra outros coccídeos, sem que, no entanto, a sua actividade contra os parasitas do género *Cryptosporidium* tivesse sido satisfatória. Todavia, alguns fármacos mostraram alguma eficácia na diminuição do número de oocistos excretados e na melhoria do quadro clínico [Farthing, 2000; Armson *et al.* 2003; Benson *et al.*, 2004].

A paramomicina foi um dos primeiros fármacos a evidenciar alguma actividade anti-*Cryptosporidium*. Quando administrada em doses elevadas, mostrou ser eficaz no tratamento da criptosporidiose no modelo animal, sendo utilizada no tratamento da doença humana. Contudo, diversos estudos efectuados em doentes com infecção VIH mostraram que a sua eficácia é variável e limitada ao período durante o qual é administrada, sendo frequentes as recidivas [Armson *et al.*, 2003; Benson *et al.*, 2004].

A nitazoxanida é um fármaco eficaz no tratamento de infecções por bactérias, helmintas e alguns parasitas eucariotas, nomeadamente *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Isospora belli*, que mostrou resultados promissores no tratamento da infecção por *Cryptosporidium* spp. [Armson *et al.*, 2003; Benson *et al.*, 2004]. Em alguns estudos efectuados em doentes com SIDA e criptosporidiose, foram observadas taxas de cura parasitológica na ordem dos 70% [Rossignol *et al.*, 1998; Armson *et al.*, 2003]. Em 2002, a nitazoxanida foi aprovada pela “U.S. Food and Drug Administration” para o tratamento da criptosporidiose em crianças não tendo, ainda, sido estabelecidas a sua eficácia e segurança em imunocomprometidos [U.S. Food and Drug Administration, 2002; Benson *et al.*, 2004].

Como a evolução clínica da criptosporidiose nos doentes imunocompetentes é diferente da dos doentes com imunodeficiência, a terapêutica para estas duas populações é, igualmente, distinta. Os doentes com sistema imunitário intacto não necessitam, em regra, de terapêutica, para além da de suporte, para correcção da desidratação provocada pela diarreia aquosa [Griffiths, 1998; Chen *et al.*, 2002; Benson *et al.*, 2004]. Nos doentes com neoplasias ou que foram sujeitos a transplante de órgãos, a interrupção da quimioterapia ou da terapêutica imunossupressora, leva à reconstituição da função imunitária e, conseqüentemente, à resolução da infecção [Griffiths, 1998]. Nos doentes com SIDA, o tratamento mais adequado

consiste na administração da terapêutica anti-retroviral potente ou HAART (acrónimo anglo-saxónico para “highly active antiretroviral therapy”), com o objectivo de baixar a virémia e restaurar, na medida do possível, a função imunitária, que é condição essencial para a resolução da infecção [Griffiths, 1998; Miao *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002]. Nos casos de diarreia severa crónica ou fulminante é, ainda, necessário repor a perda de líquidos e de electrólitos, por administração oral ou intravenosa, de soluções contendo glucose, bicarbonato de sódio, potássio, magnésio e fósforo [Benson *et al.*, 2004]. O tratamento sintomático com antidiarreicos diminui a frequência e o volume das dejeções, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida dos doentes [Griffiths, 1998; Benson *et al.*, 2004].

6. DIAGNÓSTICO DA CRIPTOSPORIDIOSE

O diagnóstico diferencial da criptosporidiose deve ser considerado em qualquer doente que apresente diarreia aguda ou persistente, principalmente, se esta ocorre em associação com imunodeficiência. Todavia, o quadro clínico gastroenterológico causado por microrganismos do género *Cryptosporidium* não é patognomónico destes parasitas, sendo, de igual modo, da responsabilidade de bactérias enteropatogénicas, vírus e outros parasitas. Deste modo, para o diagnóstico definitivo da criptosporidiose é necessária, sempre, a identificação de oocistos em amostras fecais. Quando se suspeita de criptosporidiose extra-intestinal, a pesquisa de oocistos pode ser efectuada noutras amostras, nomeadamente na expectoração, em lavado broncoalveolar, em aspirado duodenal ou na bÍlis [Petry, 2000].

6.1 DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

Os primeiros casos de infecção por *Cryptosporidium* spp. identificados no Homem e noutros animais, fundamentaram-se na observação das formas de desenvolvimento intracelular do parasita em biopsias da mucosa intestinal ou em material de autópsia [O'Donoghue, 1995; Petry, 2000].

Os métodos histoquímicos mais utilizados para o diagnóstico histológico da criptosporidiose baseiam-se na coloração pela hematoxilina-eosina e pelo giemsa [O'Donoghue, 1995].

O recurso à microscopia electrónica de transmissão, para observação de cortes histológicos, permite a observação morfológica detalhada das diversas formas de desenvolvimento intracelular dos criptosporídeos. No entanto, estes estudos são dispendiosos, demorados e apresentam baixa sensibilidade, dado que são observadas, apenas, pequenas secções da mucosa e que as infecções não se encontram uniformemente distribuídas naquela, particularmente nos casos em que a carga parasitária é baixa [O'Donoghue, 1995; Petry, 2000].

Apesar da sua utilidade na investigação das alterações citológicas e histopatológicas que acompanham a infecção, estes métodos não são adequados para o diagnóstico parasitológico de rotina [O'Donoghue, 1995; Petry, 2000].

6.2 DIAGNÓSTICO COPROLÓGICO

A introdução, em 1981, do método de coloração de Ziehl-Neelsen modificado [Henriksen e Pohlenza, 1981] constituiu um salto qualitativo no diagnóstico da criptosporidiose, permitindo a detecção de oocistos nos esfregaços fecais, associando, assim, um método de colheita não invasivo à simplicidade de execução da técnica de coloração. Esta técnica baseia-se no facto de os oocistos, depois de corados com fucsina básica fenolada, reterem este corante aquando da descoloração pelo álcool-ácido. Esta característica permite, após coloração de contraste, com o verde-de-malaquite ou com o azul-de-metileno, diferenciar os oocistos do restante material fecal. Os oocistos podem ser observados ao microscópio óptico (com uma ampliação de 200 ou 400 vezes) e apresentam-se como pequenas estruturas cor-de-rosa, de forma esférica, com um diâmetro de 4 a 6 µm, enquanto que o restante material fecal apresenta a cor do corante de contraste. Nalguns oocistos pode observar-se, ainda, a sua estrutura interna, nomeadamente os esporozoítos e os corpos residuais, que apresentam cor mais escura [Casemore *et al.*, 1985a; Petry, 2000]. Para além do Ziehl-Neelsen modificado existem outros métodos, vulgarmente utilizados para a coloração diferencial de oocistos de *Cryptosporidium* spp., nomeadamente o de auramina-fenol/fucsina ou o de Kinyoun modificado [Fayer *et al.*, 2000; Petry, 2000]. Em qualquer dos casos, a observação deve ser feita por um técnico experiente, capaz de distinguir os oocistos de outras estruturas semelhantes, como glóbulos de gordura e algumas leveduras [Casemore, 1991].

A observação de preparações fecais a fresco, para identificação de oocistos, não deve ser efectuada, uma vez que, pela sua forma e pequena dimensão, podem ser confundidos com leveduras e esporos de fungos, conduzindo a resultados falsos positivos [Casemore, 1991].

Nos casos de infecção aguda, em que a eliminação de oocistos é elevada, estes são, facilmente, observados em esfregaços fecais. Contudo, quando a infecção é ligeira ou nos casos assintomáticos, dada não só a natureza intermitente da excreção, como, ainda, a variabilidade da quantidade de oocistos excretados durante o decorrer da infecção, a observação por microscopia convencional pode tornar-se difícil, sendo necessário recorrer a técnicas de concentração das amostras fecais [Casemore, 1991]. Vários métodos estão descritos para a concentração de oocistos presentes nas fezes, nomeadamente, a centrifugação após extracção com formol-éter, a centrifugação em gradientes de cloreto de céσιο, a centrifugação em gradientes de Percoll, a flutuação em solução de sacarose e a flutuação em solução saturada de cloreto de sódio, entre outros [Weber *et al.*, 1992; Bukhari e Smith, 1995; Petry, 2000].

Estas técnicas contribuem, ainda, para a remoção de gorduras e outros detritos fecais, melhorando a qualidade da observação microscópica. No entanto, alguns autores têm referido que, durante o processamento das amostras, ocorrem perdas de oocistos, principalmente em fezes pastosas e moldadas, resultando na diminuição da sensibilidade do diagnóstico [Weber *et al.*, 1992; Bukhari e Smith, 1995; Petry, 2000].

Para além dos métodos de coloração diferencial, já referidos, nos últimos anos têm sido comercializados diversos testes imunológicos para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., com base na utilização de anticorpos monoclonais, em técnicas imunoenzimáticas e de imunofluorescência [Fayer *et al.*, 2000; Petry, 2000].

O método de imunofluorescência permite a identificação fácil e rápida dos oocistos nos esfregaços fecais, apresentando, todavia, as desvantagens do elevado custo dos “kits” existentes no mercado e da indispensabilidade de um microscópio de fluorescência, para leitura dos esfregaços. No que diz respeito à sensibilidade deste método, relativamente à coloração diferencial, existe alguma controvérsia, na medida em que alguns autores descrevem a imunofluorescência como o método mais sensível, enquanto que outros encontram sensibilidades idênticas para as duas técnicas [Griffiths, 1998; Petry, 2000].

Os testes imunoenzimáticos permitem a análise simultânea de um grande número de amostras, sendo, no entanto, de sensibilidade inferior às técnicas de imunofluorescência. Para além disso, como não é observada a morfologia dos parasitas, é impossível distinguir os verdadeiros dos falsos resultados positivos [Petry, 2000]. Num passado recente, ocorreram problemas de especificidade em alguns testes imunoenzimáticos para detecção de antígenos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes, o que deu origem a um elevado número de resultados falsos positivos [Centers for Disease Control and Prevention, 1999; Johnston *et al.*, 2003].

Uma das limitações associadas aos métodos imunológicos é a possibilidade de ocorrerem reacções cruzadas com outros microrganismos, o que leva ao decréscimo da especificidade com resultados falsos positivos [Fayer *et al.*, 2000].

Nos últimos anos, vários autores têm descrito técnicas de amplificação de ácido desoxirribonucleico ou DNA (sigla anglo-saxónica para “deoxyribonucleic acid”), por reacção em cadeia da polimerase ou PCR (sigla anglo-saxónica para “polymerase chain reaction”), a fim de detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. em amostras clínicas e ambientais, ultrapassando as limitações de sensibilidade e especificidade apresentadas pelas técnicas acima descritas. Para além de ser uma técnica sensível e específica, a PCR apresenta

vantagens, tais como a facilidade de interpretação dos resultados e a possibilidade de processamento de um elevado número de amostras em simultâneo [Petry, 2000]. Inúmeros métodos de PCR, dirigidos a diferentes regiões alvo do genoma de *Cryptosporidium* spp. estão já descritos; no entanto, estes apresentam especificidades e sensibilidades distintas, originando, alguns deles, resultados falsos positivos ou falsos negativos [Sulaiman *et al.*, 1999; Jiang e Xiao, 2003]. A baixa especificidade apresentada por alguns destes métodos encontra justificação no facto de serem utilizados oligonucleótidos iniciadores (“primers”) dirigidos a zonas do genoma muito conservadas entre os eucariotas, resultando na amplificação do DNA de outros microrganismos, nomeadamente os pertencentes ao género *Eimeria* [Sulaiman *et al.*, 1999]. A sensibilidade da reacção de PCR para a detecção de *Cryptosporidium* spp. depende de diversos factores, tais como o número de cópias da região do genoma a amplificar ou a presença de constituintes fecais inibidores da reacção [Widmer, 1998; Carey *et al.*, 2004]. Assim, os sais biliares, a bilirrubina, os metabolitos de fármacos, o DNA de outros microrganismos ou polissacáridos complexos de origem vegetal que sequestram o ião magnésio, de cuja concentração depende a actividade da enzima *Taq* DNA polimerase, ou que mimetizem o comportamento do DNA, reduzem a eficiência e a sensibilidade da reacção de PCR [Monteiro *et al.*, 1997; Petry, 2000]. Para ultrapassar este problema são necessários métodos de extracção de DNA genómico eficazes na remoção daqueles inibidores fecais. Por outro lado, é da máxima importância que a extracção de DNA seja precedida da eficiente destruição da parede dos oocistos, uma vez que esta é muito resistente e que a sua lise incompleta compromete todo o processo de extracção e, conseqüentemente, o rendimento da reacção de PCR [Alves, 1999; Carey *et al.*, 2004].

Para além da detecção de microrganismos do género *Cryptosporidium*, a técnica de PCR, associada a outros métodos de biologia molecular, como o polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição ou RFLP (sigla anglo-saxónica para “restriction fragment length polymorphism”), ou a determinação da sequência nucleotídica de fragmentos de DNA amplificado, possibilita, ainda, a identificação da espécie e/ou genótipo dos parasitas [Fayer *et al.*, 2000; Petry, 2000]. Contudo, alguns dos métodos de PCR descritos na literatura foram desenvolvidos com base em sequências de *C. parvum*; assim, e em virtude não só da elevada variabilidade genética apresentada pelos parasitas pertencentes ao género *Cryptosporidium*, como da possibilidade de outras espécies/genótipos causarem infecção humana, a sua utilidade para o diagnóstico da criptosporidiose humana é limitada, uma vez que apenas

permitem a amplificação de algumas espécies, nomeadamente *C. parvum* e *C. hominis*, não amplificando, por exemplo, *C. meleagridis* ou *C. felis* [Jiang e Xiao, 2003; Xiao e Ryan, 2004].

A reacção de PCR possui um elevado potencial como técnica de diagnóstico da criptosporidiose. Todavia, é necessário, ainda, ultrapassar alguns problemas até que seja possível adoptar métodos de referência bem definidos e adequados à sua utilização de rotina em todos os laboratórios.

7. MODOS DE TRANSMISSÃO DA CRIPTOSPORIDIOSE HUMANA

A transmissão da criptosporidiose humana ocorre quando um indivíduo susceptível ingere oocistos excretados por um hospedeiro infectado, seja por contacto directo ou, indirecto, através da água ou dos alimentos contaminados. Na figura 5 encontram-se representados os diferentes modos de transmissão da criptosporidiose ao Homem.

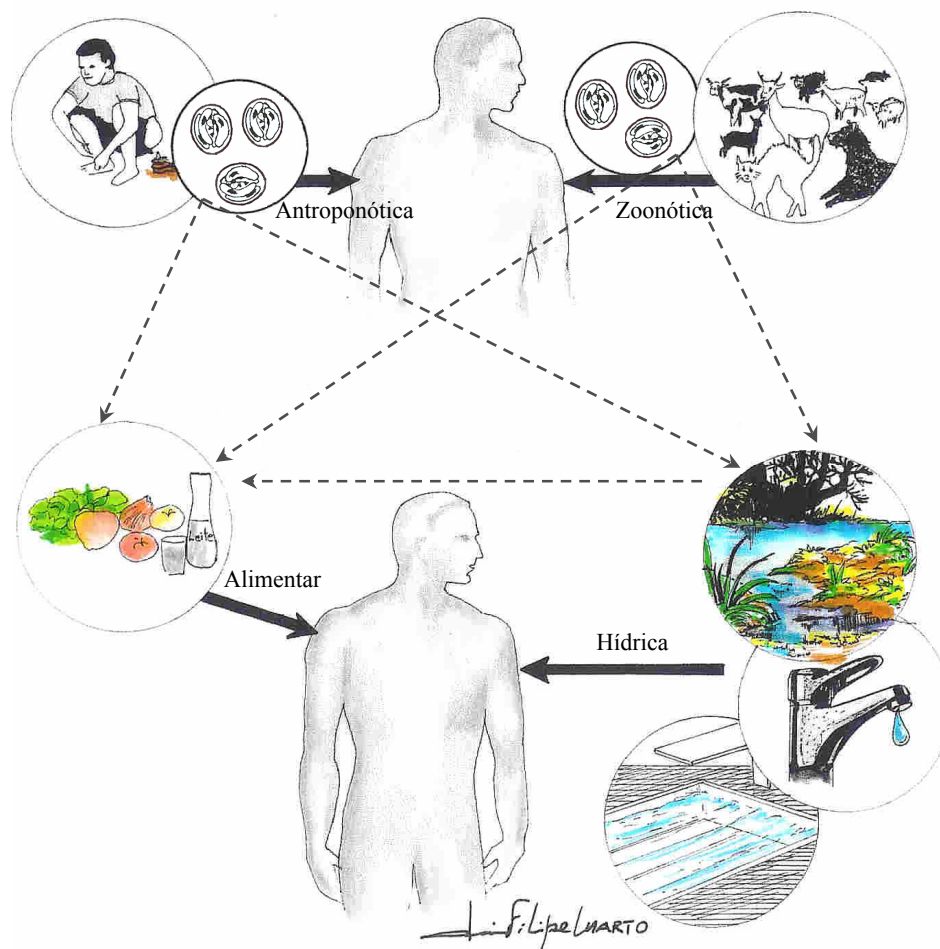


FIGURA 5 – Representação esquemática dos diferentes modos de transmissão da criptosporidiose ao Homem

7.1 TRANSMISSÃO ANTROPONÓTICA

A transmissão antroponótica processa-se por contacto directo pessoa-a-pessoa, através da via fecal-oral e é habitual no ambiente doméstico, em creches, em hospitais ou por via sexual. Este modo de transmissão surge, com frequência, de forma secundária por contacto directo com pessoas que contraíram a infecção através de animais parasitados ou por ingestão de água ou de alimentos contaminados [Juraneck, 1995; Casemore *et al.*, 1997; Dillingham *et al.*, 2002].

A transmissão pessoa-a-pessoa, no ambiente familiar, foi documentada por Newman *et al.* (1994) numa favela em Fortaleza, no Brasil, onde a criptosporidiose é endémica. Os estudos epidemiológicos realizados por MacKenzie *et al.* (1995) sobre o grande surto hídrico de Milwaukee, nos EUA, mostraram que 5% dos casos de criptosporidiose resultaram da transmissão secundária por contacto directo com pessoas que haviam sido infectadas através da água contaminada. Do mesmo modo, na Austrália, durante um surto de criptosporidiose devido à contaminação da água de várias piscinas, Puech *et al.* (2001) demonstraram que uma parte dos casos de diarreia por *Cryptosporidium* spp. resultou da transmissão antroponótica de pessoas que haviam sido infectadas por água da piscina para outras que não haviam sido expostas a essa fonte de infecção. Ribeiro e Palmer (1986) descreveram um surto de criptosporidiose que ocorreu numa família após a visita a uma quinta onde alguns dos seus elementos contactaram com cordeiros e cabritos e beberam leite não pasteurizado. Três membros da família foram infectados na quinta tendo, mais tarde, no ambiente doméstico, transmitido a infecção a outros familiares.

A transmissão directa pessoa-a-pessoa envolve, com frequência, crianças, especialmente as que usam fraldas, e as pessoas que cuidam delas, tanto no ambiente doméstico como em creches [Centers for Disease Control and Prevention, 1984; Corbett-Feeney, 1987; Melo Cristino *et al.*, 1988; Cordell e Addiss, 1994].

A transmissão antroponótica pode, ainda, acontecer no ambiente hospitalar, encontrando-se documentados casos de transmissão nosocomial de doentes entre si e entre doentes e enfermeiros e/ou pessoal auxiliar [Koch *et al.*, 1985; Navarrete *et al.*, 1991; Casemore *et al.*, 1994].

Alguns autores descreveram, em doentes com SIDA, prevalências de criptosporidiose superiores naqueles cuja infecção por VIH foi contraída por via sexual, particularmente homossexuais do sexo masculino, e sugeriram que a transmissão da infecção por *Cryptosporidium* spp. possa ter ocorrido por contacto sexual [López-Vélez *et al.*, 1995; Matos *et al.*, 1998; Sorvillo *et al.*, 1998]. Mais recentemente, na Austrália, Hellard *et al.* (2003) realizaram um

estudo epidemiológico envolvendo homossexuais do sexo masculino com criptosporidiose, tendo observado uma associação significativa entre o contacto com vários parceiros sexuais, a prática de sexo anal e a infecção por *Cryptosporidium* spp..

7.2 TRANSMISSÃO ZOONÓTICA

A transmissão zoonótica da criptosporidiose ao Homem resulta do contacto directo com animais infectados [Juraneck, 1995; Casemore *et al.*, 1997].

Este modo de transmissão pode ocorrer por exposição ocupacional, em tratadores de animais ou em estudantes de veterinária, após o contacto com animais infectados [Lengerich *et al.*, 1993; Preiser *et al.*, 2003]. No Reino Unido e na República da Irlanda foi, ainda, descrita a infecção de crianças e adultos por *Cryptosporidium* spp. na sequência de visitas de estudo ou de lazer a quintas onde existiam vitelos, cordeiros e cabritos infectados por este protozoário [Ribeiro e Palmer, 1986; Pritchard e Fleetwood, 1995; Sayers *et al.*, 1996; Elwin *et al.*, 2001].

Os animais de companhia, particularmente cães e gatos, têm, por vezes, sido apontados como possíveis fontes de infecção para o Homem. No entanto, até à data, não foi possível confirmar nenhum caso de criptosporidiose humana resultante da transmissão zoonótica por animais de companhia infectados [Juraneck, 1995; Glaser *et al.*, 1998]. A presença de oocistos nas fezes de um animal não constitui prova da origem da infecção do seu dono, não só porque ambos podem ter sido expostos à mesma fonte de infecção, como porque o animal pode ter sido infectado pelo seu dono [Casemore *et al.*, 1997]. Apesar de não ter sido provada a transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* spp. entre animais de companhia e o Homem, a adopção de cuidados básicos de higiene, principalmente por parte de indivíduos com função imunitária diminuída, é essencial como medida de prevenção de uma eventual infecção [Juraneck, 1995; Glaser *et al.*, 1998].

7.3 TRANSMISSÃO HÍDRICA

A transmissão hídrica da criptosporidiose encontra-se associada à contaminação de cursos e reservatórios de água com parasitas do género *Cryptosporidium* e acontece após a ingestão de água contaminada com oocistos viáveis [Casemore *et al.*, 1997].

Entre 1984 e 1999, foram documentados nos EUA, Japão e Reino Unido, 49 surtos de criptosporidiose devidos ao consumo de água de abastecimento contaminada [Fayer *et al.*, 2000]. Nos EUA, no período compreendido entre 1991 e 2000, 8,5% (11/130) dos surtos de gastroenterite, com origem na água de abastecimento público, foram associados à contaminação por *Cryptosporidium* spp. [Hlavsa *et al.*, 2005]. Em muitos casos, os estudos efectuados, para apurar as causas dessa contaminação, identificaram falhas nas estações de tratamento de águas residuais e a ocorrência de chuvas fortes como os factores responsáveis pelo aumento do número de parasitas na água superficial e em reservatórios de água para abastecimento [Rose *et al.*, 2002; Fayer, 2004].

Na Europa, à excepção do Reino Unido, são escassos os casos de surtos hídricos com origem na água superficial ou de abastecimento, que se encontram documentados. O primeiro ocorreu na Holanda, em 1995, embora não tenha sido possível identificar a fonte de contaminação que esteve na origem da infecção humana [van Asperen *et al.*, 1996]. Em Itália, em 1997, a contaminação de um reservatório de água ligado à rede de abastecimento público provocou, numa comunidade de reabilitação de toxicodependentes, um surto de criptosporidiose, que teve consequências graves para os indivíduos infectados, dado que muitos apresentavam imunossupressão induzida por VIH [Pozio *et al.*, 1997]. Em 2001, numa cidade no leste de França, a provável contaminação do sistema de abastecimento público, com efluentes de esgotos humanos, provocou um surto que os autores estimaram ter afectado 563 pessoas [Dalle *et al.*, 2003]. Na República da Irlanda, em 2002, foi documentado um surto com origem na água da rede de abastecimento público. Essa água era proveniente de um lago alimentado por uma nascente e havia sido tratada com cloro, mas não filtrada [Jennings e Rhatigan, 2002]. Em Inglaterra e nos EUA, foram, também, registados casos de surtos de criptosporidiose associados ao consumo de água subterrânea, nomeadamente de poços e furos profundos [Dworkin *et al.*, 1996; Willocks *et al.*, 1998].

Durante os últimos 20 anos, nos EUA, Canadá, Reino Unido, Austrália e Nova Zelândia, a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água de recreio, designadamente em piscinas públicas e lagos, foi responsável pela transmissão da criptosporidiose a mais de 10.000 pessoas. Nos Estados Unidos da América, entre 1991 e 2000, 37,7% (40/106) dos surtos de gastroenterite com origem em água de recreio, foram devidos à sua contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* spp. [Hlavsa *et al.*, 2005]. Na Suécia, em 2002, foi registado um surto de criptosporidiose associado à contaminação da água de uma piscina pública, onde

foram infectadas entre 800 a 1.000 pessoas, a maioria das quais crianças entre os seis e os 12 anos [Insulander *et al.*, 2005]. Nas piscinas públicas, a transmissão é facilitada pela associação de factores diversos, como a sua grande percentagem de utilização, os acidentes fecais provocados por crianças com fraldas ou indivíduos incontinentes e a elevada resistência dos oocistos à cloração [Nichols, 1999; Fayer *et al.*, 2000; Puech *et al.*, 2001; Veverka *et al.*, 2001]. Os rios e lagos utilizados para fins lúdicos, para além dos já referidos acidentes fecais, encontram-se, ainda, sujeitos a outras fontes de contaminação, tanto de origem humana como animal [Centers for Disease Control and Prevention, 1998; Kramer *et al.*, 1998; Fayer, 2004].

O impacto da contaminação hídrica também se faz sentir na indústria alimentar, na medida em que a água contaminada pode ser utilizada para irrigação ou para a lavagem e preparação de alimentos. Thurtston-Enriquez *et al.* (2002) investigaram, em três países da América Central (Costa Rica, México e Panamá), a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água destinada à irrigação de alimentos consumidos crus, tendo observado a presença destes parasitas em 36% das amostras estudadas.

7.4 TRANSMISSÃO ATRAVÉS DE ALIMENTOS CONTAMINADOS

A criptosporidiose tem sido, por vezes, associada ao consumo de determinados alimentos contaminados, particularmente vegetais, fruta e leite não pasteurizado [Millar *et al.*, 2002; Duffy e Moriarty, 2003; Fayer *et al.*, 2004]. Esta associação resulta do facto destes alimentos serem, com frequência, consumidos crus, sem que lhes seja aplicado qualquer processo térmico que inactive os oocistos contaminantes. Todavia, e dado que o período de incubação da criptosporidiose pode ser longo (entre quatro a dez dias), muitas vezes é difícil estabelecer uma ligação entre a infecção e o consumo de determinado alimento [Duffy e Moriarty, 2003].

No Peru e na Costa Rica, foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em diversos legumes que estavam para venda em mercados locais, nomeadamente alfaces, salsa, coentros, couves, tomates, pepinos, cenouras e rabanetes [Monge e Chinchilla, 1996; Ortega *et al.*, 1997]. Na Noruega, Robertson e Gjerde (2001b) observaram a presença destes parasitas não só em alfaces e em rebentos de feijão mungo, como na água de um rio utilizada para irrigação.

Os bivalves possuem a capacidade de filtrar grande volume de água. Assim, quando em presença de água contaminada por *Cryptosporidium* spp., eles conseguem concentrar e reter nas brânquias e na hemolinfa um elevado número de oocistos. O facto de serem, com

frequência, consumidos crus ou mal cozinhados, aumenta o risco de transmissão deste parasita ao Homem [Fayer *et al.*, 2000]. A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em bivalves tem sido descrita por vários autores, em diversos países. Fayer *et al.* (1999) e (2003) identificaram oocistos de *C. hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis* em ostras e amêijoas de diversos locais da costa atlântica dos EUA. Oocistos de *C. parvum* foram, também, identificados em Itália, em pés-de-burro, colhidos na costa do Mar Adriático [Traversa *et al.*, 2004a] e em mexilhões de várias zonas da República da Irlanda [Graczyk *et al.* 2004]. Em Espanha, foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 34% (69/203) dos bivalves (ostras, mexilhões, amêijoas e berbigão), recolhidos na costa da Galiza [Gómez-Couso *et al.*, 2003]. Em Portugal, Alonso *et al.* (2003) detectaram a presença de criptosporídeos em 13,5% (13/96) dos bivalves estudados (berbigão, amêijoa, mexilhão, lambujinha e conquilha), que se destinavam ao consumo humano. Apesar dos resultados destas investigações testemunharem a frequência da contaminação de bivalves por oocistos de *Cryptosporidium* spp., não foram, até à data, descritos surtos ou casos esporádicos de criptosporidiose associados ao consumo destes alimentos [Fayer *et al.*, 2004].

O primeiro surto de criptosporidiose associado ao consumo de alimentos contaminados aconteceu nos EUA, em 1993, em 160 participantes de uma feira agrícola que ingeriram cidra de maçã contaminada. Para além destes casos de transmissão primária por ingestão da cidra, os autores identificaram, ainda, 53 casos secundários de transmissão antroponótica no ambiente doméstico [Millard *et al.*, 1994]. A ingestão de leite não pasteurizado foi, também, associada a vários casos de criptosporidiose em crianças, na Austrália e no Reino Unido [Gelletlie *et al.*, 1997; Harper *et al.*, 2002]. Surtos de criptosporidiose devidos à contaminação de alimentos pelas pessoas que os prepararam encontram-se, também, documentados. Um desses casos diz respeito à contaminação de uma salada de frango por uma pessoa que havia trocado a fralda a uma criança [Centers for Disease Control and Prevention, 1996] e, outro, a um funcionário de uma cafetaria que estava com diarreia e que preparou fruta e vegetais destinados a serem consumidos crus [Quiroz *et al.*, 2000].

8. CONTROLO E PREVENÇÃO DA CRIPTOSPORIDIOSE

Uma vez que as infecções por *Cryptosporidium* spp. têm início após a ingestão de oocistos, o controlo da transmissão da criptosporidiose só poderá fazer-se através de medidas que limitem ou eliminem a presença de oocistos no ambiente e que impeçam a sua dispersão, a fim de evitar ou de reduzir o seu contacto com hospedeiros susceptíveis. Este é, no entanto, um objectivo difícil de atingir, dada a ubiquidade destes parasitas e a sua enorme resistência, não só a condições de “stress” ambiental, como à maioria dos desinfectantes e anti-sépticos normalmente utilizados [Fayer *et al.*, 1997].

A água contaminada constitui uma das principais vias de transmissão deste protozoário. Os métodos físicos e químicos, geralmente utilizados no tratamento da água, como a coagulação, a floculação, a sedimentação, a filtração e o tratamento químico não são eficazes na remoção e na inactivação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.. A remoção física dos oocistos presentes na água torna-se difícil, dado que as suas dimensões são cerca de um terço inferiores à do tamanho dos orifícios dos filtros convencionais, utilizados no tratamento da água (que são eficazes na remoção de quistos de amebas e de *Giardia* sp.). Os oocistos são, ainda, resistentes aos desinfectantes vulgarmente utilizados no tratamento da água de abastecimento e de recreio, como o cloro ou a monocloramina, mesmo em elevadas concentrações e após exposições prolongadas. Vários estudos têm sido efectuados no sentido de encontrar desinfectantes alternativos eficazes na eliminação destes parasitas da água. Entre os compostos que suscitaram resultados mais promissores, encontram-se o dióxido de cloro, a amónia e o óxido de etileno. No entanto, a toxicidade apresentada pelos dois últimos constitui um entrave à sua utilização. O ozono e a irradiação com luz ultra violeta têm sido alvo de extensa investigação nos últimos anos, sendo os resultados obtidos bastante promissoras [Rose *et al.*, 2002; Carey *et al.*, 2004; Fayer, 2004; Rochelle *et al.*, 2005].

A temperatura é um factor que influencia a sobrevivência dos oocistos. Estes possuem a capacidade de sobreviver na água, incluindo na do mar, a temperaturas entre 4°C e 22°C. O aumento da temperatura diminui a viabilidade e a capacidade infectante dos oocistos devido à desnaturação das proteínas da parede e à exposição dos esporozoítos a condições às quais não sobrevivem [Carey *et al.*, 2004]. Estudos efectuados com oocistos, em solução aquosa desionizada, mostraram que estes mantêm a capacidade de produzir infecção em ratinhos

durante seis meses, quando conservados a 0°C, 5°C, 10°C, 15°C e 20°C. Quando armazenados a 25°C e 30°C, o tempo durante o qual se mantêm infecciosos diminui para três meses [Fayer, 2004]. Tamburrini *et al.* (1999), observaram que oocistos mantidos em água salgada artificial, no escuro, sob oxigenação moderada e a uma temperatura de 6 a 8°C mantêm a sua capacidade infectante durante 12 meses. Robertson *et al.* (1992), mostraram que a congelação rápida em solução aquosa a -70°C é letal para todos os oocistos. No entanto, quando congelados a -22°C, 10% dos oocistos permanece viável por um período de seis dias. Outros autores descreveram que oocistos armazenados a 5°C e -10°C mantêm a sua capacidade infectante até sete dias, diminuindo esse tempo para 24 e cinco horas, quando congelados, respectivamente, a -15°C e a -20°C [Fayer e Nerad, 1996]. Estes dados demonstram a resistência dos oocistos a baixas temperaturas e a possibilidade de permanecerem viáveis, por exemplo, em cubos de gelo.

Os oocistos são muito sensíveis à dessecação, perdendo a sua viabilidade após quatro horas de exposição ao ar, numa lâmina, à temperatura ambiente [Robertson *et al.*, 1992].

Experiências realizadas em diferentes tipos de solo mostraram a perda significativa de viabilidade dos oocistos, após alguns ciclos de congelação-descongelação, sendo o tempo durante o qual os oocistos estão sujeitos à congelação um factor determinante para que tal aconteça. Em solos secos, a inactivação dos oocistos ocorre mais rapidamente do que em solos húmidos. Em condições de temperatura idênticas, a perda de viabilidade dos oocistos no solo acontece mais depressa do que na água, sugerindo que outros factores, para além da temperatura, possam estar envolvidos no processo [Kato *et al.*, 2002].

A extraordinária robustez apresentada pelos oocistos de *Cryptosporidium* spp. acima descrita, torna difícil a concretização eficaz do controlo da transmissão da criptosporidiose. Perante tais dificuldades, a adopção de medidas de prevenção adequadas constitui o primeiro passo no sentido de evitar o contacto do Homem com estes parasitas. Como as consequências da infecção podem ser particularmente graves em imunodeficientes, esta população deverá ter cuidados especiais para prevenir uma eventual infecção.

Entre algumas das medidas recomendadas, com o objectivo de prevenir a criptosporidiose humana, destacam-se as seguintes [Carey *et al.*, 2004; Centers for Disease Control and Prevention, 2004; Hlavsa *et al.*, 2005]:

i) Adoptar boas práticas de higiene – lavar as mãos depois de ir à casa de banho, depois de mudar fraldas a crianças, antes de preparar alimentos e antes de comer. As pessoas com

diarreia devem, ainda, proteger os outros de uma possível infecção, inibindo-se de utilizar piscinas e locais públicos com água de recreio.

ii) Evitar o contacto com água que possa estar contaminada – não engolir água de recreio, não beber água de poços, de rios, de lagos e de fontes não tratada e não beber água ou gelo em países onde a qualidade da água de abastecimento seja duvidosa. Em caso de dúvida quanto à sua qualidade, a água deverá ser fervida antes de consumida.

iii) Evitar ingerir alimentos contaminados – lavar bem ou tirar a casca à fruta e aos legumes e evitar comer alimentos crus, em países onde o tratamento da água é deficiente.

iv) Evitar o contacto com ruminantes domésticos, especialmente vitelos e cordeiros.

v) Evitar práticas sexuais que envolvam o contacto fecal-oral.

Nas instituições de saúde, infantários e centros de dia, para além da adopção de rigorosos hábitos de higiene, o modo mais eficaz de prevenir a transmissão da infecção consiste na criação de áreas restritas para os doentes infectados, evitando o seu contacto com outras pessoas susceptíveis [Keusch *et al.*, 1995; Carey *et al.*, 2004].

A diminuição da contaminação ambiental constitui, igualmente, uma importante medida de prevenção, podendo ser conseguida através da redução da transmissão da infecção entre animais. Nas explorações pecuárias é essencial um bom maneio higio-sanitário das instalações, separar os animais jovens dos adultos, reduzir a densidade de animais num mesmo espaço, isolar os animais doentes, impedir o acesso dos animais a zonas próximas de cursos de água e tratar o estrume dos animais (secagem pelo calor, compostagem), antes da sua utilização como fertilizante do solo [Duffy e Moriarty, 2003; Ramirez *et al.*, 2004].

9. EPIDEMIOLOGIA DA CRIPTOSPORIDIOSE

Cryptosporidium spp. é causa de doença gastrointestinal no Homem e noutros animais em todo o Mundo, tendo, nos EUA, sido considerado agente infeccioso emergente pelo “Centers for Disease Control and Prevention”, a “Environmental Protection Agency”, a “American Water Works Association”, o “National Institutes of Health” e a “Food and Drug Administration” [Tzipori, 2002].

A epidemiologia destes parasitas é fortemente influenciada por uma série de características que facilitam a sua ampla transmissão:

i) O pequeno tamanho dos oocistos, a sua baixa velocidade de sedimentação e a consequente elevada capacidade de flutuação facilitam o seu transporte e a sua dispersão no ambiente [Meinhardt *et al.*, 1996; Dillingham *et al.*, 2002].

ii) Os oocistos são muito robustos, podendo permanecer viáveis na água e no solo por vários meses, em condições de “stress” ambiental, que seriam letais para muitos outros agentes infecciosos. Para além disso, a sua resistência aos processos químicos e físicos, utilizados no tratamento da água, facilitam a sua transmissão, constituindo um enorme desafio para estruturas envolvidas na distribuição de água [Robertson *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 2002; Fayer, 2004].

iii) O ciclo de vida é monoxénico, isto é, completa-se num único hospedeiro. O tempo necessário para que o ciclo de vida se complete é de cerca de três dias [Meinhardt *et al.*, 1996].

iv) Os oocistos são eliminados já esporulados, significando que, após a excreção, a infecção de novos hospedeiros pode ser imediata, sobretudo através do contacto pessoa-a-pessoa. O mesmo não acontece, por exemplo, com *Cyclospora cayetanensis* que é excretado sob a forma não esporulada, sendo necessárias condições ambientais adequadas para que ocorra a sua maturação e se torne infeccioso, processo que pode demorar entre uma a duas semanas [Dillingham *et al.*, 2002; Eberhard e Arrowood, 2002].

v) A dose infectante para o Homem é pequena. Estudos efectuados com voluntários saudáveis e três isolados diferentes de *Cryptosporidium* spp., mostraram que a dose infectante pode variar entre 9 e 1.042 oocistos, dependendo dos isolados [Okhuysen *et al.*, 1999, 2002]. A aplicação de um modelo matemático de infecção ao surto que ocorreu em Milwaukee, em

1993, sugere que, para alguns casos, a dose infectante possa ter sido inferior a 10 oocistos/L de água [Eisenberg *et al.*, 1998].

vi) A distribuição ubíqua e a ausência de especificidade de hospedeiro apresentadas por algumas espécies, particularmente *C. parvum*, contribui para o elevado número de reservatórios, aumentando o seu potencial zoonótico [Dillingham *et al.*, 2002].

vii) O número de oocistos excretado é muito elevado, para o que contribuem os ciclos internos de auto-infecção, perpetuados pelos merontes tipo I e pelos oocistos de parede fina. Estudos em vitelos demonstraram que estes podem excretar entre 10^5 e 10^7 oocistos por grama de fezes durante um período de sete a dez dias, pensando-se que números semelhantes sejam, de igual modo, excretados por humanos com criptosporidiose. Este facto contribui para o nível elevado de disseminação e de contaminação ambiental e favorece a transmissão [Meinhardt *et al.*, 1996; Fayer *et al.*, 1997].

viii) A existência de múltiplos modos de transmissão (antroponótica, zoonótica e através da água ou de alimentos contaminados), que podem ocorrer em simultâneo, aumenta a sua eficiência [Casemore *et al.*, 1997].

9.1 A CRIPTOSPORIDIOSE NO HOMEM

A criptosporidiose humana, ocorre em todas as regiões do Planeta, embora seja desconhecida a sua verdadeira prevalência. Tal prende-se com razões diversas, entre as quais se destacam o facto de muitos doentes com diarreia não procurarem assistência médica, de alguns médicos não se encontrarem familiarizados com estes parasitas e não requisitarem a sua pesquisa nas fezes, de muitos laboratórios não efectuarem as técnicas adequadas para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. ou, ainda, porque muitas das infecções são assintomáticas não sendo, por isso, investigadas [Wheeler *et al.*, 1999; Dietz *et al.*, 2000; Hörman *et al.*, 2004].

O contacto com *Cryptosporidium* spp. nem sempre resulta em infecção patente. Quando a exposição ao parasita é frequente, as infecções tornam-se assintomáticas em consequência do desenvolvimento de imunidade à infecção [Casemore *et al.*, 1997; Frost *et al.*, 1997]. Estas infecções são mais comuns em regiões onde a criptosporidiose é endémica, particularmente em zonas pobres, com elevada densidade populacional, condições de saneamento deficientes ou ausentes e baixa qualidade da água de abastecimento e, em zonas rurais, onde é frequente o

contacto com animais infectados [Casemore *et al.*, 1997; Fayer *et al.*, 2000]. Nas populações cuja água de abastecimento apresenta níveis baixos e constantes de contaminação com oocistos, observa-se, também, um menor número de casos sintomáticos da infecção [Frost *et al.*, 1997, 2002].

Tanto as infecções assintomáticas como as sintomáticas não identificadas desempenham um papel importante na cadeia epidemiológica da infecção, principalmente em populações mais susceptíveis, como é o caso das crianças, dos idosos e dos doentes com imunodeficiências [Hörman *et al.*, 2004].

Os números disponíveis sobre a infecção por *Cryptosporidium* spp., dizem respeito, unicamente, aos casos em que ocorre doença, pouco se sabendo sobre o nível endémico da infecção na população. Uma vez que a infecção por este parasita desencadeia uma resposta serológica específica, os estudos de seroprevalência podem ser úteis para estimar a respectiva prevalência na população [Frost *et al.*, 2002].

9.1.1 ESTUDOS SEROEPIDEMIOLÓGICOS

Alguns estudos seroepidemiológicos sustentam que a infecção é frequente nos países industrializados e é quase universal nas regiões em vias de desenvolvimento [Kosek *et al.*, 2001].

Um estudo recente, efectuado em sete zonas geográficas dos EUA, revelou que mais de 20% das crianças e jovens até aos 21 anos apresentam resposta serológica do tipo IgG a dois marcadores antigénicos específicos de *Cryptosporidium* spp., número que aumenta para valores superiores a 50% nos indivíduos com idade superior a 21 anos. Esta percentagem de seropositividade aumenta com a idade, sendo que cerca de 70% da população com idade superior a 70 anos apresenta evidência serológica de infecção anterior [Frost *et al.*, 2004]. Estes valores são semelhantes aos encontrados, para os mesmos marcadores antigénicos, na população adulta em duas cidades do Canadá (>69% em Collingwood e 45% em Toronto) e na Austrália (>60% em Sidney e Melbourne) [Frost *et al.*, 2000b, 2000c]. Na Europa, numa cidade do norte de Itália, foram descritas percentagens de seropositividade superiores a 82%, em adultos com mais de 45 anos [Frost *et al.*, 2000a] e a 68% numa cidade da Rússia, a norte de Moscovo [Egorov *et al.*, 2004].

Alguns autores sugerem que estas percentagens de seropositividade possam estar associadas à qualidade da água. Estes investigadores efectuaram estudos de seroprevalência em habitantes de várias cidades dos EUA, com acesso a água proveniente de diferentes

origens e de qualidade variável, tendo observado maior percentagem de indivíduos com resposta serológica detectável nas cidades abastecidas por água superficial, de menor qualidade, do que nos residentes em cidades supridas por água subterrânea, de qualidade mais elevada [Frost *et al.*, 2001, 2002].

Nos países em vias de desenvolvimento, observam-se percentagens de seroprevalência elevadas desde a infância. Na Guatemala, Steinberg *et al.* (2004) encontraram, em crianças até ao primeiro, segundo e terceiro anos de idade, prevalências de IgG anti-*Cryptosporidium* de 27%, 70% e 73%, respectivamente. Na cidade de San António, Estado do Texas, EUA, foram observadas, para os grupos etários 0-4 anos, 5-8 anos e 9-13 anos, seroprevalências de 25%, 58% e 70%, respectivamente. No mesmo estudo, e para os mesmos grupos etários, as percentagens de seropositividade encontradas em algumas colónias junto da fronteira do Estado do Texas com o México foram de 82%, 85% e 97% [Leach *et al.*, 2000].

Estes estudos não podem, contudo, ser vistos como indicadores de infecção activa, constituindo, somente, evidência de exposição ou de infecções prévias [O'Donoghue, 1995].

9.1.2 ESTUDOS COPROLÓGICOS

As prevalências de infecção por *Cryptosporidium* spp. obtidas através de estudos coprológicos são bastante inferiores aos valores encontrados nos estudos serológicos.

Estimativas baseadas em dados fornecidos por diversas entidades de saúde pública dos Estados Unidos da América indicam que cerca de 2% das fezes submetidas, anualmente, a exame parasitológico são positivas para *Cryptosporidium* spp., o que corresponde a 300.000 pessoas infectadas [Mead *et al.*, 1999]. Um estudo de meta análise baseado em dados epidemiológicos de 13 trabalhos efectuados em países nórdicos (Dinamarca, Finlândia, Noruega e Suécia) aponta estimativas de prevalência anual da infecção por *Cryptosporidium* spp. na população sintomática e assintomática de 2,91% e 0,99% respectivamente. Estes valores correspondem a 12.530 casos anuais de infecção por cada 100.000 habitantes, sendo que 3.340 são sintomáticos e 9.190 assintomáticos. Apesar da prevalência da infecção ser inferior na população assintomática, quando comparada com a sintomática, o número de casos assintomáticos representa cerca de 73% do total de casos anuais [Hörman *et al.*, 2004].

O problema da criptosporidiose é mais dramático nos infectados por VIH, sobretudo nos países não industrializados, dada a dimensão alarmante de indivíduos com infecção VIH/SIDA, a maioria dos quais sem acesso à terapêutica anti-retrovírica [Farthing, 2000].

Nos países em vias de desenvolvimento, a criptosporidiose é uma doença endêmica, sendo uma das causas mais frequentes de diarreia persistente em crianças até aos dois anos de idade [Casemore *et al.*, 1997; Nwabuisi, 2001; Pereira M.G.C. *et al.*, 2002; Adjei *et al.*, 2004]. Na população adulta imunocompetente a infecção é, com frequência, assintomática [Casemore *et al.*, 1997]. Um estudo efectuado no México, em três comunidades pobres sem água canalizada nem saneamento básico, revelou que em 70% das famílias existia, pelo menos, um membro com infecção por *Cryptosporidium* spp. e, em 56% dos casos, a infecção era assintomática [Redlinger *et al.*, 2002]. Situação similar foi identificada por Chai *et al.* (2001), numa aldeia rural da Coreia do Sul, onde 66% da população, com mais de 50 anos, apresentava oocistos nas fezes, sendo que mais de metade estava assintomática.

Nos países pobres, os episódios diarreicos ocorrem, com maior frequência e duração, em crianças malnutridas, embora não se saiba se a malnutrição resulta da infecção por *Cryptosporidium* spp. ou se a infecção acontece em consequência daquela [Checkley *et al.*, 1997; Guerrant *et al.*, 2002; Tumwine *et al.*, 2003]. Alguns autores demonstraram que a diarreia em crianças, durante os dois primeiros anos de vida, tem efeito negativo no seu crescimento (peso e altura), desenvolvimento cognitivo e rendimento escolar [Mølbak *et al.*, 1997; Agnew *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 2000; Guerrant *et al.*, 2002]. Num estudo efectuado numa favela em Lima, no Peru, Checkley *et al.* (1997), (1998) verificaram que as crianças que desenvolviam criptosporidiose durante os primeiros meses de vida apresentavam, ao fim de um ano, menos 1 cm de altura do que as que não haviam experimentado diarreia por *Cryptosporidium* spp.. Guerrant *et al.* (1999), realizaram um estudo de longa duração em crianças, numa favela em Fortaleza, no Brasil, tendo observado uma associação, estatisticamente significativa, entre o número de infecções por *Cryptosporidium* spp., sofridas durante a infância, e a diminuição da função cognitiva e robustez física, apresentadas por essas crianças, quatro a sete anos mais tarde. Estes défices de desenvolvimento físico e cognitivo, resultantes de diarreia persistente, em crianças malnutridas, em regiões pobres, não só apresentam elevados custos humanos e económicos para estes países, como perpetuam o ciclo da pobreza e do subdesenvolvimento [Guerrant *et al.*, 2002].

Nos países industrializados, a infecção é mais comum em crianças entre o primeiro e o quinto ano de idade ocorrendo, também, em adultos, na sequência de contactos familiares com crianças infectadas, de exposição ocupacional, de viagens a zonas onde a doença é

endêmica ou do contacto com animais infectados. A população, em geral, pode, ainda, ser afectada por surtos de criptosporidiose, após a ingestão de água ou de alimentos contaminados com oocistos [Casemore *et al.*, 1997; Farthing, 2000]. Enquanto que, em países como a Austrália e os Estados Unidos da América, a criptosporidiose é uma das infecções humanas, transmitidas por via hídrica, mais prevalentes, a importância da infecção na Europa parece ser bastante variável. A maioria dos surtos de origem hídrica documentados no Velho Continente dizem respeito ao Reino Unido [Fricker e Crabb, 1998].

Nos Estados Unidos da América, segundo um relatório do CDC, para o período compreendido entre 1999 e 2002, o número de casos de criptosporidiose humana, declarados anualmente, foi de 2.769, 3.128, 3.787 e 3.016, respectivamente [Hlavsa *et al.*, 2005]. Os autores crêem, contudo, que estes valores estejam muito aquém da realidade. Os estudos disponíveis sobre a prevalência da criptosporidiose humana na Europa são escassos, estando limitados a um pequeno número de países, dos quais se destaca o Reino Unido, onde esta é uma doença frequente e de declaração obrigatória, encontrando-se os casos esporádicos e surtos de infecção por *Cryptosporidium* spp. bem documentados. Na Alemanha, embora menos frequente, a infecção é, de igual modo, de declaração obrigatória. No quadro II, são apresentados os números totais de casos declarados anualmente nestes países e, quando disponibilizada, a percentagem relativa ao grupo etário dos zero aos quatro anos, de acordo com dados das entidades oficiais de vigilância epidemiológica.

QUADRO II – Número de casos de criptosporidiose declarados anualmente em três países europeus

PAÍS	N.º DE CASOS DE CRIPTOSPORIDIOSE (% CASOS 0-4 ANOS)					REFERÊNCIA
	2000	2001	2002	2003	2004	
Alemanha	-	1.481 (24%)	816 (29%)	885 (29%)	935 (21%)	“Federal Statistical Office / Statistisches Bundesamt”, 2005
Reino Unido	5.774	3.625	2.992	5.863 (29%)	3.547 (31%)	“Health Protection Agency”, 2005a, 2005b
Irlanda do Norte	417 (54%)	360 (39%)	126 (59%)	140 (44%)	137 (53%)	“Communicable Disease Surveillance Centre”, 2005

De entre os estudos epidemiológicos realizados na Europa é de referir um trabalho recente, efectuado em Barcelona, entre 2000 e 2004, envolvendo 1.473 doentes imunocompetentes com diarreia, onde foi encontrada uma prevalência global de criptosporidiose de 2,4% (35/1.473), sendo que 68,6% (24/35) dessas infecções foram observadas em crianças [González-Moreno *et al.*, 2004]. Num outro estudo, realizado na Holanda, entre 1996 e 1997, foram detectados oocistos nas fezes de 2,1% (18/857) dos doentes com gastroenterite, descendo esse valor para 0,2% (1/574) na população sem queixas gastroenterológicas [de Wit *et al.*, 2001].

Relativamente à população com infecção VIH/SIDA, um estudo multicêntrico, envolvendo 17 países europeus, com 6.548 doentes, conduzido entre 1979 e 1989, encontrou a percentagem global de infecção por *Cryptosporidium* spp. de 6,6% [Pedersen *et al.*, 1996].

Em Portugal, a informação disponível sobre a criptosporidiose humana é escassa. Melo Cristino *et al.* (1988) descreveram um surto, o primeiro documentado em Portugal, que afectou 27% (28/103) das crianças e uma educadora do infantário do Hospital de Santa Maria, em Lisboa. Sete anos mais tarde, foi descrito um caso clínico de criptosporidiose disseminada num doente com SIDA, no Hospital de Santa Maria [Ferreira *et al.*, 1995]. Em 1998, Matos *et al.* publicaram os resultados de um estudo efectuado entre 1988 e 1997 envolvendo doentes seropositivos para VIH com diarreia, também no Hospital de Santa Maria, onde a prevalência da criptosporidiose encontrada foi de 8% (36/465). A mesma autora, apresentou, quatro anos depois, um novo trabalho, envolvendo seropositivos para VIH de vários hospitais da região de Lisboa, abrangendo o período 1999-2001, tendo encontrado infecção por *Cryptosporidium* spp. em 9,7% (16/165) da amostra do estudo [Matos *et al.*, 2002].

Nos quadros III e IV é apresentada uma síntese dos resultados de alguns estudos epidemiológicos realizados por diversos autores, em vários países, e publicados ao longo dos últimos anos.

QUADRO III – Resultados de estudos epidemiológicos sobre a infecção por *Cryptosporidium* spp. em imunocompetentes, com e sem diarreia

	SINTOMÁTICOS (%)	ASSINTOMÁTICOS (%)	REF ^a
Adultos			
Eslovénia	10,3% (62/602)	-	Logar <i>et al.</i> , 1996
EUA	0,6% (2/315)	-	Ribes <i>et al.</i> , 2004
Inglaterra e País de Gales	1,2% (463/37.763)	-	PHLS study group, 1990
Suécia	1,5 (12/786)	0% (0/203)	Svenungsson <i>et al.</i> , 2000
Suíça	0,2% (13/6.435)	-	Baumgartner <i>et al.</i> , 2000
Crianças			
Arábia Saudita (idade <5 anos)	43% (27/63)	9,5% (18/190)	Al Braiken <i>et al.</i> , 2003
Bolívia (4 anos <idade <20 anos)	-	31,6% (119/377)	Esteban <i>et al.</i> , 1998
Brasil (idade <11 anos)	18,7% (83/445)	-	Pereira M.G.C. <i>et al.</i> , 2002
Cuba (idade <8 anos)	11,5% (13/113)	0% (0/288)	Núñez <i>et al.</i> , 2003
Dinamarca (idade <5 anos)	1,2% (4/327)	0% (0/561)	Olesen <i>et al.</i> , 2005
Eslovénia (idade <15 anos)	6,9% (39/563)	-	Logar <i>et al.</i> , 1996
Espanha (idade <14 anos)	2,9% (334/11.599)	-	Moles <i>et al.</i> , 1998
Gana (idade <6 anos)	27,8% (63/227)	15,6% (12/77)	Adjei <i>et al.</i> , 2004
Guatemala (2 anos ≤idade <14 anos)	32% (32/100)	-	Laubach <i>et al.</i> , 2004
Índia (idade <5 anos)	-	2,8% (14/508)	Palit <i>et al.</i> , 2005
Inglaterra e País de Gales (idade <15 anos)	4,1% (769/18.792)	-	PHLS study group, 1990
Irlanda (idade <13 anos)	4,4% (41/935)	-	Corbett-Feeney, 1987
México (idade <6 anos)	6,5% (26/403)	-	Enriquez <i>et al.</i> , 1997
Nigéria (idade <15 anos)	15,2% (30/198)	-	Nwabuisi, 2001
Paquistão (idade <5 anos)	10,3% (49/475)	3,3% (5/150)	Iqbal <i>et al.</i> , 1999
Suíça (idade <14 anos)	4,8% (15/312)	-	Essers <i>et al.</i> , 2000
Tanzânia (idade <5 anos)	8,8% (9/102)	-	Cegielski <i>et al.</i> , 1999
Uganda (idade <6 anos)	25% (444/1.779)	8,5% (57/667)	Tumwine <i>et al.</i> , 2003
Zâmbia (idade <2 anos)	18,9% (17/90)	-	Amadi <i>et al.</i> , 2001

QUADRO IV – Resultados de estudos epidemiológicos sobre a infecção por *Cryptosporidium* spp. em seropositivos para VIH, com e sem diarreia

	SINTOMÁTICOS (%)	ASSINTOMÁTICOS (%)	REF ^a
Adultos			
Colômbia	10,4% (12/115)	-	Flórez <i>et al.</i> , 2003
Cuba	12% (8/67)	-	Escobedo e Nuñez, 1999
Espanha	8,4% (173/2.040)	-	Moles <i>et al.</i> , 1998
EUA (São Francisco)	3,1% (109/3.564)	-	Colford <i>et al.</i> , 1996
Guiné-Bissau	21,6% (8/37)	-	Lebbad <i>et al.</i> , 2001
Índia	11% (3/26)	-	Prasad <i>et al.</i> , 2002
Itália	21,5% (14/65)	3,4% (3/89)	Brandonisio <i>et al.</i> , 1999
Malawi	12% (13/107)	3% (3/96)	Cranendonk <i>et al.</i> , 2003
Portugal	8% (36/465)	-	Matos <i>et al.</i> , 1998
Peru	19,7% (29/147)	6,8% (10/147)	Cárcamo <i>et al.</i> , 2005
Quênia	17% (13/75)	-	Mwachari <i>et al.</i> , 1998
Senegal	8,2% (12/158)	1,2% (2/160)	Gassama <i>et al.</i> , 2001
Venezuela	16% (35/217)	8% (7/87)	Arenas-Pinto <i>et al.</i> , 2003
Zimbabué	9% (7/82)	-	Gumbo <i>et al.</i> , 1999
Crianças			
Tailândia (idade <15 anos)	7,1% (10/141)	-	Leelayoova <i>et al.</i> , 2001
Tanzânia (idade <5 anos)	25% (3/12)	-	Cegielski <i>et al.</i> , 1999
Zâmbia (idade <2 anos)	28,8% (30/104)	-	Amadi <i>et al.</i> , 2001

9.1.3 FACTORES DE RISCO

Os indivíduos com o sistema imunológico comprometido encontram-se em elevado risco de desenvolver diarreia severa após o contacto com *Cryptosporidium* spp. [Keusch *et al.*, 1995]. Apesar da criptosporidiose ter a sua maior expressão na população com imunodeficiência causada por VIH, pode surgir, de igual modo, em doentes com outras imunodeficiências. Na literatura estão descritos casos de criptosporidiose em adultos e crianças com neoplasias sob quimioterapia [Foot *et al.*, 1990; Tanyüksel *et al.*, 1995; El-Mahallawy *et al.*, 2004] e em doentes submetidos a terapêutica imunossupressora, após transplante de órgãos [Campos *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2000; Delis *et al.*, 2002; Pozio *et al.*, 2004]. Os portadores de imunodeficiências primárias constituem uma subpopulação, igualmente, em risco de contrair infecção por *Cryptosporidium* spp. [Sloper *et al.*, 1982; Eun-Kyeong *et al.*, 2002; Kutukculer *et al.*, 2003].

As crianças são particularmente vulneráveis à infecção por *Cryptosporidium* spp., devido não só à imaturidade do seu sistema imunológico, como aos comportamentos que lhes são característicos, de que são exemplo, a incontinência fecal, o uso de fraldas, os hábitos de higiene deficientes e o levar as mãos à boca, que favorecem a transmissão fecal-oral [Keusch *et al.*, 1995; Casemore *et al.*, 1997].

A população idosa também se encontra mais susceptível à infecção, devido à senescência imunológica e às doenças crónicas, entre outros factores, que acompanham o envelhecimento e diminuem as suas defesas imunológicas [Naumova *et al.*, 2003]. Em Milwaukee, durante o grande surto de criptosporidiose de 1993, foi encontrada uma associação significativa entre a idade superior a 65 anos e a assistência médica devida a gastroenterite aguda [Naumova *et al.*, 2003]. No estudo epidemiológico efectuado em Barcelona, referido em 9.1.2, os autores observaram que 37,5% dos adultos com diarreia por *Cryptosporidium* spp. tinham mais de 60 anos de idade [González-Moreno *et al.*, 2004]. Num outro estudo, realizado em Rhode Island, EUA, 36% (13/36) dos doentes hospitalizados e em cujos esfregaços fecais foram identificados oocistos, tinham mais de 60 anos e sofriam de doenças crónicas ou malignas [Neill *et al.*, 1996].

Os viajantes que visitam países onde a criptosporidiose é endémica, apresentam elevado risco de contrair a infecção, em consequência do consumo de alimentos crus (fruta, vegetais, marisco), da ingestão de água da torneira ou de leite não pasteurizado, do contacto com água não tratada (rios, lagos e piscinas) ou da proximidade com pessoas infectadas [Goodgame, 2003]. Na literatura, encontram-se bem documentados casos de surtos em turistas após o regresso de férias no estrangeiro, nomeadamente o de 214 turistas britânicos que foram infectados na piscina de um hotel em Palma de Maiorca [Galmes *et al.*, 2003] e o de outros 70 turistas, também britânicos, que contraíram a infecção durante as férias na Grécia [Hardie *et al.*, 1999]. A associação entre a diarreia por *Cryptosporidium* spp. e a permanência no estrangeiro tem sido descrita em vários outros trabalhos. Após alguns dias de férias na Ilha de Santa Lucia, nas Caraíbas, quatro cidadãos americanos desenvolveram diarreia aquosa, tendo o diagnóstico parasitológico das fezes evidenciado a presença de oocistos do género *Cryptosporidium* [Ma *et al.*, 1985]. Num estudo efectuado na Suécia, 83% (10/12) dos adultos imunocompetentes com diarreia e criptosporidiose havia estado em regiões tropicais e subtropicais [Svenungsson *et al.*, 2000]. Glaeser *et al.* (2004), na Suíça, descreveram, também, a associação entre viagens ao estrangeiro e a diarreia por *Cryptosporidium* spp. em 67% (10/15) das crianças estudadas.

Outros factores de risco incluem actividades no campo e o contacto com animais (visitas a quintas e campismo selvagem), actividades de lazer em água superficial não tratada ou tratada inadequadamente (lagos, rios e piscinas), exposição ocupacional ao parasita (veterinários, tratadores de animais, médicos, enfermeiros, técnicos de laboratório, educadores de infância, pessoas que cuidam de idosos) e o consumo de vegetais crus, de leite não pasteurizado e seus derivados. O contacto doméstico com pessoas infectadas (particularmente crianças), as práticas de higiene deficientes e as relações sexuais orais-anais têm, também, associado um risco acrescido de contrair a infecção [PHLS Study Group, 1990; Keusch *et al.*, 1995; Casemore *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 2002; Goh *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2004].

9.1.4 VARIAÇÃO SAZONAL

A variação sazonal da criptosporidiose humana tem sido documentada por diversos autores sendo, no entanto, diferente de país para país. Nos Estado Unidos da América, foram descritos picos de incidência no Verão, associados à utilização de água de superfície para actividades de lazer [Dietz *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2004; Hlavsa *et al.*, 2005]. Estudos epidemiológicos efectuados em crianças no Brasil, na Guatemala, na Guiné-Bissau e no Uganda mostraram que os picos de maior prevalência de criptosporidiose ocorrem, sobretudo, nos meses em que a precipitação é elevada [Newman *et al.*, 1999; Bern *et al.*, 2000; Perch *et al.*, 2001; Pereira M.G.C. *et al.*, 2002; Tumwine *et al.*, 2003]. No Reino Unido, o maior número de casos de criptosporidiose ocorre durante a Primavera e fim do Outono/início do Inverno, estando associado a actividades pecuárias (nascimento dos vitelos e dos cordeiros) e agrícolas (utilização de excrementos animais como fertilizante dos solos) e a épocas de maior precipitação, com a consequente contaminação da água superficial [Corbett-Feeney, 1987; Meinhardt *et al.*, 1996; Casemore *et al.*, 1997; Goh *et al.*, 2004]. Neste mesmo País foi, também, identificado um pico de casos esporádicos no fim do Verão/início do Outono, em resultado da permanência, durante as férias de Verão, em países onde a incidência da infecção é maior [McLauchlin *et al.*, 2000; Goh *et al.*, 2004]. Naumova *et al.* (2005), estudaram a variação temporal do número de casos de criptosporidiose, notificados em 15 regiões do noroeste da Inglaterra, entre 1990 e 1999. Estes autores observaram que, cerca das vigésima e quadragésima semanas de cada ano, o número de casos de criptosporidiose, registados por semana, excedia o nível endémico em, respectivamente, três vezes e meia e três vezes. Os mesmos autores verificaram, ainda, uma associação significativa entre o número de casos de criptosporidiose semanal e a forte

pluviosidade: sempre que a precipitação semanal atingia os 22 mm, na semana seguinte, o número de casos de criptosporidiose registados aumentava 27%.

9.2 A CRIPTOSPORIDIOSE NOUTROS ANIMAIS

Na literatura, encontram-se descritas infecções por microrganismos do género *Cryptosporidium*, em mais de 155 espécies de mamíferos, 30 espécies de aves e 57 espécies de répteis [O'Donoghue, 1995; Fayer *et al.*, 1997; Fayer, 2004]. A maioria das infecções tem sido descrita em mamíferos, particularmente em gado doméstico de importância económica. Os animais recém-nascidos encontram-se mais susceptíveis à infecção, apresentando elevada morbidade e mortalidade, enquanto que os adultos são, com frequência, assintomáticos. O interesse da Medicina Veterinária, por estes parasitas, aumentou com o número crescente de casos documentados de criptosporidiose em humanos e noutros animais. As razões deste interesse prendem-se, não só com o facto de os animais poderem constituir fonte de infecção para o Homem, mas, também, com as elevadas perdas económicas que a infecção em gado doméstico acarreta para o sector pecuário [Casemore *et al.*, 1997; Fayer, 2004].

9.2.1 GADO DOMÉSTICO

A criptosporidiose é uma doença com prevalência elevada em gado bovino, particularmente em vitelos. A infecção naturalmente adquirida é mais frequente cerca das duas semanas de idade, embora se encontre descrita, também, em vitelos a partir dos três dias de vida. A sintomatologia mais severa é observada em animais não desmamados e inclui diarreia, desidratação, febre, apatia e dor abdominal. A excreção de oocistos é elevada, podendo exceder os 10^7 oocistos por grama de fezes, continuando, mesmo, após a cessação dos sintomas. Embora em percentagens inferiores às encontradas em recém-nascidos, a eliminação de oocistos, por vitelos desmamados e animais adultos, tem sido observada, com alguma frequência, ainda que sem evidência de diarreia [Casemore *et al.*, 1997; Fayer *et al.*, 1997; Graaf *et al.*, 1999].

Na Bélgica, de acordo com dados do “Veterinary and Agrochemical Research Centre”, entre 1992 e 1993, 39,6% dos vitelos com diarreia encontravam-se infectados por *Cryptosporidium* spp. [Graaf *et al.*, 1999]. Num estudo efectuado numa exploração pecuária, no Reino Unido, entre 1992 e 1997, foi observada uma prevalência de criptosporidiose de 3,5%

(26/736) em animais adultos e de 52% (191/367) em vitelos [Sturdee *et al.*, 2003]. Numa exploração leiteira na Holanda, 39,1% (18/46) dos vitelos, entre a primeira e a quarta semanas de idade, evidenciavam infecção por *C. parvum* [Huetink *et al.*, 2001]. Em Portugal, Pereira da Fonseca *et al.* (2001) observaram, em algumas explorações pecuárias no Alentejo e no Ribatejo, uma prevalência global da criptosporidiose, em gado bovino até aos quatro anos de idade, de 23,3% (129/553); nos vitelos entre uma e quatro semanas de vida, esse valor foi de 43% (70/163). Numa outra investigação, em diversas quintas na Província da Galiza, em Espanha, a percentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp. em vitelos, com idade inferior a três semanas, foi de 47,9% (404/844) [Castro-Hermida *et al.*, 2002]. No Canadá, Olson *et al.* (1997a) observaram, em vitelos, entre a segunda e a quarta semanas de vida, uma percentagem de criptosporidiose de 46,7% (21/45), baixando esse valor para 15,3% (59/386), ao ser considerada a totalidade dos animais estudados (0 aos 6 meses).

As possíveis fontes de infecção, para os vitelos, são oocistos excretados por outros vitelos ou por animais adultos. Sendo a altura do parto aquela em que as vacas excretam maior número de oocistos, este é o principal modo de infecção dos recém-nascidos. A infecção é facilmente transmitida entre os animais, principalmente, quando a densidade populacional nos estábulos é elevada [Casemore *et al.*, 1997; Fayer *et al.*, 1997; Graaf *et al.*, 1999].

A criptosporidiose é considerada como uma das enteropatias mais frequentes em vitelos, durante as primeiras semanas de vida, sendo responsável por consideráveis perdas económicas, devido à diminuição da taxa de crescimento dos animais, à necessidade de administração de fármacos e soluções de electrólitos e à exigência de medidas de higiene especiais [Graaf *et al.*, 1999].

Embora a sua prevalência não se encontre tão bem documentada como no gado bovino, os parasitas do género *Cryptosporidium* spp. são, do mesmo modo, considerados importantes agentes de diarreia neonatal, em ovinos e caprinos. Os aspectos clínicos da criptosporidiose ovina e caprina são semelhantes aos já descritos para os bovinos, sendo os animais adultos, maioritariamente, assintomáticos [Casemore *et al.*, 1997; Fayer *et al.*, 1997; Graaf *et al.*, 1999]. Um estudo efectuado no Reino Unido mostrou que 12,9% (33/255) dos cordeiros e 6,4% (16/250) das ovelhas apresentavam infecção por *Cryptosporidium* spp. [Sturdee *et al.*, 2003]. Em Espanha, numa investigação realizada em 89 quintas na Província de Saragoça, sobre a criptosporidiose em gado ovino, foi observada a prevalência de 59% (344/583), em cordeiros até aos três meses. O maior pico de infecção verificou-se entre o primeiro e o décimo quarto dias de vida,

altura em que 73,4% (204/278) dos animais se encontrava a eliminar oocistos [Causapé *et al.*, 2002]. Outros autores identificaram, na mesma região, mas em gado caprino, oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 34,9% (58/166) dos cabritos entre os três e os 25 dias de vida, enquanto que, somente, 8,7% (8/92) das cabras se encontravam parasitadas [Quilez *et al.*, 2001]. Os animais adultos têm o papel de portadores assintomáticos, eliminando oocistos para o ambiente. Essa excreção aumenta no período periparto, contribuindo para a manutenção da infecção, durante as épocas do parto. As perdas económicas, associadas à criptosporidiose nestes animais, resultam, não só da mortalidade, que é superior à verificada em vitelos, como do atraso no crescimento e dos custos relacionados com a assistência veterinária [Fayer *et al.*, 1997; Graaf *et al.*, 1999].

A infecção por *Cryptosporidium* spp. em suínos tem sido descrita esporadicamente em várias regiões geográficas. Ao contrário do que acontece nos ruminantes, a infecção é, maioritariamente, assintomática, facto que contribui para que seja alvo de menos investigação [Casemore *et al.*, 1997; Graaf *et al.*, 1999]. Como a criptosporidiose não é considerada um problema grave de diarreia neonatal em suínos, o número de estudos epidemiológicos documentados é escasso, daí o desconhecimento existente, em muitos países, sobre a infecção nestes animais. Alguns trabalhos efectuados na Coreia do Sul e no Japão dão conta de prevalências de criptosporidiose suína de 10,5% (62/589) e de 33,2% (77/232), respectivamente [Izumiyama *et al.*, 2001; Yu e Seo, 2004]. Dada a pouca informação existente sobre a infecção nestes animais, desconhece-se qual a sua contribuição para a contaminação ambiental e infecção humana [Ramirez *et al.*, 2004].

Parasitas do género *Cryptosporidium* têm, também, sido associados a infecções em aves domésticas, nomeadamente galinhas, perus, patos, gansos, pavões, faisões e codornizes existindo, contudo, poucos estudos que dêem conta da prevalência desta infecção nestes animais. Dependendo das espécies, a criptosporidiose nas aves pode ser entérica ou respiratória e inicia-se após a ingestão ou a inalação de oocistos. A espécie *C. meleagridis* infecta o tracto intestinal causando diarreia, desidratação e perda de peso, enquanto que *C. baileyi* infecta o aparelho respiratório, provocando tosse, espirros e falta de ar. De modo semelhante ao que acontece nos mamíferos, também as aves mais jovens são mais susceptíveis à infecção do que as adultas. As perdas económicas associadas à doença nestes animais prendem-se com o seu fraco crescimento e a elevada mortalidade [Graaf *et al.*, 1999; Ramirez *et al.*, 2004].

9.2.2 ANIMAIS DE COMPANHIA

A primeira descrição da infecção por *Cryptosporidium* spp. em gatos e cães aconteceu, respectivamente, no Japão, em 1979 e nos EUA, em 1983 [Iseki, 1979; Wilson *et al.*, 1983]. Desde então, alguns autores têm documentado casos de criptosporidiose em canídeos e felídeos domésticos e, embora não se encontre, ainda, bem esclarecida a importância da doença nestes animais, o quadro clínico parece ser mais severo nos mais jovens, nos sujeitos a condições de “stress” e/ou com função imunitária diminuída [Robertson *et al.*, 2000]. Nos cães, os animais com menos de seis meses de vida são mais afectados do que os adultos. Nestes últimos, a infecção é, na maior parte das vezes, assintomática, excepto quando em associação com infecções causadoras de imunossupressão, como a parvovirose ou a esgana [Turnwald *et al.*, 1988; Denholm *et al.*, 2001]. A importância para a saúde pública da criptosporidiose nestes animais, reside no facto de poderem constituir fontes de infecção zoonótica para o Homem.

No Estado do Colorado, EUA, foi conduzida uma investigação sobre a prevalência da criptosporidiose em gatos tendo, para tal, sido estudados animais com dono e animais que viviam em associações de protecção. Os valores observados para as duas populações de animais foram de 3,9% (5/129) e 7,8% (6/77), respectivamente. Entre os gatos parasitados, 40% (2/5) dos que possuíam dono eram assintomáticos, o mesmo acontecendo em 83% (5/6) dos que viviam em associações [Hill *et al.*, 2000]. Num estudo semelhante, efectuado na cidade de Perth, na Austrália, Sargent *et al.* (1998) encontraram uma prevalência global da criptosporidiose de 1,2% (2/162). Um trabalho realizado na cidade de Glasgow, na Escócia, envolvendo gatos com dono e gatos de rua, revelou prevalências de criptosporidiose de 5,1% (7/136) e 12,1% (12/99), respectivamente. De todos os animais com infecção por *Cryptosporidium* spp., apenas 21% (4/19) apresentavam diarreia e, destes quatro, três tinham menos de seis meses de idade [Mtambo *et al.*, 1991]. Um outro estudo efectuado em Tóquio, no Japão, mostrou que 3,8% (23/608) dos gatos com dono excretavam oocistos de *Cryptosporidium* spp., sendo que 74% (17/23) dos mesmos eram jovens; no entanto, nenhum dos gatos parasitados apresentava diarreia [Arai *et al.*, 1990].

No Hospital Veterinário da Universidade do Colorado, EUA, Hackett e Lappin (2003) estudaram os cães com dono que se apresentaram à consulta no período 1997-1998, tendo observado que 3,8% (5/130) dos animais apresentava infecção por *Cryptosporidium* spp.. Ainda, nos EUA, numa cidade do Estado da Califórnia, uma investigação envolvendo cães de

rua e de cães municipais revelou uma prevalência de criptosporidiose de 2% (4/200), sendo todos os animais parasitados adultos e assintomáticos [El-Ahraf *et al.*, 1991]. Na cidade de Saragoça, em Espanha, Causapé *et al.* (1996) observaram em cães de rua e com dono percentagens de criptosporidiose de 6,8% (3/44) e 8,1% (3/37), respectivamente. Metade dos animais infectados apresentava diarreia, mas sofria, igualmente, de outras parasitoses concomitantes, nomeadamente de isosporose, não tendo, também, sido excluídas associações com infecções por outros agentes entéricos, como vírus ou bactérias. No Japão, num estudo efectuado em cães de rua sem diarreia, Abe *et al.* (2002), encontraram 9,3% (13/140) dos animais a excretarem oocistos de *Cryptosporidium* spp. Os autores, por sequenciação de DNA dos parasitas amplificado por PCR, identificaram a espécie responsável pela infecção em todos os cães como sendo *C. canis*.

9.2.3 ANIMAIS SILVÁTICOS

Infecções por *Cryptosporidium* spp. têm sido documentadas em inúmeros animais silváticos e, embora alguns autores tenham sugerido que estes possam constituir eventuais reservatórios e fontes de infecção para o Homem e animais domésticos, desconhece-se a dimensão de tal contribuição. Nos animais adultos, a infecção por este protozoário é, na maior parte das vezes, assintomática, o número de oocistos excretados é baixo e a sua eliminação é intermitente, podendo, no entanto, prolongar-se por longos períodos [Casemore *et al.*, 1997; Ramirez *et al.*, 2004]. Embora tal não tenha sido demonstrado, o gado que vive em liberdade, nos campos de pasto, pode, também, constituir fonte de infecção para os animais silváticos, com os quais partilha o habitat, na medida em que muitos deles, nomeadamente pequenos mamíferos (roedores e insectívoros) e Cervídeos são susceptíveis à espécie *C. parvum* que é, também, a mais vezes encontrada no gado doméstico [Olson *et al.*, 2004].

A presença ubíqua de pequenos mamíferos (roedores e insectívoros), no meio rural, e a partilha do habitat com gado doméstico, em explorações agrícolas e pecuárias, tem levado alguns autores a conduzirem investigações, no sentido de avaliar a ocorrência de parasitas do género *Cryptosporidium* nestes animais. Numa exploração agrícola e pecuária, no Reino Unido, Chalmers *et al.* (1997) estudaram a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em três espécies de roedores (*Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* e *Clethrionomys glareolus*), tendo, por análise morfológica dos oocistos, encontrado o valor global de 18,6% (111/595) para *C. parvum* e de 6,4% (38/595) para *C. muris*; nenhum dos animais parasitados

apresentava sinais de diarreia. Também, no Reino Unido, Quy *et al.* (1999) encontraram, em três populações de *Rattus norvegicus*, 24% (105/438) de animais infectados por *C. parvum*. O mesmo grupo de trabalho alargou a investigação a outros mamíferos silváticos, nomeadamente, insectívoros, lagomorfos, ungulados e carnívoros, tendo identificado, por análise morfométrica, oocistos de *C. parvum* em ouriços-cacheiros, musaranhos, coelhos, texugos, raposas e gamos [Sturdee *et al.*, 1999]. Numa Reserva Natural, na Polónia, Bajer *et al.* (2002) estudaram, entre 1997 e 1999, a prevalência de *Cryptosporidium* spp., em três espécies de roedores (*Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus* e *Microtus arvalis*), tendo encontrado o valor global de 61,8% (582/942). Em Espanha, Torres *et al.* (2000) estudaram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp., em cinco espécies de roedores (*Apodemus sylvaticus*, *Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*, *Mus spretus* e *Rattus rattus*) e em duas espécies de insectívoros (*Crocidura russula* e *Sorex araneus*), em várias zonas da Província da Catalunha, tendo, por análise morfométrica dos oocistos, encontrado prevalências globais de 24,9% (110/442) para *C. parvum*, de 2,9% (13/442) para *C. muris* e de 3,6% (16/442) para infecções com ambos os parasitas.

Para além de pequenos roedores e insectívoros, alguns autores têm estudado a presença destes parasitas noutros mamíferos, nomeadamente Cervídeos e Suídeos. Atwill *et al.* (1997) estudaram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em populações de javalis, que habitavam zonas ribeirinhas de lagos, lagoas, nascentes e charcos, dispersas por dez locais diferentes no Estado da Califórnia, EUA, tendo encontrado uma prevalência de 5,4% (12/221) e um risco de infecção maior nos animais com idade inferior a oito meses e pertencentes a populações mais numerosas. Num outro trabalho, também realizado na Califórnia, com o objectivo de determinar a presença de parasitas do género *Cryptosporidium* em gamos e veados de vida livre, foi observada a percentagem de positividade de 15,9% (13/82), sendo todos os animais assintomáticos [Deng e Cliver, 1999]. Rickard *et al.* (1999) encontraram, em veados que ocupavam diversas zonas nos estados da Virgínia e do Mississipi, EUA, prevalências de infecção por estes parasitas de 8,8% e 5%, respectivamente. Num estudo efectuado na Tapada Nacional de Mafra, em Portugal, Lourenço *et al.* (2000) observaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 100% (12/12) dos gamos estudados, todos com idades entre os nove meses e os quatro anos. Os estudos epidemiológicos realizados nestes animais são escassos, sendo, muitas vezes, relativos a pequenos grupos cativos em jardins zoológicos ou reservas naturais. Num trabalho efectuado no Jardim Zoológico de Lisboa, envolvendo 34 espécies de

ruminantes artiodáctilos, foram observados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 2,1% (8/388) das amostras fecais estudadas [Delgado *et al.*, 2003]. Num estudo realizado no Jardim Zoológico de Barcelona, Gómez *et al.* (1996) e (2000) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras fecais de diversos animais, pertencentes a várias espécies de herbívoros (Girafídeos, Bovídeos, Cervídeos, Camelídeos, Rinocerotídeos e Elefantídeos) e de primatas (Lemurídeos, Pongídeos, Cercopitecídeos e Hapalídeos). A detecção de *Cryptosporidium* spp. em várias espécies de herbívoros e primatas em cativeiro foi, igualmente, descrita por outros autores, em países como a Polónia e os EUA [Heuschele *et al.*, 1986; Kalishman *et al.*, 1996; Majewska *et al.*, 1997]. A ocorrência de criptosporidiose, em alguns destes animais, tem sido, também, documentada em Reservas Naturais, algumas das quais vizinhas de zonas rurais, onde os animais silváticos, as populações humanas e o seu gado doméstico partilham habitats muito próximos. Na Etiópia, Legesse e Erko (2004) encontraram prevalências de *Cryptosporidium* spp. em babuínos e macacos de 11,9% (7/59) e 29,3% (12/41), respectivamente, enquanto que no Uganda, Nizeyi *et al.* (1999) encontraram em gorilas um valor de 11% (11/100). Na Tanzânia, Mtambo *et al.* (1997) observaram prevalências de criptosporidiose em zebras, búfalos e gnus de 28% (7/25), 22% (8/36) e 27% (7/26), respectivamente.

Os estudos existentes sobre a criptosporidiose nos animais silváticos são escassos e dispersos, contribuindo para o desconhecimento quanto ao seu papel de reservatório e veículo da infecção para o Homem e para outros animais, seja por contacto directo ou através de contaminação ambiental.

9.3 CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água subterrânea, lagos, rios, estuários e oceanos tem sido descrita por inúmeros autores [Fayer *et al.*, 2004].

Diversos estudos, conduzidos nos EUA, evidenciaram a presença de oocistos em cerca de 80% da água superficial e de 26% da água de abastecimento tratada, em concentrações que variavam entre 0,001 e 484 oocistos/L, no primeiro caso, e entre 0,005 e 0,017 oocistos/L no segundo. Estudos idênticos, realizados no Reino Unido, mostraram que 50% da água superficial e 37% da água de abastecimento se encontravam contaminadas por *Cryptosporidium* spp. [Smith e Rose, 1998]. Moulton-Hancock *et al.* (2000) descreveram, ainda,

a presença de oocistos em 10% da água subterrânea investigada em 20 Estados dos EUA, evidenciando que a filtração, pelas diferentes camadas do solo, não é suficiente para evitar o transporte destes parasitas até aos lençóis de água que alimentam poços e fontes.

Apesar da maior parte da informação existente na Europa dizer respeito ao Reino Unido, nos últimos anos, a comunidade científica europeia tem despertado para este problema e desenvolvido investigação diversa, a fim de avaliar a extensão da presença de criptosporídeos nos recursos hídricos. Na Áustria, foram detectados oocistos em 10% dos reservatórios de água não tratada estudados, sobretudo naqueles mais próximos das zonas de maior densidade populacional; no entanto, não foram encontrados parasitas na água de abastecimento [Hassl *et al.*, 2001]. Num estudo efectuado na Suíça e na Alemanha foram encontrados oocistos em 30,4% dos 56 rios, riachos, lagos e lagoas examinados, confirmando a presença frequente destes parasitas na água superficial daqueles dois países [Ward *et al.*, 2002]. Conio *et al.* (1999) encontraram oocistos em 21% dos rios e lagos estudados em algumas regiões de Itália, tendo, no entanto, a água subterrânea e de abastecimento sido negativas para a presença destes parasitas. Ainda, em Itália, foram encontrados oocistos no Mar Adriático, onde existem muitos viveiros de mexilhões, que são, com frequência, consumidos crus [Tamburrini e Pozio, 1999] e em 70% das amostras colhidas, durante um ano, no rio Tibre, em concentrações entre 0,9 e 19 oocistos/L [Bonadonna *et al.*, 2004]. Numa investigação realizada na Noruega, Robertson e Gjerde (2001a) analisaram a água de lagos e de rios, em várias regiões do País, tendo detectado parasitas do género *Cryptosporidium* em 24,5% dos locais estudados, embora em baixas concentrações (o valor máximo encontrado foi de 3,75 oocistos/10 L). Estes autores observaram, ainda, a associação entre a presença de oocistos na água e a existência de gado bovino e ovino nas proximidades dos locais de amostragem.

Os efluentes de esgotos, de origem humana, não tratados ou tratados inadequadamente, as descargas de explorações pecuárias e a escorrência de solos estrumados com dejectos animais, são, em geral, considerados como as principais fontes de contaminação dos recursos hídricos por criptosporídeos [Meinhardt *et al.*, 1996]. Para além disso, uma vez que a infecção por *C. parvum*, uma das principais espécies causadoras da criptosporidiose humana, é, também, causa de infecção em animais silváticos, como pequenos mamíferos e Cervídeos, estes podem constituir fontes de dispersão ambiental de oocistos e de contaminação dos cursos de água [Sturdee *et al.*, 1999; Lourenço *et al.*, 2000]. A extensão da contaminação da água superficial é, ainda, dependente de factores geográficos, como a topografia dos terrenos e climáticos, como

chuvas fortes, enxurradas, inundações e degelos [Meinhardt *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 2002; Fayer, 2004; Joachim, 2004]. Também as aves aquáticas podem ter um papel importante na contaminação da água superficial, com oocistos. Para tal contribuem, por um lado, o facto destas aves serem refractárias à infecção por *C. parvum*, permanecendo os oocistos viáveis e infecciosos após a passagem pelo seu tracto intestinal e, por outro, os seus hábitos de, durante as migrações de Outono e Primavera, se alimentarem em pastos e campos de cultivo, áreas onde podem existir oocistos viáveis, e de defecarem no meio aquático [Graczyk *et al.*, 1997].

Por fim, importa salientar que, apesar dos parasitas do género *Cryptosporidium* serem ubíquos no ambiente aquático, o risco dessa presença para a saúde pública permanece uma incógnita, na medida em que: i) na maioria dos estudos descritos, a identificação da espécie e/ou genótipo dos oocistos encontrados não é determinada, desconhecendo-se a sua capacidade de causar infecção no Homem; ii) a presença de oocistos na água só constitui risco de infecção humana, se estes se encontrarem viáveis, o que nem sempre tem sido determinado; iii) muitas vezes, o número de oocistos encontrado é baixo, ignorando-se se é ou não suficiente para causar infecção humana, o que depende, não só da virulência da espécie/genótipo em questão, como do estado imunológico do hospedeiro [Centers for Disease Control and Prevention, 1995; Joachim, 2004].

10. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA CRIPTOSPORIDIOSE

A epidemiologia molecular é, actualmente, considerada como um ramo da epidemiologia que, através de técnicas de biologia molecular, proporciona um melhor conhecimento das doenças, não só ao nível da caracterização dos agentes que estão na sua origem, mas, também, em termos da sua ecologia e dinâmica da transmissão [Thompson *et al.*, 1998].

Antes da utilização destas novas técnicas, a caracterização dos microrganismos do género *Cryptosporidium* era resultante de observações microscópicas da morfologia dos oocistos e/ou formas de desenvolvimento endógeno, da constatação do hospedeiro em que eram encontrados e de estudos de infecção experimental. Estas observações permitiram a identificação de inúmeras espécies de *Cryptosporidium*, o que originou grande confusão e controvérsia taxonómicas [O'Donoghue, 1995]. Porém, os conhecimentos disponíveis sobre estes parasitas sofreram um progresso significativo, após a aplicação das técnicas de biologia molecular, sobretudo as baseadas na reacção de PCR, ao estudo da sua epidemiologia. Esta metodologia tem-se revelado bastante promissora, esperando-se que possa trazer algum esclarecimento a questões importantes como: i) a variabilidade entre os parasitas do género *Cryptosporidium*; ii) a estrutura populacional e a taxonomia deste género; iii) a definição dos parasitas capazes de causar infecção humana; iv) a identificação das fontes de contaminação e de infecção para o Homem; v) a caracterização da dinâmica da transmissão da infecção em diferentes comunidades e situações; vi) a importância, para a saúde pública, da presença de oocistos em água de consumo e de recreio; vii) a patogenicidade e virulência apresentadas pelas diferentes espécies/genótipos que provocam doença humana [Moore *et al.*, 2003; Thompson, 2003].

10.1 IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO GÉNERO *CRYPTOSPORIDIUM*

Os primeiros estudos sobre a diversidade entre estes parasitas davam conta da variabilidade fenotípica encontrada entre isolados de *C. parvum* de humanos e de gado doméstico (bovino, ovino e caprino). Esta variabilidade foi demonstrada através da técnica de “Western blotting”, com utilização de anticorpos monoclonais e policlonais, para análise da composição antigénica dos oocistos [Nichols *et al.*, 1991; Nina *et al.*, 1992] e da caracterização

isoenzimática [Ogunkolade *et al.*, 1993; Awad-el-Kariem *et al.*, 1995]. Em todos estes trabalhos foi observado um dimorfismo entre os isolados de *C. parvum* de origem humana e os de origem animal. No entanto, estas técnicas apresentavam a desvantagem de necessitarem de um número considerável de oocistos, o que, por vezes, era difícil de obter. A emergência das tecnologias baseadas na reacção de PCR permitiu ultrapassar o problema da escassez de oocistos obtidos a partir de amostras biológicas, tornando, assim, possível o estudo da epidemiologia molecular destes parasitas [Fayer *et al.*, 2000].

Em 1995, Morgan *et al.*, através da técnica de amplificação de polimorfismos de distribuição aleatória ou RAPD (acrónimo anglo-saxónico para “random amplified polymorphic DNA”), observaram que isolados de *C. parvum*, de origem humana e bovina, se dividiam em dois grupos, um contendo a maioria dos isolados humanos e outro abrangendo todos os isolados bovinos e restantes isolados humanos. Muitos outros autores desenvolveram investigações semelhantes, utilizando as técnicas de PCR, RFLP e sequenciação aplicadas à caracterização genética de isolados de *C. parvum* de humanos e de outros animais (principalmente gado doméstico), em regiões geográficas diversas. Estes estudos incidiram, essencialmente, sobre os genes que codificam a proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* ou COWP (acrónimo anglo-saxónico para “*Cryptosporidium* oocyst wall protein”), a proteína de adesão relacionada com a trombospondina de *Cryptosporidium*-1 ou TRAP-C1 (acrónimo anglo-saxónico para “thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium* 1”), a proteína de adesão relacionada com a trombospondina de *Cryptosporidium*-2 ou TRAP-C2 (acrónimo anglo-saxónico para “thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium* 2”), a dihidrofolato reductase ou DHFR (sigla anglo-saxónica para “dihydrofolate reductase”), a β -tubulina, a proteína de choque térmico de 70-kDa ou HSP70 (sigla anglo-saxónica para “heat shock protein 70-kDa”), a sintetase da acetil-coenzima A, a subunidade pequena do rRNA (SSU-rRNA), as regiões dos espaçadores internos transcritos ou ITS (sigla anglo-saxónica para “internally transcribed spacers”) do rRNA e algumas regiões genómicas não codificantes. Os resultados de todas estas investigações confirmaram a existência de dois genótipos de *C. parvum*, distintos e amplamente conservados, o genótipo humano, encontrado em isolados de origem humana e o genótipo bovino, presente, quer em isolados de gado doméstico, quer em isolados humanos [Bonnin *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1997; Spano *et al.*, 1997b; Gibbons *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1998a; Patel *et al.*, 1998; Spano *et al.*, 1998a, 1998b; Sulaiman *et al.*, 1998; Cacciò *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 1999b; Xiao *et al.*, 1999a, 1999c; Alves *et al.*, 2001a, 2001b]. Para além das diferenças genéticas existentes, entre

estes dois genótipos de *C. parvum*, estudos de infecção experimental mostraram que os isolados com o genótipo bovino tinham a capacidade de produzir infecção em ratinhos e em vitelos, o mesmo não acontecendo com aqueles que exibiam o genótipo humano [Peng *et al.*, 1997]. Estes trabalhos mostraram, assim, a existência de duas populações de *C. parvum* distintas, com diferentes especificidades de hospedeiro e envolvidas em diferentes ciclos de transmissão: a população constituída pelos isolados com o genótipo bovino, abundante e conservada entre o gado doméstico, que se encontrava envolvida na transmissão zoonótica e a população dos isolados com o genótipo humano, envolvida num ciclo de transmissão antroponótico ocorrendo, exclusivamente, entre humanos [Peng *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 1998].

A estes estudos, seguiram-se inúmeras investigações, realizadas com o objectivo de identificar e caracterizar a diversidade genética existente entre os isolados de *Cryptosporidium* spp. encontrados em diversos hospedeiros animais, nomeadamente outros animais domésticos, animais de companhia e animais silváticos, de várias regiões geográficas. A sequenciação, entre outros, dos genes que codificam a SSU-rRNA e as proteínas COWP, HSP70 e actina, o alinhamento e a análise filogenética, para cada gene, das sequências nucleotídicas obtidas para os diversos isolados caracterizados, evidenciou a existência de sequências únicas, que apresentavam diferenças significativas entre si. Estes resultados mostraram que *C. parvum* não era uma espécie uniforme, mas sim constituída por vários genótipos distintos, aos quais foi dado o nome do hospedeiro onde os isolados haviam sido identificados. Assim, para além do genótipo bovino, encontrado em bovinos, caprinos, ovinos, suínos, roedores, Cervídeos e outros mamíferos, foram identificados inúmeros genótipos de *C. parvum*, adaptados ao hospedeiro, tais como os genótipos bovino B, porco I, porco II, , coelho, rato, marsupial I, marsupial II, furão, cão, esquilo, gamo, cervo, macaco, urso, raposa, pato, ganso, tentilhão, lagarto e dois genótipos de *C. muris*, entre outros. A análise filogenética constituiu, ainda, evidência adicional da validade das espécies *C. felis*, *C. muris*, *C. baileyi*, *C. serpentis*, *C. wrairi*, *C. meleagridis* e *C. saurophilum* [Morgan *et al.*, 1998b, 1999a, 1999d, 1999e; Xiao *et al.*, 1999a, 1999c; Morgan *et al.*, 2000b; Sulaiman *et al.*, 2000; Atwill *et al.*, 2001; Graczyk *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2001; Perz e Le Blancq, 2001; Sulaiman *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2002b; Abe e Iseki, 2003; Ryan *et al.*, 2003b; Silva *et al.*, 2003; Power *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2004b; Zhou *et al.*, 2004]. Na figura 6, encontra-se representada uma árvore filogenética, construída para várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, por comparação das respectivas sequências do gene que codifica a SSU-rRNA, onde podem observar-se dois grupos monofiléticos,

correspondentes aos seus braços principais, um constituído pelos parasitas intestinais e a espécie respiratória *C. baileyi* e outro contendo os parasitas gástricos.



FIGURA 6 – Relação filogenética entre espécies e genótipos, pertencentes ao género *Cryptosporidium*, inferida pela análise de sequências do gene SSU-rRNA, através do método “neighbor joining”, tendo por base distâncias genéticas calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. Os números sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1.000 réplicas [Xiao *et al.*, 2004a]

A extensão da distância genética, existente entre alguns dos novos genótipos, levou alguns autores a sugerir que pudessem tratar-se de espécies de *Cryptosporidium* distintas. No entanto, para que novas espécies pudessem ser descritas, foi necessário correlacionar as diferenças genéticas, com outras características biológicas, como a especificidade de hospedeiro, o local de infecção, a patogenicidade e a virulência [Morgan *et al.*, 1999e; Xiao *et al.*, 1999c]. Foi o que aconteceu, por exemplo, com *C. andersoni*. Oocistos semelhantes a *C. muris*,

eram com frequência encontrados em gado bovino. Para além disso, experiências de transmissão cruzada mostraram que os isolados de *C. muris* de origem bovina não eram infectantes para ratos e outros roedores [Koudela *et al.*, 1998]. A caracterização genética de isolados de *C. muris* de ratos e de bovinos de várias regiões geográficas mostrou a existência de dois genótipos distintos, o genótipo A, associado aos isolados de gado bovino e o genótipo B, exibido pelos isolados de roedores [Morgan *et al.*, 2000c]. Deste modo, foi com base num conjunto de características, onde se destacam as diferenças genéticas e de especificidade de hospedeiro, que o genótipo A de *C. muris* foi descrito como uma espécie nova – *C. andersoni* – responsável por infecção do abomaso em gado bovino [Lindsay *et al.*, 2000].

Caso idêntico sucedeu com *C. hominis*. Ao contrário do que acontecia com os parasitas, morfologicamente idênticos, de *C. parvum* genótipo bovino, aqueles que exibiam o genótipo humano não eram infectantes para bovinos e roedores [Peng *et al.*, 1997]. O desenvolvimento de um modelo animal em leitões, para propagação de isolados com genótipo humano, mostrou diferenças significativas, ao nível da patogenicidade induzida pelos dois genótipos [Pereira S.J. *et al.*, 2002]. Para além disso, o facto de não existirem isolados recombinantes, mesmo em casos de infecções mistas, com ambos os genótipos, reflectia o isolamento reprodutivo existente entre as duas populações. Estas características, aliadas à distância genética existente entre os dois genótipos de *C. parvum*, constituíram razões suficientes para a descrição de *C. parvum* genótipo humano, como uma espécie distinta, à qual Morgan-Ryan *et al.* (2002) denominaram *C. hominis*.

Através de um processo idêntico, envolvendo a caracterização molecular e biológica de isolados pertencentes a alguns dos genótipos adaptados ao hospedeiro, inicialmente identificados, quatro deles foram, posteriormente, considerados espécies novas de *Cryptosporidium*: o genótipo cão como *C. canis* [Fayer *et al.*, 2001], o genótipo tentilhão como *C. galli* [Ryan *et al.*, 2003a], o genótipo porco I como *C. suis* [Ryan *et al.*, 2004] e o genótipo bovino B, como *C. bovis* [Fayer *et al.*, 2005].

Entre os diferentes genótipos de *Cryptosporidium* spp., que actualmente se conhecem, nem todos apresentam o mesmo grau de divergência genética entre si. Assim, nos casos em que essa divergência é extensa, ao ponto de sugerir que determinado genótipo possa constituir uma espécie distinta, é necessária uma caracterização biológica detalhada, que permita determinar o significado dessa divergência e esclarecer o seu estatuto taxonómico [Xiao *et al.*, 2002b; Ryan *et al.*, 2003b; Traversa *et al.*, 2004b; Xiao *et al.*, 2004b].

Inicialmente, os novos genótipos, que eram identificados em diversos hospedeiros animais, foram sendo imputados à espécie *C. parvum*. Contudo, dada a incerteza taxonómica, associada à extensão da diversidade genética, encontrada nos diferentes genótipos, foi convencionado que a designação *C. parvum* seria utilizada, exclusivamente, para referir os isolados que exibem o genótipo bovino. Os isolados dos restantes genótipos, são identificados com o nome do género, seguido do nome do hospedeiro onde foram encontrados [Xiao *et al.*, 2004a].

10.2 ESPÉCIES QUE CAUSAM INFECCÃO HUMANA E EPIDEMIOLOGIA DA SUA TRANSMISSÃO

Nos anos que antecederam o aparecimento das técnicas de biologia molecular, a estrutura populacional do género *Cryptosporidium* era, ainda, desconhecida e a diferenciação das espécies era feita, somente, com base nas características morfológicas dos oocistos. Em consequência destes factos, pensou-se, durante algum tempo, que a espécie *C. parvum* era a única responsável pela criptosporidiose humana.

Só através da utilização de métodos de biologia molecular foi possível obter uma caracterização mais completa dos isolados, morfológicamente indistinguíveis, que eram causa de infecção humana. Em resultado desses trabalhos, sabe-se, hoje, que as espécies *C. parvum* e *C. hominis* são as responsáveis pela maioria das infecções no Homem [Awad-el-Kariem *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1995; Bonnin *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1997; Spano *et al.*, 1997b; Gibbons *et al.*, 1998; Spano *et al.*, 1998a, 1998b; Sulaiman *et al.*, 1998; Cacciò *et al.*, 1999; McLauchlin *et al.*, 1999; Ong *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2000, 2001a, 2003b].

Em 1999, Pieniazek *et al.* identificaram, nos EUA, em doentes infectados por VIH, para além de isolados de *C. parvum* e *C. hominis*, três isolados de *C. felis* e um isolado de *C. canis*, no que foi a primeira descrição destas duas espécies em humanos. Alguns meses depois, Morgan *et al.*, 2000a identificaram, também em doentes com infecção por VIH da Suíça, do Quênia e dos EUA, isolados de *C. felis* e de *C. meleagridis*, sendo esta a primeira vez que a segunda espécie foi identificada em humanos. Estas espécies foram, posteriormente, encontradas, também, em doentes imunocomprometidos em Portugal, em França e na Tailândia [Alves *et al.*, 2001a, 2001b; Guyot *et al.*, 2001; Gatei *et al.*, 2002b; Tiangtip e Jongwutiwes, 2002; Matos *et al.*, 2004]. Em 2000, no Reino Unido, Pedraza-Díaz *et al.* fizeram a primeira descrição da infecção por *C. meleagridis*, em seis indivíduos imunocompetentes. Um ano mais tarde, no

mesmo País, os mesmos autores descreveram, pela primeira vez, em duas crianças imunocompetentes, um caso de infecção por *C. felis* e outro por *C. canis* [Pedraza-Díaz *et al.*, 2001a]. Num estudo em crianças seronegativas para VIH, numa favela nos subúrbios de Lima, no Peru, onde a criptosporidiose é endêmica, Xiao *et al.* (2001a) encontraram, para além das espécies *C. parvum* e *C. hominis*, também, *C. canis*, *C. felis* e *C. meleagridis*, sendo a infecção por esta última espécie, quase tão frequente, como a observada para *C. parvum*.

Embora em prevalências bastantes inferiores, foram encontradas outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* associados à infecção humana, nomeadamente *C. muris* em quatro doentes com SIDA no Quênia, na Tailândia, no Peru e em França [Guyot *et al.*, 2001; Gatei *et al.*, 2002a; Tiangtip e Jongwutiwes, 2002; Palmer *et al.*, 2003], *Cryptosporidium* genótipo cervo, em nove casos de criptosporidiose esporádica no Canadá [Ong *et al.*, 2002] e *C. suis* num doente seropositivo para VIH, sem sintomatologia gastrointestinal, no Peru [Xiao *et al.*, 2002a].

No quadro V são apresentados alguns dos estudos mais recentes, envolvendo a caracterização de isolados humanos de *Cryptosporidium* spp., em várias regiões geográficas, evidenciando as espécies e genótipos mais vezes associadas à infecção no Homem.

A leitura do quadro V permite verificar que a distribuição da proporção de infecção por *C. parvum* e por *C. hominis* não é igual em todas as regiões, sendo, nos países Europeus, encontrada, com mais frequência, a espécie *C. parvum*, enquanto que *C. hominis* é a espécie predominante no resto do Mundo. Embora se desconheça o significado desta variação, ela poderá ser o reflexo, não só da presença de diferentes fontes de infecção, como, também, de diferenças na influência de cada ciclo de transmissão, na epidemiologia da criptosporidiose. Contudo, à luz dos conhecimentos actuais, estas constituem, apenas, especulações, baseadas numa observação superficial da informação disponível, sendo necessário desenvolver estudos epidemiológicos aprofundados, em comunidades bem definidas, para que se possa compreender o papel dos diferentes ciclos de transmissão, na epidemiologia da criptosporidiose nesses locais [Thompson, 2003; Xiao e Ryan, 2004]. O Reino Unido é dos países onde mais estudos têm sido efectuados nesse sentido.

QUADRO V – Resumo de alguns estudos de caracterização genética de isolados humanos de *Cryptosporidium* spp.

PAÍS	DOENTES	TOTAL	Nº DE DOENTES COM INFEÇÃO POR						REF ^a
			<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. felis</i>	<i>C. canis</i>	Outros	
ÁFRICA									
Malawi	Crianças	43	41	2	0	0	0	0	Peng <i>et al.</i> , 2003a
Quênia	Crianças e adultos VIH+	33	23	8	1	0	0	1 <i>C. muris</i>	Gatei <i>et al.</i> , 2003
Uganda	Crianças	435	326	85	5	0	0	19 (<i>C. parvum</i> + <i>C. hominis</i>)	Tumwine <i>et al.</i> , 2003
ÁSIA									
Japão	VIH –, VIH+	22	16	3	3	0	0	0	Yagita <i>et al.</i> , 2001
Tailândia	VIH +	34	17	5	7	3	2	0	Gatei <i>et al.</i> , 2002b
Tailândia	VIH +	29	24	0	3	1	0	1 <i>C. muris</i>	Tiangtip e Jongwutiwes, 2002
AMÉRICA									
Canadá	Casos esporádicos	150	108	29	0	0	0	9 <i>Cryptosporidium</i> gen. cervo 4 genótipos não identificados	Ong <i>et al.</i> , 2002
EUA	VIH +	10	5	1	0	3	1	0	Pieniazek <i>et al.</i> , 1999
Peru	Crianças VIH –	85	67	8	7	1	2	0	Xiao <i>et al.</i> , 2001a
Peru	VIH +	302	204	34	38	10	12	1 <i>C. suis</i> 2 (<i>C. hominis</i> + <i>C. canis</i>) 1 (<i>C. hominis</i> + <i>C. meleagridis</i>)	Cama <i>et al.</i> , 2003
EUROPA									
Dinamarca	Casos esporádicos	44	25	18	1	0	0	0	Enemark <i>et al.</i> , 2002a
França	VIH +	46	14	22	3	6	0	1 <i>C. muris</i>	Guyot <i>et al.</i> , 2001
Irlanda do Norte	Casos esporádicos	39	4	35	0	0	0	0	Lowery <i>et al.</i> , 2002
Portugal	VIH +	29	7	16	3	3	0	0	Alves <i>et al.</i> , 2003b
Reino Unido	Surtos, casos esporádicos	1705	645	1049	5	0	0	6 (<i>C. parvum</i> + <i>C. hominis</i>)	McLauchlin <i>et al.</i> , 2000
República Checa	Crianças VIH –	9	0	9	0	0	0	0	Hajdušek <i>et al.</i> , 2004
Suíça	VIH +	13	2	7	1	3	0	0	Morgan <i>et al.</i> , 2000a
Suíça	Adultos e crianças	9	0	9	0	0	0	0	Fretz <i>et al.</i> , 2003

Vários trabalhos realizados, no Reino Unido, mostraram que entre 65% a 84% dos casos esporádicos de criptosporidiose são originados por *C. parvum*, que se manifestam como pequenos surtos familiares, resultantes da transmissão secundária pessoa-a-pessoa, após a exposição inicial de um ou mais membros da família ao parasita. Os casos esporádicos, causados por *C. hominis* apresentam um pico sazonal no fim do Verão e início do Outono, em indivíduos que regressam ao País, após um período de férias no estrangeiro. Os surtos associados ao consumo de água de abastecimento contaminada com oocistos de *C. parvum*, verificam-se, na maior parte das vezes, durante os meses da Primavera, coincidindo com a época do nascimento dos cordeiros, dos surtos de criptosporidiose observados nestes animais, de determinadas práticas agrícolas e de chuvas fortes, que dão origem à contaminação dos recursos hídricos. Nos restantes meses do ano, sobretudo após períodos de chuva intensa, a maioria dos surtos hídricos são causados pela espécie *C. hominis*, devido ao transbordar e ao arrastamento de esgotos de origem humana, que vão contaminar os cursos de água [McLauchlin *et al.*, 2000; Goh *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2004].

A importância que a transmissão zoonótica tem, na epidemiologia da criptosporidiose, no Reino Unido, foi demonstrada, em 2001, durante o período da epidemia de febre aftosa, que atingiu aquele País. A implementação de medidas para o controlo da epidemia, como a redução do acesso às zonas rurais, o isolamento das quintas afectadas e a restrição da mobilidade dos animais, teve como consequência a redução de 35% no número de casos de criptosporidiose declarado às autoridades, principalmente dos provocados por *C. parvum*. As medidas adoptadas, para o controlo da transmissão da febre aftosa, alteraram, também, a epidemiologia da transmissão da criptosporidiose, por diminuição da exposição das pessoas ao reservatório zoonótico e da redução dos níveis de contaminação dos recursos hídricos [Smerdon *et al.*, 2003].

A epidemiologia da transmissão da criptosporidiose humana foi, também, estudada na Nova Zelândia, em várias comunidades rurais com grande implementação de explorações leiteiras e na zona metropolitana da cidade de Wellington. Os resultados obtidos evidenciaram que, nas comunidades rurais, 70% das infecções humanas eram devidas a *C. parvum*, sendo *C. hominis* responsável por, apenas, 30% das infecções. Resultados opostos foram encontrados na zona metropolitana, onde 89% dos casos de criptosporidiose detectados foram causados pela espécie antroponótica *C. hominis*, contra 11% dos casos provocados por *C. parvum*. Os autores observaram, ainda, variação sazonal da espécie predominante, ocorrendo quase todas

as infecções por *C. parvum* durante a Primavera, época do nascimento de cordeiros e bezerras, que exibem elevadas prevalências de criptosporidiose, predominando a infecção por *C. hominis* durante o Outono [Learmonth *et al.* 2004].

A transmissão de *C. parvum* ao Homem, através do contacto directo com animais infectados, encontra-se bem documentada [Miron *et al.*, 1991; Elwin *et al.*, 2001]. Embora não tenha sido devidamente esclarecida a origem da fonte de contaminação, existem, também, registos de surtos hídricos e alimentares causados por *C. parvum* [Peng *et al.*, 1997; Sulaiman *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1999]. Ainda que os hospedeiros naturais de *C. parvum*, como os ruminantes domésticos e alguns mamíferos silváticos, possam constituir reservatórios de infecção para o Homem, a interpretação do significado epidemiológico da infecção humana por *C. parvum* exige alguma cautela, na medida em que se desconhece a contribuição, não só da transmissão antroponótica desta espécie, como da transmissão hídrica e alimentar por contaminação de origem humana [Xiao *et al.*, 2004a; Xiao e Ryan 2004]. A identificação, no Homem, de infecções mistas por *C. hominis* e algumas espécies zoonóticas, como *C. parvum*, *C. meleagridis* e *C. canis* vem, também, reforçar a hipótese da possibilidade da transmissão antroponótica de espécies zoonóticas [McLauchlin *et al.*, 2000; Cama *et al.*, 2003; Tumwine *et al.*, 2003; Xiao e Ryan, 2004].

Os estudos realizados ao longo dos últimos anos evidenciaram a complexidade da epidemiologia da transmissão da criptosporidiose. As espécies *C. parvum* e *C. hominis* são as mais prevalentes no Homem, sendo, também, as responsáveis por todos os surtos em que foi possível caracterizar os parasitas neles envolvidos [Fayer *et al.*, 2000; McLauchlin *et al.*, 2000; Lowery *et al.*, 2002]. Contudo, a ideia inicial da existência de duas populações distintas de *C. parvum*, envolvidas em diferentes ciclos de transmissão, constitui uma visão simplista da epidemiologia da criptosporidiose. A descoberta de que outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* podem, também, ser causa de infecção humana, veio demonstrar a existência de ciclos de transmissão adicionais, envolvendo o que aparentam ser espécies e genótipos adaptados ao hospedeiro e cuja importância para a saúde pública não se encontra, ainda, completamente esclarecida (figura 7) [Thompson, 2003; Xiao e Ryan, 2004].

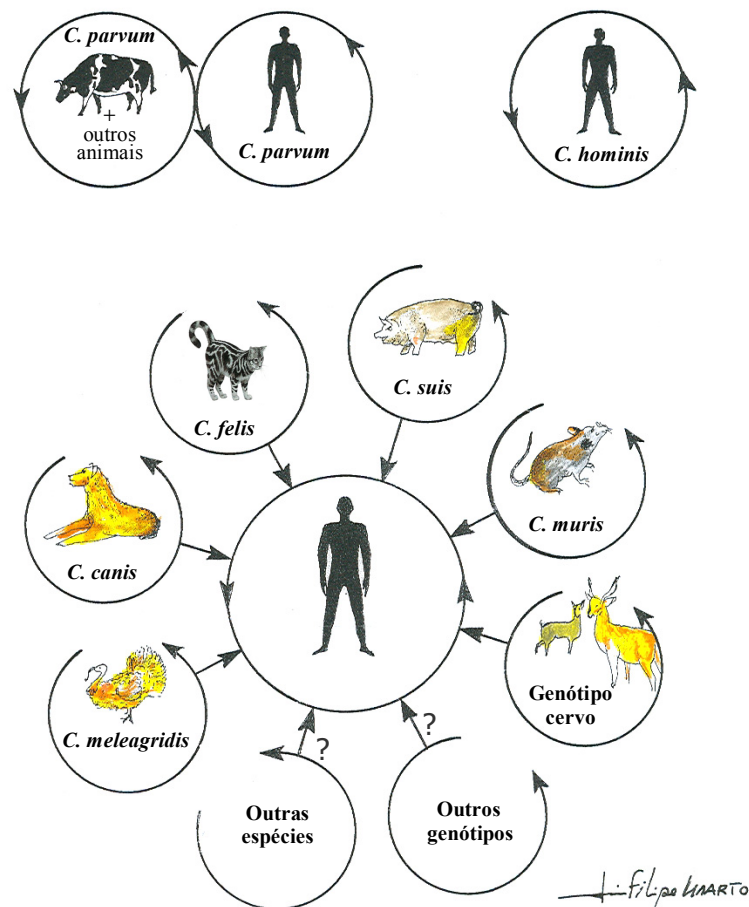


FIGURA 7 – Representação esquemática dos ciclos de transmissão e reservatórios de infecção das espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, associados à criptosporidiose humana [adaptado de Thompson, 2003]

10.3 ESPÉCIES E GENÓTIPOS ENCONTRADOS EM OUTROS HOSPEDEIROS VERTEBRADOS

A presença de microrganismos do género *Cryptosporidium*, em vários hospedeiros vertebrados, tem sido descrita por inúmeros autores. Na maioria dos casos, a identificação dos parasitas tem sido efectuada, unicamente, por observação microscópica da morfologia dos oocistos e, os isolados encontrados, têm sido designados como *C. parvum* ou *Cryptosporidium* spp.. Uma vez que, só recentemente, as metodologias de biologia molecular foram aplicadas ao estudo destes parasitas, desconhece-se quantos deles correspondem a espécies ou genótipos já identificados [Fayer, 2004].

O número de animais distintos, pertencentes ao grupo dos mamíferos, onde, até à data, foram encontrados parasitas de *Cryptosporidium* spp. ascende a 155 [Fayer, 2004]. Resultados de investigações recentes evidenciaram a existência de enorme diversidade biológica e genética entre as espécies de *Cryptosporidium* que infectam estes animais. As espécies de *Cryptosporidium* que têm como hospedeiros principais animais pertencentes ao grupo dos mamíferos são: *C. parvum*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. suis*, *C. canis*, *C. felis* e *C. wrairi*. Para além destas oito espécies foram, ainda, identificados dois genótipos de *C. canis* (genótipos raposa e coiote) e diversos genótipos de *Cryptosporidium* spp. adaptados ao hospedeiro [Xiao *et al.*, 2004a; Xiao e Ryan, 2004].

Apesar de a criptosporidiose ter sido descrita em mais de 30 espécies diferentes de aves, apenas se conhecem três espécies de *Cryptosporidium* responsáveis por essas infecções: *C. meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli*. Todas elas têm a capacidade de infectar um grande número de aves, divergindo, no entanto, quanto ao local de infecção (ver quadro I). Também entre os isolados de *Cryptosporidium* spp., encontrados em aves, foram identificados genótipos adaptados ao hospedeiro, nomeadamente quatro genótipos ganso, um genótipo pato e um genótipo galinhola [Xiao *et al.*, 2004a; Xiao e Ryan, 2004].

Entre os vertebrados, os répteis e, sobretudo as cobras, são os animais em que a criptosporidiose se manifesta de uma forma mais severa, sendo causa de elevada mortalidade. Apesar de vários autores terem documentado prevalências elevadas desta infecção, principalmente nos répteis em cativeiro, poucos têm efectuado a caracterização desses parasitas. As duas espécies, actualmente, conhecidas, como causa de infecção em répteis são *C. serpentis* e *C. saurophilum*. Dos genótipos adaptados ao hospedeiro encontrados nos répteis fazem parte dois genótipos cobra, um genótipo lagarto e um genótipo tartaruga [Xiao *et al.*, 2004a; Xiao e Ryan, 2004].

Nos peixes, é considerada válida a espécie *C. molnari*. No entanto, a definição desta espécie, por Alvarez-Pellitero e Sitjà-Bobadilla (2002), foi feita, unicamente, com base em características ultra-estruturais e histopatológicas, não tendo sido efectuada a caracterização genética dos parasitas. Recentemente, o mesmo grupo de trabalho descreveu uma nova espécie, *C. scophthalmi*, no epitélio intestinal de pregados (*Scophthalmi maximus* L.) de aquacultura [Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004]. Também neste caso, a caracterização da espécie foi baseada, exclusivamente, em observações ultraestruturais e histopatológicas. A ausência de uma identidade genética, para estas espécies, pode vir a constituir um problema no futuro,

quando forem identificados em peixes outro(s) parasita(s), que possa(m) vir a ser descrito(s) como nova(s) espécie(s) [Xiao *et al.*, 2004a; Xiao e Ryan, 2004].

Até há pouco tempo considerava-se que, somente, duas espécies eram responsáveis pela criptosporidiose em gado bovino: *C. parvum* e *C. andersoni*. Enquanto que a primeira infecta o intestino e provoca diarreia aguda, em animais não desmamados, a segunda infecta o abomaso, em animais jovens e adultos, não originando sintomatologia gastrintestinal, provocando, apenas, diminuição da produção de leite [Olson *et al.*, 2004]. Recentemente, foram identificados dois novos genótipos, em gado bovino, aos quais foi dado o nome de *Cryptosporidium* genótipo bovino B (posteriormente descrito como nova espécie – *C. bovis*) e *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo (do inglês, “deer-like genotype”) [Xiao *et al.*, 2002b; Santín *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2005]. Santín *et al.* (2004), estudaram 971 vitelos, pertencentes a 15 explorações pecuárias, localizadas em sete Estados Norte Americanos, tendo observado infecção por *C. parvum* em 100% dos animais até às duas semanas de vida e entre 60% a 90% dos vitelos até aos dois meses. A partir das duas semanas de vida já observaram, em alguns animais, a infecção por *C. bovis* e por *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo. Nos animais que já haviam sido desmamados (idade superior a três meses) não foi observada infecção por *C. parvum*, tendo, somente, sido encontrados *C. andersoni*, *C. bovis* e *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo. Uma vez que, das quatro espécies/genótipos encontrados em gado bovino, apenas *C. parvum* é conhecida como causa de infecção humana, só através da caracterização genética dos isolados implicados na criptosporidiose bovina se poderá avaliar o seu potencial zoonótico e determinar o risco de transmissão ao Homem [Santín *et al.*, 2004].

Em termos epidemiológicos, a característica de adaptabilidade ao hospedeiro, exibida pela maioria das espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, pode significar que grande parte destes parasitas não tem elevado potencial infectante para o Homem. De facto, a maioria das espécies e genótipos, encontradas em répteis e em muitos outros animais silváticos, apresentam um grupo restrito de hospedeiros onde causam infecção, nunca tendo sido encontrados em humanos. Recentemente, com o propósito de avaliar o risco para a saúde pública da contaminação do meio aquático com oocistos de *Cryptosporidium* spp., foi realizado, nos EUA, um estudo envolvendo cinco espécies de mamíferos que habitam terrenos adjacentes a zonas fluviais (raposa, castor, lontra, rato almiscareiro e guaxinim). A caracterização molecular, dos oocistos encontrados nesses hospedeiros, permitiu identificar *C.*

canis, *C. canis* genótipo raposa e mais três genótipos de *Cryptosporidium* spp. adaptados ao hospedeiro que, até à data, não foram encontrados em humanos, nem em gado doméstico. Os autores concluíram, assim, que as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* adaptados ao hospedeiro excretadas por estes animais, não constituem risco elevado para a saúde pública [Zhou *et al.*, 2004]. No entanto, a adaptabilidade ao hospedeiro não é sinónimo de estrita especificidade, sendo frequente encontrar-se uma determinada espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* spp. em mais do que um hospedeiro. Exemplos disso, são os casos de criptosporidiose humana, devidos à infecção pelas espécies zoonóticas *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* e *Cryptosporidium* genótipo cervo. Exceptuando *C. parvum* e *C. meleagridis*, encontrados, com mais frequência, em infecções humanas e que infectam um largo número de hospedeiros distintos, as restantes espécies infectam um número limitado de hospedeiros e, até à data, foram associadas a um pequeno número de casos humanos, a maioria deles em crianças e em infectados por VIH. Se, por um lado, é possível especular sobre a maior susceptibilidade dessas pessoas àqueles parasitas não se pode, por outro, excluir a possibilidade dos animais domésticos, de companhia e silváticos, constituírem potenciais reservatórios de infecção para o Homem. Todavia, o papel destes animais na transmissão das diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium* ao Homem é, ainda, desconhecido, em resultado da ausência de estudos epidemiológicos que permitam conhecer a sua prevalência naqueles animais. Deste modo, é necessário que a comunidade científica e as autoridades de saúde pública estejam atentas, na medida em que algumas das espécies e genótipos pouco prevalentes ou, ainda, não encontradas no Homem, podem emergir como novos parasitas humanos, se surgirem condições socioeconómicas e ambientais que favoreçam a sua transmissão [Xiao *et al.*, 2002b, 2004a; Xiao e Ryan, 2004].

10.4 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E DE GENÓTIPOS ENCONTRADOS NA ÁGUA

Os métodos convencionais, para detecção da presença de oocistos na água, baseiam-se no método 1622, recomendado pela “United States Environmental Protection Agency”, que consiste num processo de concentração por filtração, isolamento dos oocistos por separação imunomagnética e sua detecção por uma técnica de imunofluorescência [Carey *et al.*, 2004]. Contudo, este procedimento não permite a identificação das espécies e genótipos dos oocistos encontrados, invalidando, assim, a avaliação do risco que constitui, para a saúde pública, a sua

presença nos recursos hídricos. Embora seja frequente a contaminação de cursos e reservatórios de água, com oocistos de *Cryptosporidium* spp., é natural que nem todos pertençam a espécies responsáveis pela infecção humana, dado que as fontes de contaminação podem ser muito diversas [Xiao *et al.*, 2004a]. A possibilidade de aplicar as técnicas de biologia molecular à caracterização genética e à identificação dos isolados encontrados em amostras de água veio permitir identificar o seu potencial infectante para o Homem e ultrapassar as limitações associadas à utilização dos métodos convencionais.

Xiao *et al.* (2000a) analisaram 29 amostras de água de tempestade, recolhidas numa zona de floresta no Estado de Nova Iorque, tendo identificado a espécie *C. baileyi* e 11 genótipos diferentes de *Cryptosporidium* spp., todos eles adaptados a hospedeiros silváticos e nunca encontrados em humanos. O mesmo grupo de trabalho analisou, ainda, água superficial não tratada, recolhida em nove Estados Norte Americanos, tendo identificado a presença das espécies *C. parvum*, *C. hominis*, *C. andersoni* e *C. baileyi*, todas elas encontradas, com frequência no Homem ou em gado doméstico, sugerindo serem estas as principais fontes de contaminação [Xiao *et al.*, 2001b].

No Japão, estudos efectuados em amostras de água, recolhidas em vários rios, identificaram a presença das espécies *C. parvum* e *C. meleagridis*, levando os autores a sugerir a eventual contaminação com origem em gado doméstico [Karasudani *et al.*, 2001; Ono, *et al.*, 2001].

Na Europa, mais concretamente na Suíça e na Alemanha, em amostras de água superficial e de efluentes de estações de tratamento de águas residuais, foram encontrados oocistos de *C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. baileyi* e três genótipos silváticos não identificados, sendo as primeiras quatro espécies as mais prevalentes. Duas delas – *C. parvum* e *C. hominis* – são as responsáveis pela maioria dos casos de criptosporidiose humana devendo, a sua presença na água, constituir um alerta para as entidades de saúde pública. Entre as possíveis fontes de contaminação daqueles recursos hídricos, os autores enumeram o gado bovino, abundante naqueles países, efluentes de origem humana, pequenos roedores, aves aquáticas e outros animais silváticos [Ward *et al.*, 2002].

Na Irlanda do Norte, Lowery *et al.* (2001) analisaram diversas amostras de água superficial tratada e não tratada, tendo identificado *C. parvum* como a única espécie de *Cryptosporidium* presente nas amostras estudadas.

A presença de *C. andersoni*, *C. bayleyi*, *C. muris* e diversos genótipos silváticos na água, indica a provável contaminação por gado doméstico e por alguns animais silváticos. Porém, é importante salientar que a identificação de *C. parvum* na água não permite uma associação tão linear ao reservatório zoonótico, dada a possibilidade da sua contaminação ter tido origem humana [Xiao *et al.*, 2004a].

Os casos aqui descritos confirmam a diversidade de espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, presentes nos cursos e reservatórios de água. Sendo que apenas parte destes parasitas é responsável pela infecção humana, a avaliação do risco para a saúde pública, que constitui a sua presença nos recursos hídricos, só poderá ser determinada com o auxílio de técnicas de biologia molecular, para identificação do seu potencial infectante para o Homem. Todavia, é fundamental salientar que a avaliação do risco para a saúde pública só se completa após a determinação da viabilidade e infecciosidade dos oocistos encontrados [Centers for Disease Control and Prevention, 1995; Joachim, 2004].

10.5 VARIAÇÃO INTRA-ESPECÍFICA EM *C. PARVUM* E *C. HOMINIS*

Recentemente, a caracterização de vários *loci* genéticos, em isolados de *C. hominis* e *C. parvum* evidenciou a existência de polimorfismos intra-específicos, que permitiam a identificação de vários alelos e subtipos dentro de cada uma das espécies [Aiello *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2000; Strong *et al.*, 2000; Cacciò *et al.*, 2001]. O reconhecimento desta heterogeneidade intra-específica possibilitou o desenvolvimento de métodos que permitem atingir maior resolução da variabilidade genética existente em isolados de *C. hominis* e de *C. parvum*.

Os microssatélites, também chamados repetições curtas aleatórias ou STR's (sigla anglo-saxónica para "short tandem repeats"), são pequenas unidades de DNA não codificante, constituídas por dois a sete nucleótidos, que se repetem sucessivamente e se encontram, amplamente, distribuídas no genoma de vários organismos eucariotas. O número de vezes que essas unidades se encontram repetidas é muito polimórfico, permitindo a distinção de vários alelos, em função do número de repetições existentes [Weber e May, 1989]. A análise de STR's tem sido utilizada, por alguns autores, para avaliar a variabilidade intra-específica existente em *C. hominis* e em *C. parvum*. Cacciò *et al.* (2000), através da análise de um *locus* de microssatélites, em vários isolados humanos e bovinos, oriundos da Itália, da Holanda, do Japão e dos EUA, observaram a existência de dois alelos distintos em *C. hominis* e quatro em

C. parvum. Num outro *locus*, os mesmos autores observaram, ainda, a existência de sete alelos distintos entre os isolados de *C. parvum* de origem humana e bovina, de várias regiões de Itália. Um destes alelos foi identificado, somente, em isolados humanos, acontecendo o contrário com outros dois alelos, encontrados, exclusivamente, em isolados bovinos [Cacciò *et al.*, 2001]. Feng *et al.* (2000) identificaram no genoma de *C. hominis* e *C. parvum* 14 *loci* de STR's, tendo avaliado a sua utilidade na caracterização intra-específica dos parasitas daquelas espécies. Enquanto que alguns destes *loci* se revelaram muito polimórficos, com os isolados de ambas as espécies a exibirem vários alelos diferentes, outros apresentaram uma resolução mais limitada, não permitindo observar variação genética, em uma ou ambas as espécies. Na Dinamarca, Enemark *et al.* (2002a) utilizaram o STR descrito por Cacciò *et al.* (2000), para a caracterização de *C. hominis* e *C. parvum* de origem humana e bovina, tendo encontrado, nos isolados de *C. hominis*, um dos dois alelos identificados, inicialmente, por Cacciò e colaboradores e, nos parasitas de *C. parvum*, três dos quatro alelos descritos, também, por estes autores. Mallon *et al.* (2003a) analisaram, em 180 isolados humanos e bovinos de *C. parvum* e *C. hominis*, da região de Aberdeenshire, na Escócia, sete *loci* de microssatélites. O número de alelos observados, para as duas espécies, nos sete marcadores, variou entre o mínimo de três e o máximo de 13. A combinação do alelo exibido por cada isolado para cada um dos sete *loci* permitiu identificar 37 haplotipos distintos, sete correspondentes à espécie *C. hominis* e os restantes 30 a *C. parvum*. A construção de um dendograma de semelhança para os diferentes haplotipos juntou todos os isolados de *C. hominis* no mesmo grupo, embora sendo evidente a sua separação em dois subgrupos distintos. Os isolados de *C. parvum* foram distribuídos por cinco grupos diferentes, contendo, dois deles, unicamente isolados de origem humana e os restantes três, isolados de ambos os hospedeiros.

O gene GP60 (também denominado gp15/45/60) codifica uma glicoproteína precursora de 60-kDa que, após clivagem, dá origem às glicoproteínas de superfície gp45 e gp15, envolvidas na ligação e na invasão dos enterócitos pelos esporozoítos. A sequenciação do gene GP60, em isolados de humanos e de bovinos de diferentes regiões geográficas, revelou que este *locus* apresenta elevada variabilidade genética, exibindo vários polimorfismos, principalmente entre os isolados de *C. hominis* [Strong *et al.*, 2000]. Estes autores encontraram quatro subtipos diferentes, entre os isolados desta espécie, não tendo observado variação em *C. parvum*. Várias outras investigações se seguiram envolvendo a sequenciação do gene GP60 em isolados humanos e bovinos, de países como o Malawi, o Quênia, a Guatemala, o Kuwait,

a África do Sul, Portugal, a Irlanda do Norte, a Austrália e os EUA, tendo mostrado a existência de inúmeros polimorfismos tanto em *C. parvum* como em *C. hominis*. Actualmente, encontram-se identificadas 11 famílias de subtipos, cinco em *C. hominis* e seis em *C. parvum* compreendendo, cada uma, vários subtipos distintos. A maioria das famílias descritas apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em isolados de regiões muito diferentes. Do mesmo modo, numa determinada região geográfica, tem sido observada a presença de várias famílias diferentes. Somente um pequeno número de famílias de subtipos apresenta distribuição geográfica limitada, sendo estas encontradas, apenas, em isolados de regiões geográficas restritas [Peng *et al.*, 2001; Sulaiman *et al.*, 2001; Glaberman *et al.*, 2002; Leav *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003b; Peng *et al.*, 2003a, 2003b; Sulaiman *et al.*, 2005].

A elevada resolução obtida através da caracterização do gene GP60, em isolados de *C. hominis* e de *C. parvum*, apresenta enorme potencial, não só para a identificação de fontes de infecção, em situações de surto, constituindo informação valiosa para a implementação de medidas de controlo da transmissão, mas, também, para a caracterização da dinâmica da transmissão da criptosporidiose, em zonas endémicas [Feng *et al.*, 2000; Mallon *et al.*, 2003a; Xiao e Ryan, 2004].

A investigação realizada, ao longo dos últimos anos, no âmbito da epidemiologia molecular da criptosporidiose, trouxe alguns progressos importantes no que diz respeito ao conhecimento da diversidade de microrganismos que constituem o género *Cryptosporidium*, do significado para a saúde pública de alguns desses parasitas e da existência de vários ciclos de transmissão distintos que envolvem o Homem. Contudo, muitas questões continuam, ainda, em aberto, nomeadamente no que se refere à importância das espécies zoonóticas para a saúde pública, à dinâmica da transmissão da criptosporidiose em diferentes comunidades, ao significado da variação geográfica da distribuição dos casos humanos, devidos a *C. hominis* e a *C. parvum*, na transmissão da doença e, ainda, à correlação entre as características genéticas dos parasitas com a sua virulência e patogenicidade. O conhecimento aprofundado de todas estas questões possibilitará, num futuro que esperamos próximo, desenvolver estratégias de prevenção e de controlo adequadas, capazes de quebrar os ciclos de transmissão da criptosporidiose humana [Thompson, 2003; Xiao e Ryan, 2004].

- Segunda Parte -

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA CRIPTOSPORIDIOSE EM
PORTUGAL**

Capítulo 1



OBJECTIVOS

A realização do trabalho apresentado nesta dissertação foi motivada pela escassa informação existente acerca da epidemiologia e da transmissão da criptosporidiose em Portugal, em especial, sobre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* que infectam o Homem e outros animais e sobre os potenciais reservatórios da infecção humana. Assim, os objectivos que nos propusemos atingir foram os seguintes:

- i) Determinação da percentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp., em doentes infectados por VIH com sintomatologia gastrointestinal, no período de 2001 a 2005.
- ii) Avaliação da presença de *Cryptosporidium* spp., em animais de companhia, animais silváticos de vida livre e animais silváticos em cativeiro.
- iii) Caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium* spp. de doentes infectados por VIH e identificação da diversidade de espécies e genótipos, responsáveis pela infecção nesta população.
- iv) Caracterização molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp. de gado bovino e ovino e de animais de companhia e silváticos e identificação da diversidade de espécies e genótipos associados à infecção, nestes animais.
- v) Determinação da variabilidade intra-específica dos isolados de *C. hominis* e *C. parvum* de origem humana e animal.

Com o presente trabalho esperamos poder contribuir para um melhor conhecimento da extensão e diversidade genética dos parasitas responsáveis pela criptosporidiose humana, na população infectada por VIH, no nosso País. A identificação das espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, que infectam o gado doméstico e os animais de companhia e silváticos, pode ser útil para determinar o seu potencial como fonte de contaminação ambiental e como reservatório zoonótico da infecção humana. A determinação da presença destes parasitas em animais de companhia é importante para avaliar o seu papel como fonte de infecção para o Homem e o risco que constituem, principalmente, para doentes com função imunológica comprometida. A caracterização intra-específica de *C. hominis* e de *C. parvum*, ao permitir maior resolução da variabilidade genética dos isolados pertencentes a estas espécies, pode contribuir para a clarificação do papel desempenhado por cada modo de transmissão na epidemiologia da criptosporidiose humana e da importância de gado doméstico e animais silváticos, nessa mesma transmissão, em Portugal.

Capítulo 11



MATERIAL E MÉTODOS

1. POPULAÇÃO ESTUDADA

1.1 POPULAÇÃO HUMANA

No período compreendido entre Junho de 2001 e Janeiro de 2005 foram recolhidas amostras fecais de 217 doentes infectados por VIH, com sintomatologia gastrointestinal, provenientes, na sua maioria, de diversos Hospitais da Região de Lisboa mas, também, de outros Hospitais do País, nomeadamente, Setúbal, Beja e Faro. Todas as amostras fecais recolhidas foram submetidas a técnicas parasitológicas, para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Os isolados identificados foram, posteriormente, caracterizados por meio de técnicas de biologia molecular.

Para além das amostras recolhidas, foram incluídas no estudo de caracterização molecular 41 isolados de *Cryptosporidium* spp., cuja detecção por diagnóstico parasitológico foi anterior ao início do presente trabalho. Este grupo era composto por 15 isolados colhidos entre Dezembro de 1994 e Agosto de 1997 [Matos *et al.*, 1998], que se encontravam conservados a 4°C em mertiolato/iodo/formaldeído (MIF) e 26 isolados, identificados entre Setembro de 1997 e Maio de 2001 [Alves *et al.*, 2000; Matos *et al.*, 2002], que se encontravam conservados a 4°C, em dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) a 5%. Quarenta desses isolados foram obtidos a partir de amostras fecais de doentes com infecção VIH/SIDA e, um, num indivíduo seronegativo para VIH, que apresentava síndrome da esplenomegalia tropical, anemia hemolítica e serologia positiva para *Plasmodium* spp..

1.2 POPULAÇÃO ANIMAL

O estudo da criptosporidiose animal incidiu sobre animais de companhia e silváticos. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp., detectados nas amostras fecais por técnicas parasitológicas, foram, posteriormente, caracterizados por aplicação de técnicas de biologia molecular.

No estudo de caracterização molecular foram, também, incluídos isolados de bovinos, de ovinos e de alguns animais silváticos, cuja identificação parasitológica antecedeu o início do presente trabalho.

1.2.1 GADO BOVINO E OVINO

A caracterização molecular de parasitas de origem bovina e ovina, pertencentes ao género *Cryptosporidium*, foi realizada nos isolados identificados em estudos epidemiológicos efectuados por três investigadores na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). As colheitas das amostras fecais ocorreram nos períodos de Janeiro de 1996 a Março de 1998 [Pereira da Fonseca, 2000], de Dezembro de 1999 a Fevereiro de 2000 [Lourenço, 2000] e de Setembro de 2001 a Junho de 2002 [Lemos, 2002]. As fezes encontravam-se conservadas a 4°C, em dicromato de potássio a 5%.

No total, foram submetidos a caracterização molecular 110 isolados de vitelos, provenientes de explorações leiteiras de várias regiões de Portugal, conforme discriminado no quadro VI. Destes 110 animais, 62 tinham menos de 38 dias de vida, três tinham entre 45 e 80 dias e um tinha quatro meses de idade. Não foi possível obter informação sobre a idade dos restantes 44 animais. Para além destes isolados bovinos, foram, ainda, caracterizados dois isolados de ovinos, de idade e origem desconhecidas.

QUADRO VI – Origem dos isolados bovinos de *Cryptosporidium* spp. incluídos no estudo de caracterização molecular

PROVÍNCIA (CONCELHO)	N.º DE ISOLADOS ESTUDADOS
Alto Alentejo (Montemor-o-Novo)	60
Baixo Alentejo (Odemira)	6
Estremadura (Lourinhã, Pêro Pinheiro, Odivelas, Sintra)	13
Ribatejo (Chamusca, Santarém)	14
Açores (S. Miguel)	11
Desconhecida	6

1.2.2 ANIMAIS DE COMPANHIA

O estudo sobre a criptosporidiose, em animais de companhia, incidiu, unicamente, sobre cães e gatos. No período compreendido entre Janeiro de 2001 e Dezembro de 2004 foram recolhidas, com a colaboração de alguns Médicos Veterinários e de particulares, amostras fecais de 209 animais com dono, nomeadamente, de 100 cães e 109 gatos. Os animais estudados eram jovens e adultos, com e sem diarreia, provenientes dos Distritos de Lisboa

(67% dos cães e 95% dos gatos), de Setúbal (24% dos cães e 3% dos gatos) e de Évora (9% dos cães e 2% dos gatos).

Para além dos animais com dono, foram, ainda, recolhidas, entre Fevereiro e Abril de 2004, amostras fecais de 57 cães de rua, nomeadamente de dez albergados no Canil Municipal de Torres Vedras e de 47 acolhidos no Canil Municipal de Lisboa. As amostras pertenciam a animais jovens e adultos. Apenas dois animais com idade inferior a dois meses e um adulto apresentavam diarreia.

Todas as amostras foram submetidas a técnicas parasitológicas, para identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., tendo, estes últimos, sido submetidos a técnicas de biologia molecular para determinação da sua espécie.

1.2.3 ANIMAIS SILVÁTICOS DE VIDA LIVRE

O estudo sobre a presença de *Cryptosporidium* spp. em animais silváticos de vida livre foi efectuado num grupo de 147 indivíduos, do qual faziam parte carnívoros e pequenos mamíferos (insectívoros e roedores). No grupo dos carnívoros, foram analisadas amostras fecais de 13 raposas, capturadas no concelho de Barrancos, Baixo Alentejo, em Janeiro de 2002. Os pequenos mamíferos, num total de 134, foram capturados em Maio, Agosto e Novembro de 2003, nos concelhos de Moura e Aljustrel, Baixo Alentejo. Foram estudados 52 insectívoros, todos pertencentes à espécie *Crocidura russula*, vulgarmente denominada musaranho de dentes brancos. Entre os roedores, encontravam-se 80 ratinhos ruivos (*Mus spretus*) e dois ratinhos do campo (*Apodemus sylvaticus*). Todos os animais estudados eram adultos e nenhum deles apresentava diarreia. Todas as amostras fecais recolhidas foram submetidas a técnicas parasitológicas, para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp..

Para além das amostras submetidas a diagnóstico parasitológico foram, ainda, caracterizados, por técnicas de biologia molecular, isolados de *Cryptosporidium* spp. identificados em amostras fecais de 12 gamos (*Dama dama* L.), capturados na Tapada Nacional de Mafra, entre Dezembro de 1999 e Janeiro de 2000 [Lourenço *et al.*, 2000]. Estas amostras fecais encontravam-se conservadas a 4°C, em dicromato de potássio a 5%.

1.2.4 ANIMAIS SILVÁTICOS EM CATIVEIRO

Entre Abril de 2002 e Fevereiro de 2003, foram recolhidas 217, 57 e 40 amostras fecais correspondentes, respectivamente, a 100 espécies de mamíferos, 28 espécies de répteis e 37 espécies de aves cativas no Jardim Zoológico de Lisboa. Sempre que possível, a recolha das amostras fecais dos mamíferos foi efectuada mensalmente. No caso dos répteis, as amostras foram recolhidas nos meses de Abril e Junho de 2002 e de Janeiro e Fevereiro de 2003. As amostras fecais das aves foram recolhidas uma única vez, no mês de Agosto de 2002. As amostras foram colhidas, pelos tratadores dos animais, do solo, ao acaso, tendo sido dada preferência a fezes diarreicas, no caso de elas existirem. Nos quadros VII, VIII e IX encontram-se descritos os nomes de todos os animais estudados.

Com excepção de duas crias de leão, todos os mamíferos estudados eram adultos e não apresentavam sintomatologia gastrointestinal. Entre os répteis estudados, encontravam-se animais jovens e adultos, sem evidência de diarreia, à excepção de uma tartaruga estrela indiana. Este animal havia chegado ao Jardim Zoológico de Lisboa, proveniente de Singapura, três dias antes da recolha de fezes, apresentava doença grave de etiologia múltipla e morreu passadas duas semanas. Todas as aves estudadas eram adultas e não apresentavam sinais de diarreia.

QUADRO VII – Répteis do Jardim Zoológico de Lisboa cujas fezes foram submetidas a técnicas parasitológicas, para identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

NOME (ESPÉCIE)	
Tartaruga gigante de Aldabra (<i>Geochelone gigantea</i>)	Sucuri amarela (<i>Eunectes notaeus</i>)
Tartaruga estrela indiana (<i>Geochelone elegans</i>)	Jibóia arborícola de Madagáscar (<i>Sanzinia madagascariensis</i>)
Tartaruga panqueca (<i>Malacochersus tornieri</i>)	Pitão da Birmânia (<i>Python molurus bivittatus</i>)
Tartaruga do Egipto (<i>Testudo kleinmanni</i>)	Serpente rei de riscas (<i>Lampropeltis alterna</i>)
Tartaruga espinhosa (<i>Chelydra serpentina</i>)	Falsa cobra coral (<i>Lampropeltis triangulum campbelli</i>)
Tartaruga aligator (<i>Macrolemys temminckii</i>)	Cobra preta (<i>Naja melanoleuca</i>)
Lagarto dragão (<i>Acanthodraco vitticeps</i>)	Naja indiana (<i>Naja naja kaouthia</i>)
Camaleão pantera (<i>Chamaeleo pardalis</i>)	Cobra do cabo (<i>Naja nivea</i>)
Iguana rinoceronte (<i>Cyclura cornuta</i>)	Cascavel diamante ocidental (<i>Crotalus adamanteus</i>)
Iguana de Cuba (<i>Cyclura nubila nubila</i>)	Cascavel atrox (<i>Crotalus atrox</i>)
Iguana verde (<i>Iguana iguana</i>)	Cascavel sul-americana (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)
Dragão do Komodo (<i>Varanus komodoensis</i>)	Cascavel vegrandis (<i>Crotalus vegrandis</i>)
Jibóia da Jamaica (<i>Epicrates subflavus</i>)	Víbora do Gabão (<i>Bitis gabonica rhinoceros</i>)
Jibóia de Cuba (<i>Epicrates angulifer</i>)	Pitão de Boelen (<i>Morelia boeleni</i>)

QUADRO VIII – Mamíferos do Jardim Zoológico de Lisboa cujas fezes foram submetidas a técnicas parasitológicas, para identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

NOME (ESPÉCIE)		
Canguru de pescoço vermelho (<i>Macropus rufogriseus</i>)	Babuíno da Guiné (<i>Papio cynocephalus papio</i>)	Hipopótamo pigmeu (<i>Choeropsis liberiensis liberiensis</i>)
Lémure de cauda anelada (<i>Lemur catta</i>)	Babuíno Hamadrias (<i>Papio hamadryas hamadryas</i>)	Hipopótamo (<i>Hippopotamus amphibius</i>)
Lémure de face branca (<i>Lemur macaco albifrons</i>)	Mandril (<i>Papio sphinx</i>)	Camelo (<i>Camelus bactrianus bactrianus</i>)
Lémure preto (<i>Lemur macaco macaco</i>)	Langur de Douc (<i>Pygathrix nemaeus nemaeus</i>)	Dromedário (<i>Camelus dromedarius</i>)
Lémure mangusto (<i>Lemur mongoz</i>)	Gorila (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	Lama (<i>Lama glama glama</i>),
Lémure castanho (<i>Varecia variegata rubra</i>)	Gibão de mãos brancas (<i>Hylobates lar</i>)	Axis (<i>Cervus axis axis</i>)
Lémure de colar preto e branco (<i>Lemur variegatus variegatus</i>)	Siamango (<i>Hylobates syndactylus</i>)	Veado do Canadá (<i>Cervus elaphus canadensis</i>)
Macaco uivador (<i>Alouatta caraya</i>)	Chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)	Veado da Birmânia (<i>Cervus eldi thamin</i>)
Macaco capuchinho (<i>Cebus apella</i>)	Preguiça de dois dedos (<i>Choloepus didactylus</i>)	Girafa de Angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)
Saki de face branca (<i>Pithecia pithecia</i>)	Lobo ibérico (<i>Canis lupus signatus</i>)	Cabra (<i>Capra hircus hircus</i>)
Macaco Goeldi (<i>Callimico goeldii</i>)	Feneca (<i>Fennecus zerda</i>)	Addax (<i>Addax nasomaculatus</i>)
Saguim prateado (<i>Callithrix argentata</i>)	Raposa (<i>Vulpes vulpes silacea</i>)	Impala de face negra (<i>Aepyceros melampus petersi</i>)
Saguim de face branca (<i>Callithrix geoffroyi</i>)	Urso do Tibete (<i>Selenarctos thibetanus</i>)	Vaca do mato (<i>Alcelaphus buselaphus caama</i>)
Mico leão de juba dourada (<i>Leontopithecus rosalia chrysomelas</i>)	Urso pardo (<i>Ursus arctos</i>)	Muflão africano (<i>Ammotragus lervia</i>)
Mico leão dourado (<i>Leontopithecus rosalia rosalia</i>)	Chita (<i>Acinonyx jubatus jubatus</i>)	Cervicapra (<i>Antilope cervicapra</i>)
Saguim de cabeça castanha (<i>Saguinus fuscicollis</i>)	Lince ibérico (<i>Felis lynx lynx</i>)	Bisonte americano (<i>Bison bison bison</i>)
Saguim imperador (<i>Saguinus imperator subgriseus</i>)	Ocelote (<i>Felis pardalis</i>)	Iaque (<i>Bos mutus grunniens</i>)
Saguim de beicho branco (<i>Saguinus labiatus labiatus</i>)	Serval (<i>Felis serval</i>)	Gnu de cauda branca (<i>Connochaetes gnou</i>)
Saguim de mãos douradas (<i>Saguinus midas midas</i>)	Pantera nebulosa (<i>Neofelis nebulosa</i>)	Gnu azul (<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>)
Saguim de mãos negras (<i>Saguinus midas niger</i>)	Leão de Angola (<i>Panthera leo bleyenberghi</i>)	Damalisco dorcas (<i>Damaliscus dorcas dorcas</i>)
Saguim cabeça de algodão (<i>Saguinus oedipus oedipus</i>)	Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	Palanca ruana (<i>Hippotragus equinus</i>)
Macaco tarrafe (<i>Cercopithecus aethiops sabeus</i>)	Leopardo (<i>Panthera pardus</i>)	Palanca negra (<i>Hippotragus niger niger</i>)
Macaco de cauda vermelha (<i>Cercopithecus ascanius ascanius</i>)	Tigre da Sibéria (<i>Panthera tigris altaica</i>)	Cobo de crescente (<i>Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus</i>)
Macaco de beicho branco (<i>Cercopithecus cephus cephus</i>)	Tigre de Sumatra (<i>Panthera tigris sumatrae</i>)	Cobo de leite (<i>Kobus leche leche</i>)
Macaco Diana (<i>Cercopithecus diana diana</i>)	Pantera das neves (<i>Panthera uncia</i>)	Orix Cimitarra (<i>Oryx dammah</i>)
Macaco mona (<i>Cercopithecus mona</i>)	Leão marinho da Califórnia (<i>Zalophus californianus</i>)	Orix austral (<i>Oryx gazella gazella</i>)
Macaco de Brazza (<i>Cercopithecus neglectus</i>)	Foca vitulina (<i>Phoca vitulina</i>)	Orix da Arábia (<i>Oryx leucoryx</i>)
Macaco de nariz branco (<i>Cercopithecus petaurista petaurista</i>)	Elefante indiano (<i>Elephas maximus indicus</i>)	Búfalo africano (<i>Syncerus caffer caffer</i>)
Colobo Guerezza (<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>)	Elefante africano (<i>Loxodonta africana africana</i>)	Pacaça (<i>Syncerus caffer nanus</i>)
Macaco do Japão (<i>Macaca fuscata fuscata</i>)	Zebra de Grevy (<i>Equus grevyi</i>)	Elande (<i>Taurotragus oryx oryx</i>)
Macaco cauda de leão (<i>Macaca silenus</i>)	Burro (<i>Equus asinus</i>)	Niala (<i>Tragelaphus angasi</i>)
	Pônei (<i>Equus caballus</i>)	Bongo (<i>Tragelaphus eurycerus isaaci</i>)
	Rinoceronte branco (<i>Ceratotherium simum simum</i>)	Sitatunga (<i>Tragelaphus spekei gratus</i>)
	Rinoceronte indiano (<i>Rhinoceros unicornis</i>)	Cavalo de Timor (<i>Tragelaphus strepsiceros strepsiceros</i>)
	Porco (<i>Sus scrofa</i>)	

QUADRO IX – Aves do Jardim Zoológico de Lisboa cujas fezes foram submetidas a técnicas parasitológicas, para identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

NOME (ESPÉCIE)	
Faisão Lady Amherst (<i>Chrysolophus amherstiae</i>)	Catua de Leadbeater (<i>Catua leadbeateri</i>)
Faisão dourado (<i>Chrysolophus pictus</i>)	Catua galah (<i>Elophus roseicapillus</i>)
Faisão manchuriano azul (<i>Crossoptilon aurtium</i>)	Papagaio chuão (<i>Amazona dufresniana rhodocorytha</i>)
Faisão manchuriano do Tibete (<i>Crossoptilon crossoptilon drouynii</i>)	Papagaio de face verde (<i>Amazona viridigenalis</i>)
Faisão siamês (<i>Lophura diardi</i>)	Arara maracanã (<i>Ara maracana</i>)
Faisão de Edward (<i>Lophura edwardsi</i>)	Arara nanica (<i>Ara nobilis nobilis</i>)
Faisão imperial (<i>Lophura imperialis</i>)	Jandaia ventre de fogo (<i>Aratinga auricapilla aurifrons</i>)
Faisão Swinhoe (<i>Lophura swinhoii</i>)	Periquito dourado (<i>Aratinga guarouba</i>)
Faisão de Palawan (<i>Polyplectron emphanum</i>)	Jandaia (<i>Aratinga jandaya</i>)
Faisão de Germain (<i>Polyplectron germaini</i>)	Papagaio cabeça de falcão (<i>Deropitrus accipitrinus accipitrinus</i>)
Faisão de Elliot (<i>Syrmaticus ellioti</i>)	Papagaio eclectus (<i>Eclectus roratus polychloros</i>)
Faisão venerado (<i>Syrmaticus reevesi</i>)	Marianinha de cabeça branca (<i>Pionites leucogaster</i>)
Faisão tragopan Satyr (<i>Tragopan satyra</i>)	Papagaio de bico grosso (<i>Rhynchopsitta pachyrhyncha</i>)
Faisão tragopan Temminck (<i>Tragopan temminckii</i>)	Turaco da costa dourada (<i>Tauraco corythaix persa</i>)
Pombo da fruta de ventre laranja (<i>Ptilinopus iozonus</i>)	Turaco de face branca (<i>Tauraco leucotis leucotis</i>)
Pombo da fruta de garganta preta (<i>Ptilinopus leclancheri</i>)	Turaco de bico preto (<i>Tauraco schuetti</i>)
Pombo da fruta soberbo (<i>Ptilinopus superbus</i>)	Turaco violeta (<i>Musophaga violácea violacea</i>)
Catua pequena de crista amarela (<i>Catua sulphurea sulphurea</i>)	Turaco de Hartlaub (<i>Tauraco hartlaubi</i>)
	Kokaburra (<i>Dacelo novaeguineae</i>)

As amostras fecais foram submetidas a técnicas parasitológicas, para o diagnóstico da criptosporidiose. Os isolados detectados foram, subsequentemente, sujeitos a caracterização genética, fazendo uso de técnicas de biologia molecular.

A caracterização molecular foi, também, realizada em oito isolados, detectados por diagnóstico parasitológico, em igual número de animais, pertencentes a três espécies de Bovídeos (órix austral, órix da arábia e addax), cativos no Zoo de Lisboa. Estes isolados foram identificados, no âmbito de um estudo epidemiológico realizado entre Setembro de 1998 e Agosto de 1999, por Delgado (2000), na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, do IHMT, e encontravam-se conservados a 4°C, em dicromato de potássio a 5%. Para além destes, foram, ainda, estudados três isolados pertencentes a duas espécies de Bovídeos (addax e elande) do Zoo de Lisboa, identificados por Isabel Fonseca, em 1996, que se encontravam armazenados em condições idênticas às acima descritas.

2. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

O diagnóstico parasitológico da criptosporidiose consistiu na observação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em esfregaços de fezes. Todas as amostras fecais, humanas e animais, recolhidas no âmbito do presente trabalho, foram sujeitas a um processo de concentração, a um método de coloração histoquímica dos esfregaços directo e concentrado e, subsequente, observação ao microscópio óptico.

Todas as amostras de fezes em que foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp., foram diluídas em igual volume de dicromato de potássio a 5% e armazenadas a 4°C.

2.1 CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS

A concentração das amostras de feçais foi efectuada segundo o método de sedimentação difásica de Ritchie modificado, adaptado de Casemore *et al.* (1985a).

Num tubo de centrífuga cónico, com capacidade de 12 ml, foi ressuspensa uma alíquota de fezes, em 3 ml de água desionizada. Após a adição de 3 ml de éter e agitação vigorosa, a suspensão foi filtrada através de uma gaze para um novo tubo, com a finalidade de remover os detritos fecais de maior dimensão. Uma vez completado o volume final, com água desionizada, a amostra foi centrifugada a 400 g, durante cinco minutos. Depois de desprezada a fase etérea, o sobrenadante foi retirado para um tubo limpo, perfez-se o volume final com água desionizada e realizou-se nova centrifugação, desta vez a 4.100 g, durante dez minutos. O sedimento, originado na primeira centrifugação, foi guardado, para posterior pesquisa de ovos, quistos e parasitas. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado e, com o sedimento resultante, prepararam-se dois esfregaços numa lâmina onde, inicialmente, se havia feito um esfregaço directo das fezes. Ambos os sedimentos foram conservados a 4°C, a aguardar o resultado do diagnóstico parasitológico; em caso de diagnóstico positivo, foram submetidos a uma técnica de extracção de DNA (*vide* pág. 82).

2.2 COLORAÇÃO DIFERENCIAL

O método de coloração histoquímica, utilizado para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em esfregaços fecais, foi o Ziehl-Neelsen modificado.

A técnica foi realizada com algumas pequenas alterações, relativamente à descrição de Casemore *et al.* (1985a). Assim, os esfregaços fecais, já secos, foram fixados com metanol, durante um minuto. Em seguida, foram corados com fucsina fénica (fucsina básica em pó 1% m/v, fenol cristalizado 5% m/v, álcool absoluto 10% v/v), por dez minutos e, após lavagem com água, foram descorados com álcool clorídrico a 1%, até à eliminação total do corante em excesso. Depois de nova lavagem com água, os esfregaços foram corados com verde de malaquite a 0,4%, durante 30 segundos e, de novo, lavados com água. Depois de secos, procedeu-se à sua observação ao microscópio óptico.

2.3 OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA

Os esfregaços fecais corados foram observados num microscópio óptico Olympus BX51, com uma objectiva de $\times 20$, sendo a presença de oocistos confirmada com as objectivas de $\times 40$ e de imersão. A determinação da dimensão média dos oocistos, encontrados nalgumas amostras, foi efectuada, sempre que possível, com base na observação de 20 oocistos por cada amostra, com uma ampliação de $\times 1000$, através do programa Olympus DP-Soft 3.2.

Por cada amostra de fezes foram observados dois esfregaços concentrados e um esfregaço directo. As amostras onde, no conjunto dos três esfregaços, se observaram dois ou mais oocistos, foram consideradas positivas. Nos casos em que apenas foi observado um oocisto, a presença de parasitas, na amostra, foi confirmada por reacção de PCR, aplicada ao gene SSU-rRNA, conforme descrito mais à frente (*vide* 4.1, pág. 85).

A carga parasitária das fezes foi estimada, mediante um estudo quantitativo, por determinação da média do número de oocistos observados nos esfregaços directos, em 20 campos microscópicos, seleccionados ao acaso (quadro X).

QUADRO X – Quantificação da carga parasitária das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp.

CARGA PARASITÁRIA	N.º OOCISTOS/CAMPO*
I	1 a 5
II	6 a 10
III	11 a 15
IV	>15

* Com a ampliação de 200 \times (ocular $\times 10$ e objectiva $\times 20$)

3. EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

O DNA genómico de todos os parasitas do género *Cryptosporidium*, identificados por diagnóstico parasitológico, foi isolado a partir dos oocistos presentes nas fezes. Este processo constituiu o ponto de partida para a realização da reacção de PCR e restantes técnicas de biologia molecular, que permitiram a caracterização dos organismos em estudo.

O método utilizado, para a extracção do DNA de todos os isolados, foi o Mini-BeadBeater/Sílica. Nos casos em que a amplificação, por PCR, do DNA isolado daquele modo não foi conseguida, procedeu-se à execução de um segundo método de extracção, o KOH/Qiagen. Este último método foi, também, utilizado em todos os isolados trabalhados pela autora na “Division of Parasitic Diseases”, CDC, Atlanta, EUA.

3.1 PREPARAÇÃO DOS OOCISTOS PARA EXTRACÇÃO DE DNA

Nas amostras com diagnóstico parasitológico positivo, os sedimentos, resultantes da primeira e segunda centrifugações do método de concentração de Ritchie modificado (*vide* 2.1, pág. 80), foram colocados num único tubo de centrífuga e submetidos a uma lavagem por ressuspensão em água desionizada e centrifugação a 4.100 g, durante dez minutos. O sedimento resultante, com os oocistos concentrados, foi armazenado a -20°C , aguardando a subsequente extracção de DNA.

Os isolados que se encontravam conservados em dicromato de potássio a 5%, foram sujeitos ao método de concentração de Ritchie modificado, já descrito em 2.1. A lavagem dos dois sedimentos, descrita no parágrafo anterior, foi repetida por duas vezes, para eliminação do dicromato de potássio, que é um composto inibidor da reacção de PCR.

3.2 MÉTODO MINI-BEADBEATER/SÍLICA

Esta técnica, adaptada de Boom *et al.* (1990) e de McLauchlin *et al.* (2000), consiste na lise mecânica dos oocistos, por agitação vigorosa com partículas de zircónio, seguida de um processo, que envolve a adsorção do DNA a partículas de sílica activada, a lavagem com um tampão e dois solventes orgânicos e, por fim, a eluição, em água desionizada estéril.

Num microtubo de 2 ml, foram colocados 300 µl de suspensão de oocistos concentrados, 900 µl de tampão de lise (tiocianato de guanidina 7 M, Tris-HCl 50 mM [pH 6,4], EDTA 25 mM pH 8,0, Triton X-100 1,5% v/v), 60 µl de álcool isoamílico e 0,3 g de partículas de zircónio com 0,5 mm de diâmetro (Biospec Products). Após forte agitação, num aparelho Mini-BeadBeater (Biospec Products), e centrifugação durante 15 segundos a 23.100 g, para sedimentação dos detritos fecais insolúveis e das partículas de zircónio, o sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 ml, ao qual haviam sido, previamente, adicionados 25 µl de uma solução aquosa de sílica activada (1%, pH 2,0). O sobrenadante e a sílica activada foram incubados, à temperatura ambiente, num agitador rotativo, a velocidade moderada e constante, durante 30 minutos. Em seguida, para sedimentar a sílica com o DNA adsorvido, foi efectuada uma centrifugação de 15 segundos, a 23.100 g e desprezado o sobrenadante resultante. Posteriormente, foram realizadas cinco lavagens, duas com tampão de lavagem (tiocianato de guanidina 7 M, Tris-HCl 50 mM [pH 6,4]), duas com etanol a 80% a -20°C e, por fim, uma com acetona. Cada lavagem consistiu na ressuspensão da sílica no tampão ou solvente apropriados, centrifugação a 23.100 g, durante 10 segundos, e rejeição do sobrenadante resultante. Após a lavagem com acetona, a sílica sedimentada foi incubada a 55°C, até completa evaporação daquele solvente. A eluição do DNA foi feita por ressuspensão da sílica em 50 µl de água desionizada estéril e incubação a 60°C, durante cinco minutos. Após uma centrifugação a 23.100 g, durante dois minutos, o sobrenadante, contendo o DNA genómico dos parasitas, foi transferido para um microtubo de 1,5 ml estéril e armazenado a -20°C.

3.3 MÉTODO KOH/QIAGEN

Este método baseia-se na lise inicial dos oocistos por choque álcali/ácido, seguida de extracção orgânica e posterior utilização do “kit” comercial “QIAamp® DNA Stool Mini Kit” (Qiagen).

Num microtubo de 1,5 ml foram centrifugados, a 23.100 g, durante sete minutos, 300 µl de suspensão de oocistos concentrados. Após rejeição do sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 133,2 µl de hidróxido de potássio (KOH) 1M e 37,2 µl de ditiotretitol (DTT) 1M e incubado a 65°C, durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 17,2 µl de ácido clorídrico (HCl) 25% e 320 µl de Tris-HCl 2M (pH 8.3), que foram vigorosamente

agitados. Depois, adicionaram-se 500 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e, após suave agitação manual por inversão, a suspensão resultante foi centrifugada a 3.700 g, durante cinco minutos. O sobrenadante foi recolhido para um microtubo de 2 ml, ao qual foi adicionado 1 ml de tampão ASL (Qiagen), seguindo-se incubação a 80°C, durante cinco minutos. Após a adição de um comprimido Inhibitex (Qiagen) e imediata agitação até à ressuspensão completa do comprimido, a mistura foi deixada em repouso durante um minuto. De seguida, foi efectuada uma centrifugação de três minutos, a 23.100 g. O sobrenadante resultante foi transferido para um microtubo de 2 ml limpo, ao qual foram adicionados 300 µl de tampão AL (Qiagen) e, após forte agitação, 800 µl de etanol absoluto. Depois de nova agitação, a solução obtida foi transferida para uma coluna QIAamp, colocada num tubo colector, em alíquotas máximas de 750 µl, e centrifugada a 23.100 g, durante um minuto. Este passo foi repetido, até toda a solução ter passado pela coluna. Seguidamente, a coluna foi colocada num tubo colector limpo, foram-lhe adicionados 500 µl de tampão AW1 (Qiagen) e foi feita nova centrifugação a 23.100 g, durante um minuto. A coluna foi, de novo, transferida para um tubo colector limpo, tendo-lhe sido adicionados 500 µl de tampão AW2 (Qiagen) e realizada nova centrifugação a 23.100 g, durante três minutos. Por fim, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 ml e, após adição de 50 µl de água desionizada estéril, foi a incubar a 70°C, durante cinco minutos. Terminada a incubação, realizou-se uma centrifugação a 23.100 g, durante um minuto, após o que a coluna foi removida e o microtubo, com o DNA, armazenado a -20°C.

4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

A caracterização molecular dos isolados, de origem humana e animal, detectados pelo diagnóstico parasitológico, foi realizada com o propósito de determinar a sua espécie ou genótipo. O DNA de todos os isolados em estudo foi sujeito a amplificação, por reacção de PCR, aplicada aos *loci* genéticos COWP, TRAP-C1, DHFR e SSU-rRNA. Os fragmentos amplificados foram, posteriormente, submetidos a hidrólise por endonucleases de restrição (RFLP) tendo, a análise dos perfis de restrição resultantes, permitido identificar a espécie de cada isolado. Para cada gene estudado, foram seleccionados dois isolados pertencentes a cada uma das espécies de *Cryptosporidium* identificadas, nos quais, para confirmação do resultado da análise de RFLP, se procedeu à sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR. Nos isolados detectados em gado bovino foi, ainda, determinada a sequência nucleotídica do fragmento do gene SSU-rRNA de todos os isolados pertencentes a animais de idade desconhecida ou superior a 15 dias, cujas PCR's dos genes COWP, DHFR e TRAP-C1 não foram bem sucedidas. No caso dos isolados dos animais do Jardim Zoológico não foi efectuada análise de RFLP, tendo a identificação do seu genótipo sido realizada por sequenciação do fragmento do gene SSU-rRNA amplificado por PCR.

4.1 AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÓMICO POR PCR

A amplificação do DNA dos parasitas foi realizada por reacção de PCR, aplicada aos genes COWP [Spano *et al.*, 1997b], TRAP-C1 [Spano *et al.*, 1998a, 1998b], DHFR [Gibbons *et al.*, 1998] e SSU-rRNA [Xiao *et al.*, 1999a, 2000a]. No caso dos dois primeiros genes, a amplificação foi feita através de reacções de PCR simples, enquanto que, para os dois últimos, se efectuaram reacções de PCR “nested”. No quadro XI encontram-se descritas as sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação de cada gene, bem como a dimensão dos fragmentos amplificados.

As reacções de PCR, efectuadas para os genes COWP, TRAP-C1 e DHFR, sofreram alguns ajustes, em relação ao descrito pelos autores referenciados, nomeadamente, ao nível da temperatura de ligação, dos tempos de ligação e de extensão, da concentração de cloreto de

magnésio ($MgCl_2$) e de oligonucleótidos iniciadores e/ou da concentração da enzima DNA polimerase.

QUADRO XI – Oligonucleótidos iniciadores utilizados nas reacções de PCR

GENE	OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES	SEQUÊNCIA	DIMENSÃO DO FRAGMENTO (pb)	REF ^a
COWP	Cry.15	5' – GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G – 3'	553	Spano <i>et al.</i> , 1997b
	Cry.9	5' – GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G – 3'		
TRAP-C1	Et.E	5' – GGA TGG GTA TCA GGT AAT AAG AA – 3'	506	Spano <i>et al.</i> , 1998a
	Et.W	5' – CAA TTC TCT CCC TTT ACT TC – 3'		
DHFR	1 ^a PCR – DHFR1	5' – GTG GGG ATT TAA CTT GAT TT – 3'	575	Gibbons <i>et al.</i> , 1998
	DHFR2	5' – GGT ATT TCT GGG AAA TAA GT – 3'		
	2 ^a PCR – DHFR3	5' – ATG AGT GAA AAG AAC GTT TC – 3'	408	
	DHFR4	5' – CAC CCT TGT TAA GTA TAT TC – 3'		
SSU-rRNA	1 ^a PCR – SSU1	5' – TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG – 3'	≈ 1325	Xiao <i>et al.</i> , 1999a, 2000a
	SSU2	5' – CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA – 3'		
	2 ^a PCR – SSU3	5' – GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG – 3'	826-864	
	SSU4	5' – AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A – 3'		

As reacções de amplificação dos genes COWP e TRAP-C1 foram efectuadas em volumes de 25 μ l, contendo, em ambos os casos, 2,5 μ l de 10 \times tampão de reacção (160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 2 mM de $MgCl_2$ (Bioline), 0,8 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 20 pmol de cada um dos respectivos oligonucleótidos iniciadores (MWG Biotech), 0,75 U de BiotaqTM DNA Polymerase (Bioline), entre 2,5 a 7 μ l de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final.

A amplificação do gene DHFR foi efectuada num volume de 50 μ l, contendo a mistura reaccional da primeira PCR, 5 μ l de 10 \times tampão de reacção (160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 2,5 mM de $MgCl_2$ (Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 20 pmol de cada oligonucleótido iniciador (MWG Biotech), 1,5 U de BiotaqTM DNA Polymerase (Bioline), entre 1 a 5 μ l de DNA genómico e água desionizada estéril, para completar o volume final. A segunda PCR foi realizada com 1 μ l do DNA amplificado na primeira reacção, sendo a mistura reaccional igual à primeira, com excepção da concentração de $MgCl_2$, que foi diminuída para 1,5 mM.

A amplificação do gene SSU-rRNA foi efectuada num volume de 50 µl, contendo, a mistura reaccional da primeira PCR, 5 µl de 10× tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 6 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 10 pmol de cada oligonucleótido iniciador (MWG Biotech), 1,5 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), entre 2,5 a 10 µl de DNA genómico e água desionizada estéril para perfazer o volume final. A segunda PCR foi realizada com 2 µl do DNA amplificado na primeira reacção, sendo a mistura reaccional igual à primeira, com excepção da concentração de MgCl₂, que foi diminuída para 3 mM.

Em cada reacção de PCR foi incluído um tubo com uma amostra de DNA de *Cryptosporidium* spp. em condições óptimas de qualidade e concentração, para funcionar como controlo positivo da mistura reaccional, e um controlo negativo, como indicador da inexistência de contaminação por DNA exógeno onde, no lugar do DNA, foi adicionada água desionizada estéril.

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador “T1 Thermocycler” (Biometra) tendo, em todas elas, o passo de desnaturação inicial sido de dez minutos a 95°C e o de extensão final de dez minutos a 72°C. No quadro XII estão descritas as restantes condições de amplificação para cada um dos *loci* estudados.

QUADRO XII – Condições de amplificação do DNA, para os quatro genes estudados

GENE	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO		N.º CICLOS
COWP	Desnaturação	95°C, 50 seg.	30
	Ligação	55°C, 30 seg	
	Extensão	72°C, 45 seg	
TRAP-C1	Desnaturação	95°C, 50 seg.	40
	Ligação	50°C, 30 seg	
	Extensão	72°C, 45 seg	
DHFR – 1ª PCR	Desnaturação	95°C, 45 seg.	30
	Ligação	50°C, 60 seg	
	Extensão	72°C, 3 min.	
DHFR – 2ª PCR	Desnaturação	95°C, 45 seg.	30
	Ligação	60°C, 60 seg	
	Extensão	72°C, 3 min.	
SSU-rRNA 1ª e 2ª PCR's	Desnaturação	95°C, 45 seg.	35
	Ligação	55°C, 45 seg	
	Extensão	72°C, 60 seg	

4.2 VISUALIZAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO

Os fragmentos de DNA amplificados, por PCR, foram submetidos a electroforese em gel de agarose SeaKem[®] LE (FMC BioProducts) a 1,5% em tampão TAE (Tris-Acetato 0,04 M; EDTA 0,001 M; pH 8,3), onde foi incorporado brometo de etídio, numa concentração final de 0,5 µg/ml. Para além dos produtos de PCR, foi, ainda, submetido a electroforese um marcador de pesos moleculares conhecidos, o “100 bp ladder” (Fermentas). Antes da aplicação no gel, cada produto de PCR foi preparado na proporção de 1 µl de tampão de aplicação (Fermentas), para 10 µl de DNA amplificado. No caso do marcador de pesos moleculares, a proporção foi de 1 µl de marcador, para 1 µl de tampão de aplicação (Fermentas) e 9 µl de água desionizada estéril. A migração foi efectuada a 60 volts (V), durante, aproximadamente, uma hora e 30 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta (UV), por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado no DNA, numa cabine “Eagle Eye[®] II” (Stratagene). A imagem do gel foi fotografada e processada pelo software “Still Video System” (Stratagene).

4.3 HIDRÓLISE DO DNA AMPLIFICADO POR ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO – RFLP

A determinação da espécie dos isolados de *Cryptosporidium* spp. foi realizada, para todos os genes estudados, por análise dos perfis de restrição do DNA amplificado, após a sua hidrólise com endonucleases de restrição.

Os produtos de amplificação dos genes COWP e TRAP-C1 foram hidrolisados com a endonuclease *RsaI*. Em ambos os casos, a reacção de hidrólise foi feita num volume de 20 µl, contendo 2 µl de tampão de restrição 0⁺ (Fermentas), 5 U de *RsaI* (Fermentas), 10-15 µl do DNA amplificado por PCR e água desionizada estéril, até completar o volume final. A incubação foi realizada a 37°C, durante duas horas.

O produto de amplificação do gene DHFR foi hidrolisado numa mistura reaccional de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão SuRE/Cut B (Boehringer Mannheim), 12,5 U da endonuclease *BpuA1* (Boehringer Mannheim), 10-15 µl de DNA amplificado e água desionizada estéril para perfazer o volume final. A incubação foi efectuada a 37°C, durante duas horas.

A hidrólise do produto de amplificação do gene SSU-rRNA foi efectuada por duas enzimas de restrição, a *SspI* e a *VspI*. Em ambos os casos, a mistura reaccional foi efectuada num volume de 25 µl, sendo a sua composição a seguinte: 2,5 µl de tampão G⁺ (Fermentas) e 15 U de *SspI* (Fermentas) ou 2,5 µl de tampão 0⁺ (Fermentas) e 15 U de *VspI* (Fermentas), 10-15 µl de DNA amplificado e água desionizada estéril para completar o volume final. A incubação foi efectuada a 37°C, durante uma hora.

Os produtos de hidrólise foram fraccionados por electroforese em gel de agarose a 1,8%, conforme descrito em 4.2, com excepção do volume de DNA hidrolisado aplicado, que foi de 15 µl.

4.4 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR

Os produtos de PCR contêm sais, oligonucleótidos iniciadores e nucleótidos não incorporados, que interferem com a reacção de sequenciação, sendo necessário, antes da sua realização, proceder à remoção dos referidos compostos. Assim, os produtos de PCR a sequenciar foram purificados, através do “kit” comercial “JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit” (Genomed). No caso das PCR “nested”, foram purificados os produtos da segunda reacção.

De acordo com as instruções do fabricante, a 40 µl de produto de PCR foram adicionados 200 µl de solução H1 (Genomed) que, após forte agitação, foram transferidos para uma “JETQUICK spin column” (Genomed), já colocada num tubo colector. Depois de uma centrifugação a 23.100 g, durante um minuto, o eluído foi rejeitado e a coluna colocada num novo tubo colector. Em seguida, foram-lhe adicionados 250 µl de solução de lavagem H2 (Genomed), anteriormente reconstituída, e foi realizada nova centrifugação a 23.100 g, durante um minuto. Após rejeição do eluído, foi repetida a centrifugação anterior. Seguidamente, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 ml, tendo-lhe sido adicionados 50 µl de água desionizada estéril, previamente aquecida a 60°C. Por fim, a coluna foi a incubar a 60°C, durante cinco minutos e, depois de uma centrifugação a 23.100 g, durante dois minutos, a coluna foi eliminada e o produto de PCR purificado foi armazenado a -20°C.

Os produtos de PCR purificados foram enviados para o Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos, do Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT), onde foram

submetidos a reacção de sequenciação, resolvidos num sequenciador automático “CEQ™ 2000XL” (Beckman Coulter), com uma tecnologia de electroforese capilar em gel de poliacrilamida, e analisados pelo software “CEQ™ 8000 Genetic Analysis System” (Beckman Coulter). As sequências de DNA foram determinadas em ambos os sentidos, tendo sido obtida uma sequência consenso, por comparação das sequências directa e reversa.

4.5 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

As sequências nucleotídicas consenso obtidas para os genes COWP, TRAP-C1, DHFR e SSU-rRNA foram analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para verificar a sua semelhança com as sequências de *Cryptosporidium* spp. depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) e confirmar a identificação da espécie dos isolados obtida por RFLP.

As sequências nucleotídicas do gene SSU-rRNA, obtidas para os isolados identificados nos animais do Jardim Zoológico, foram alinhadas com as de várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), para o mesmo gene, com recurso ao programa ClustalX [Thompson *et al.*, 1997]. Através do programa TreeconW [van de Peer e de Wachter, 1994] e do método “neighbour-joining”, foi construída uma árvore filogenética, tendo por base distâncias genéticas, calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. Como grupo externo (“outgroup”), foi utilizada uma sequência do gene SSU-rRNA de *Eimeria tenella* (GenBank n.º AF026388). Os valores de confiança, para os ramos individuais da árvore, foram determinados por análise de “bootstrap” com 1.000 réplicas.

5. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR INTRA-ESPECÍFICA DE *C. PARVUM* E *C. HOMINIS*

A avaliação da variabilidade intra-específica e a determinação dos alelos e subtipos de todos os isolados humanos e animais pertencentes às espécies *C. hominis* e *C. parvum* foram realizadas através de duas abordagens distintas. A primeira envolveu a caracterização de um *locus* com um microssatélite (STR), através da técnica de análise de fragmentos por metodologia fluorescente, e a segunda a amplificação e sequenciação de um fragmento do gene GP60 e subsequente análise filogenética.

5.1 ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES

A caracterização intra-específica de *C. parvum* e *C. hominis*, através da análise de microssatélites, foi efectuada por amplificação do *locus* ML2 (GenBank n.º AF344880), que apresenta uma unidade de repetição (AG)_n, seguida de análise dos fragmentos amplificados por metodologia fluorescente, para identificação dos alelos exibidos pelos isolados.

A caracterização do *locus* ML2 foi realizada, apenas, em 32 isolados humanos (11 *C. hominis* e 21 *C. parvum*) e em 46 isolados bovinos, pertencentes à espécie *C. parvum*.

À reacção de PCR, inicialmente, descrita por Cacciò *et al.* (2001), foram feitos pequenos ajustes na concentração dos oligonucleótidos iniciadores, na temperatura de ligação e na adição de dimetilsulfóxido (DMSO). Os oligonucleótidos iniciadores utilizados apresentavam a seguinte sequência [Cacciò *et al.*, 2001]:

M15: 5' – CAA TGT AAG TTT ACT TAT GAT TAT – 3'
M16-D2: 5' – (D2)CGA CTA TAA AGA TGA GAG AAG – 3'

O oligonucleótido iniciador M16 foi sintetizado pela “Proligo Primers & Probes”, com o fluorocromo D2 incorporado na extremidade 5'; este fluorocromo é específico para utilização em equipamentos Beckman Coulter. O oligonucleótido iniciador M15 e, também, o M16 não marcado (utilizado na reacção de PCR que precedeu a sequenciação de alguns fragmentos) foram sintetizados pela MWG Biotech. Os fragmentos amplificados apresentavam dimensões entre 176 e 239 pb, dependendo do número de repetições da unidade AG presentes.

A reacção de amplificação foi efectuada num volume de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10× tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 1,5 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 30 pmol de cada oligonucleótido iniciador (M15 e M16-D2), 0,75 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), entre 1 a 7,5% de DMSO, entre 2,5 a 5 µl de DNA genómico e água desionizada, estéril para completar o volume final. A amplificação foi realizada num termociclador “T1 Thermocycler” (Biometra). A uma desnaturação inicial de dez minutos a 95°C, seguiram-se 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C e um minuto a 72°C e uma extensão final de dez minutos a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram visualizados, por electroforese em gel de agarose, a 1,5%, conforme descrito em 4.2.

Os produtos de PCR marcados com o fluorocromo D2, foram enviados para o Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos, do ICAT, para determinação da sua dimensão, através da análise de fragmentos por metodologia fluorescente. Cada amostra foi sujeita a electroforese capilar em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, juntamente com um padrão interno de pesos moleculares definidos, o “CEQ™ DNA size standard – 400” (Beckman Coulter), num sequenciador automático “CEQ™ 2000XL” (Beckman Coulter). Os sinais de fluorescência, emitidos pelos fragmentos marcados e pelo padrão interno, foram analisados pelo software “CEQ™ 8000 Genetic Analysis System” (Beckman Coulter), que calculou a dimensão dos fragmentos amplificados, por PCR, permitindo, assim, a identificação dos alelos exibidos pelos parasitas em estudo.

Por cada alelo identificado, foram seleccionados dois isolados, cujo produto de PCR foi, posteriormente, sequenciado, com o propósito de confirmar a dimensão dos alelos obtida pela análise de fragmentos. Na PCR de confirmação foi utilizado um oligonucleótido iniciador M16, sem a marcação com o fluorocromo D2. A purificação do DNA amplificado e a sequenciação foram efectuadas, conforme descrito em 4.4.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE GP60

A caracterização genética do *locus* GP60 foi realizada através da sua amplificação por PCR, seguida de sequenciação, alinhamento das sequências obtidas e construção de uma árvore filogenética, que permitiu visualizar a distribuição dos diferentes subtipos do gene GP60, nos isolados de *C. parvum* e *C. hominis* de humanos e de outros animais. Esta componente do presente trabalho foi parcialmente realizada, pela autora, na “Division of Parasitic Diseases”, CDC, Atlanta, EUA, em particular a amplificação e sequenciação do gene GP60 num grupo de 61 isolados de humanos e de outros animais e toda a análise bioinformática das sequências obtidas. Os restantes isolados foram caracterizados na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e outras Protozooses, no IHMT.

5.2.1 AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÓMICO POR PCR

A amplificação de um fragmento do gene GP60 foi efectuada através de dois procedimentos de PCR “nested” a que chamámos GP60₁ e GP60₂. O primeiro – GP60₁ – foi aplicado a todos os isolados em estudo e o segundo – GP60₂ –, utilizando novos oligonucleótidos iniciadores reversos, apenas nos isolados em que a amplificação pelo primeiro procedimento não foi conseguida. No quadro XIII encontram-se detalhadas as sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados em ambos os casos. A dimensão dos fragmentos amplificados é bastante variável, uma vez que a região genómica alvo é muito polimórfica, devido à presença dum STR com uma unidade de repetição (TCA)_n.

QUADRO XIII – Oligonucleótidos iniciadores utilizados nas reacções de amplificação do gene GP60

PROCEDIMENTO	OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES	SEQUÊNCIA	DIMENSÃO DO FRAGMENTO (pb)	REF ^a
GP60 ₁	1 ^a PCR – AL3531	5' – ATA GTC TCC GCT GTA TTC – 3'	≈ 900	Peng <i>et al.</i> , 2001
	AL3535	5' – GGA AGG AAC GAT GTA TCT – 3'		
	2 ^a PCR – AL3532	5' – TCC GCT GTA TTC TCA GCC – 3'	≈ 850	
	AL3534	5' – GCA GAG GAA CCA GCA TC – 3'		
GP60 ₂	1 ^a PCR – GP60 F1	5' – ATA GTC TCC GCT GTA TTC – 3'	≈ 470	Zhou <i>et al.</i> , 2003
	GP60 R1	5' – GAG ATA TAT CTT GGT GCG – 3'		
	2 ^a PCR – GP60 F2	5' – TCC GCT GTA TTC TCA GCC – 3'	≈ 360	
	GP60 R2	5' – CGA ACC ACA TTA CAA ATG AAG T – 3'		

O procedimento de amplificação GP60₁ foi efectuado num volume de 50 µl, contendo a mistura reaccional da primeira PCR, 5 µl de 10× tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 3 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 10 pmol de cada oligonucleótido iniciador (MWG Biotech), 1,5 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), entre 5 a 10 µl de DNA genómico e água desionizada estéril para perfazer o volume final. A segunda PCR foi realizada com 1,5 µl do DNA amplificado na primeira reacção, sendo a mistura reaccional igual à primeira.

O procedimento de amplificação GP60₂ foi efectuado num volume de 50 µl, contendo a mistura reaccional da primeira PCR, 5 µl de 10× tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 1,5 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 10 pmol de cada oligonucleótido iniciador (MWG Biotech), 0,02 mg de albumina do soro bovino ou BSA (sigla anglo-saxónica para “bovine serum albumin”) (Sigma-Aldrich), 1,5 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), entre 5 a 10 µl de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. A segunda PCR foi realizada com 3 µl do DNA amplificado na primeira reacção, sendo a mistura reaccional igual à primeira, com excepção da BSA, que foi excluída.

Em cada reacção de PCR foi incluído um tubo com uma amostra de DNA, em condições óptimas de qualidade e concentração, para funcionar como controlo positivo da mistura reaccional, e um controlo negativo, como indicador da inexistência de contaminação, por DNA exógeno, onde, no lugar do DNA, foi adicionada água desionizada estéril.

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador “T1 Thermocycler” (Biometra), tendo, em todas, o passo de desnaturação inicial sido de dez minutos a 95°C e o de extensão final de dez minutos a 72°C. No quadro XIV estão descritas as restantes condições de amplificação dos fragmentos do gene GP60.

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5%, conforme descrito em 4.2.

QUADRO XIV – Condições de amplificação do DNA, para o gene GP60

PROCEDIMENTO	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO		N.º CICLOS
GP60 ₁ 1ª PCR/2ª PCR	Desnaturação	95°C, 45 seg.	35
	Ligação	50°C, 45 seg	
	Extensão	72°C, 60 seg	
GP60 ₂ – 1ª PCR	Desnaturação	95°C, 45 seg.	35
	Ligação	47°C, 45 seg	
	Extensão	72°C, 60 seg.	
GP60 ₂ – 2ª PCR	Desnaturação	95°C, 45 seg.	35
	Ligação	50°C, 45 seg	
	Extensão	72°C, 60 seg	

O grupo de amostras, caracterizadas no CDC, compreendeu 20 isolados de *C. parvum* e de *C. hominis* de origem humana, 32 de origem bovina e nove de ruminantes silváticos. A amplificação, por PCR, do gene GP60, foi efectuada segundo o procedimento GP60₁, nas condições já descritas. A reacção de amplificação foi efectuada num termociclador “GeneAmp PCR System 9700” (Perkin Elmer) [Alves *et al.*, 2003b].

5.2.2 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR

O procedimento adoptado com o propósito de sequenciar os fragmentos do gene GP60, amplificados por PCR, foi distinto para as amostras estudadas no CDC e no IHMT.

O trabalho desenvolvido no CDC foi realizado conforme a descrição que se segue.

Os fragmentos do gene GP60 amplificados foram purificados através do “Microcon-PCR Centrifugal Filter Devices” (Amicon, Millipore), conforme as instruções do fabricante: a um filtro (Amicon, Millipore) colocado num microtubo de 1,5 ml (Amicon, Millipore), foram adicionados 460 µl de água desionizada estéril e o produto de PCR a purificar. Depois de fechado, o tubo com o filtro foi a centrifugar a 1.000 g, durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionados ao filtro 20 µl de água desionizada estéril, pré-aquecida a 70°C. Após um minuto de repouso, à temperatura ambiente, o filtro foi invertido, colocado num novo microtubo e centrifugado a 1.000 g, durante dois minutos. Por fim, o filtro foi eliminado e o tubo com o produto de PCR purificado armazenado a –20°C.

Para cada fragmento do gene GP60, amplificado e purificado, foram realizadas duas reacções de sequenciação, uma no sentido directo e outra no sentido reverso. Em cada uma

destas reacções foi utilizado, apenas, um dos oligonucleótidos iniciadores (AL3532 ou AL3534), resultando na amplificação de apenas uma das cadeias do DNA alvo. A reacção de sequenciação foi preparada, segundo o método “ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems). Em cada mistura reaccional foram adicionados 4 µl de “Terminator Ready Reaction Mix”, composta por quatro didesoxirribonucleótidos terminadores marcados com quatro fluorocromos diferentes (“A-Dye Terminator”, “C-Dye Terminator”, “G-Dye Terminator” e “T-Dye Terminator”), quatro desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dITP e dUTP), AmpliTaq DNA Polymerase FS, MgCl₂, e Tris-HCl buffer, pH 9.0 (Applied Biosystems), 4 µl de 5× tampão de sequenciação (Applied Biosystems), 1,5 µl de produto de PCR purificado, 2 µl de um dos oligonucleótidos iniciadores e água desionizada estéril para completar um volume final de 20 µl. As reacções de sequenciação foram realizadas num termociclador “GeneAmp PCR System 9700” (Perkin Elmer), durante 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e quatro minutos a 60°C.

Os produtos de sequenciação foram, posteriormente, purificados de sais e dos oligonucleótidos iniciadores, didesoxirribonucleótidos terminadores e desoxirribonucleótidos não incorporados que interferem com a electroforese capilar. Para tal, foi utilizado o “kit” comercial “Centri-Sep Columns” (Princeton Separations), de acordo com a descrição que se segue: para hidratar a resina da coluna, foram-lhe adicionados 800 µl de água desionizada estéril e, após forte agitação, esta foi deixada a repousar durante uma hora, à temperatura ambiente. Depois, retiraram-se as tampas superior e inferior da coluna que foi, em seguida, colocada num tubo de recolha a eluir, durante 15 minutos. Após eliminação do eluído, foi efectuada uma centrifugação de três minutos a 750 g e a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 ml. O produto da sequenciação foi adicionado à coluna, tendo, em seguida, sido realizada nova centrifugação a 750 g, durante três minutos. Por fim, a coluna foi eliminada e o eluído concentrado num “Vacufuge Concentrator 5301” (Eppendorf), até completa evaporação do solvente.

Os produtos de sequenciação purificados e concentrados foram ressuspensos em 15 µl de formamida “ABI PRISM[®] Hi-Di[™]” (Applied Biosystems). Em seguida, foram colocados numa microplaca “MicroAmp[®] Optical 96-well Reaction Plate” (Applied Biosystems), tapados com uma tampa “96-Well Septa” (Applied Biosystems), submetidos a 94°C, durante três minutos, num termociclador “GeneAmp PCR System 9700” (Perkin Elmer) e, de imediato, congelados a -20°C.

A resolução dos produtos de sequenciação foi realizada num sequenciador automático “ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems), por electroforese capilar, numa matriz de polímero POP4[™] (Applied Biosystems). A recolha e o processamento dos resultados da electroforese foi efectuada pelos programas “ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer Data Collection Software” e “DNA Sequencing Analysis Software” (Applied Biosystems). Os cromatogramas, com as sequências directa e reversa, de cada fragmento sequenciado, foram comparados, através do programa “AutoAssembler 2.0” (Applied Biosystems) e, após a correcção manual de alguns erros nas sequências directa e/ou reversa, foi obtida uma sequência consenso, para cada fragmento do gene GP60 amplificado.

Os fragmentos do gene GP60, amplificados na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, foram purificados, através do “JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit” (Genomed), conforme descrito em 4.4, e enviados para o Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos, do ICAT, onde foram sequenciados, num sequenciador automático “CEQ[™] 2000XL” (Beckman Coulter) e analisados pelo software “CEQ[™] 8000 Genetic Analysis System” (Beckman Coulter). As sequências de DNA foram determinadas em ambos os sentidos, tendo sido obtida uma sequência consenso, por comparação das sequências directa e reversa.

5.2.3 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

As sequências nucleotídicas consenso do fragmento do gene GP60, de todos os isolados de *C. hominis* e de *C. parvum* estudados e de outras disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), para o mesmo gene e os mesmos parasitas, foram alinhadas através do programa ClustalX [Thompson *et al.*, 1997]. Ao alinhamento resultante, foram efectuados alguns acertos manuais, de forma a eliminar algumas ambiguidades. A partir deste alinhamento final, foi construída uma árvore filogenética, através do programa TreeconW [van de Peer e de Wachter, 1994] e do método “neighbour-joining”, tendo por base distâncias genéticas calculadas, pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. Os valores de confiança, para os ramos individuais da árvore, foram determinados, por análise de “bootstrap” com 1.000 réplicas.

Capítulo III



INFECÇÃO POR *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM DOENTES INFECTADOS POR VIH

1. INTRODUÇÃO

O sintoma gastroenterológico mais comum entre os indivíduos infectados por VIH é a diarreia. Nestes doentes, a criptosporidiose destaca-se como uma das infecções oportunistas mais vezes associada a esta sintomatologia [Call *et al.*, 2000].

No primeiro trabalho realizado em Portugal sobre a criptosporidiose em doentes infectados por VIH, da autoria de Antunes *et al.* (1990), a percentagem encontrada para esta parasitose foi de 13,4% (15/112). Num outro estudo, efectuado por Tomás *et al.* (1992), envolvendo 268 doentes infectados por VIH, no período entre 1988 e 1991, foi documentada a percentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp. de 10% (27/268). Em 1998, Matos *et al.* publicaram um trabalho sobre a prevalência da criptosporidiose em doentes com infecção por VIH e diarreia, no Hospital de Santa Maria, em Lisboa. Este trabalho abrangeu um período de nove anos e meio, compreendido entre o início de 1988 e Maio de 1997, tendo a prevalência de criptosporidiose encontrada sido de 8% (36/465). Já no período pós-HAART, entre 1999 e 2001, o mesmo grupo de trabalho encontrou, numa população semelhante, uma percentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp. de 9,7% (16/195) [Matos *et al.*, 2002]. Este último trabalho não confirmou a regressão do número de casos de criptosporidiose nos doentes com infecção por VIH, na era pós-HAART, observada e descrita por diversos autores [Ives *et al.*, 2001; Maggi *et al.*, 2005; Pozio e Morales 2005].

No presente trabalho foi determinada a percentagem da criptosporidiose em doentes com infecção por VIH e sintomatologia gastrintestinal, num período de cerca de três anos e meio, com início em Junho de 2001 e fim em Janeiro de 2005.

2. RESULTADOS

O diagnóstico parasitológico das amostras fecais dos 217 doentes com infecção por VIH revelou que 18 se encontravam parasitados com organismos do género *Cryptosporidium* spp., o que corresponde a uma percentagem da criptosporidiose nesta população de 8,3%. À excepção de um doente, todos os outros apresentavam diarreia (duas ou mais dejecções aquosas diárias), por altura do diagnóstico de criptosporidiose (*vide* capítulo V, quadro XIX).

Entre os 18 doentes parasitados, 16 eram adultos com idades compreendidas entre os 24 e os 58 anos e, os dois restantes, eram crianças de sete e 11 anos, ambas do sexo masculino, assim como 13 (81,25%) dos adultos. Apenas três dos adultos eram do sexo feminino (18,75%) (*vide* capítulo V, quadro XIX).

Relativamente à categoria de transmissão de VIH, nove (56,25%) dos adultos eram heterossexuais, seis (37,5%) eram toxicod dependentes e um (6,25%) era homossexual. As crianças adquiriram a infecção por VIH por transmissão vertical (*vide* capítulo V, quadro XIX).

Nos adultos, os valores de linfócitos TCD4⁺ variaram entre 0 e 125 céls/mm³, tendo, em 75% dos casos, sido inferiores a 50 céls/mm³ (quadro XV). A criança de sete anos apresentava imunossupressão moderada, com percentagem de linfócitos TCD4⁺ de 19% (213 céls/mm³), enquanto que a de 11 anos exibia imunossupressão grave, com percentagem de linfócitos TCD4⁺ inferior a 15% (39 céls/mm³). Onze dos 18 doentes com criptosporidiose não se encontravam a fazer terapêutica anti-retroviral, apresentando, todos eles, valores de linfócitos TCD4⁺ inferiores a 42 céls/mm³.

QUADRO XV – Valores de linfócitos TCD4⁺ apresentados pelos doentes adultos com criptosporidiose

LINFÓCITOS TCD4 ⁺ (céls/mm ³)	N.º DOENTES
≤ 10	5
11 – 50	7
51 – 125	3
Desconhecido	1

A carga parasitária, presente nas fezes dos doentes com criptosporidiose, foi de nível I, nível II e nível IV (*vide* Material e Métodos, quadro X) em 27,8% (5/18) dos casos e de nível III nos restantes 16,6% (3/18) (*vide* capítulo V, quadro XIX). Dois dos cinco doentes com carga parasitária de nível I apresentavam fezes de consistência pastosa. Não foi observada qualquer correlação entre a quantidade de oocistos excretados e os valores de linfócitos TCD4⁺.

Dos 18 casos de infecção por parasitas do género *Cryptosporidium*, um foi encontrado em associação com *Giardia lamblia*, seis com Microsporídia e um com *Giardia lamblia* e Microsporídia (*vide* capítulo V, quadro XIX).

Os oocistos identificados, no diagnóstico parasitológico, apresentavam forma esférica a ovalada e dimensão média de $4,68 \times 4,28 \mu\text{m}$. Na figura 8 podem observar-se oocistos de *Cryptosporidium* spp., num esfregaço fecal, corado pelo método de Ziehl-Neelsen modificado.

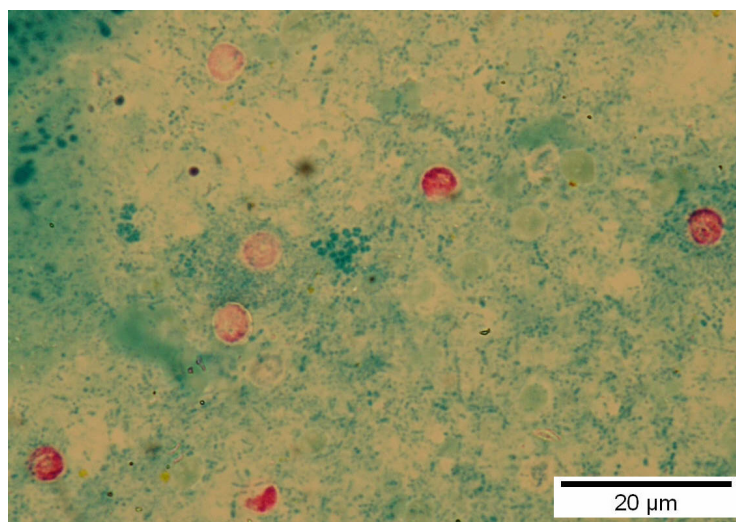


FIGURA 8 – Fotografia de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em esfregaço fecal, corado pelo Ziehl-Neelsen modificado ($\times 1000$). Original da autora

3. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi encontrada uma percentagem de criptosporidiose, em doentes com infecção por VIH e sintomatologia gastrintestinal, de 8,3%. Este valor revela diminuição em relação aos 9,7% (16/165) encontrados por Matos *et al.* (2002), na era pós-HAART, entre 1999 e 2001. Contudo, apesar desta diminuição, a percentagem encontrada é semelhante aos 8% (36/465) descritos no Hospital de Santa Maria, durante o período pré-HAART de 1988 a 1997 [Matos *et al.*, 1998]. Em trabalhos publicados recentemente, em doentes com infecção por VIH e diarreia, durante a era pós-HAART, foram documentadas prevalências de 20,6% (35/170), em Cuba, durante o ano de 1999 [Paz *et al.*, 2003], de 19,7% (29/147), em Lima, no Peru, entre 1998 e 2000 [Cárcamo *et al.*, 2005] e de 12,8% (20/156), em Nonthaburi, na Tailândia, em 2001 [Saksirisampant *et al.*, 2002]. Na cidade de Bogotá, na Colômbia, a prevalência de criptosporidiose, em doentes com infecção por VIH e sintomatologia

gastrintestinal, foi de 10,4% (12/115) [Flórez *et al.*, 2003]. No Brasil, nas cidades do Rio de Janeiro e de Uberlândia, os valores encontrados, de co-infecção *Cryptosporidium* spp./VIH, foram, respectivamente, de 9,3% (7/75), no período 1998-1999 [Ribeiro *et al.* 2004] e de 4% (4/100), entre 2001 e 2002 [Silva *et al.*, 2005]. Para além do facto de as populações estudadas nem sempre serem comparáveis, esta diversidade de valores pode ser explicada, entre outros factores, pelas diferentes condições económicas, culturais e higio-sanitárias existentes nas diversas cidades, pelas diferentes taxas de implementação da HAART e/ou pela utilização de diferentes métodos de diagnóstico.

A comparação dos resultados obtidos, no presente trabalho, com os descritos por Matos *et al.* (2002) mostram que, a partir de 2001, se verificou diminuição do número de casos de criptosporidiose, observados na população com infecção por VIH e sintomatologia gastroenterológica. Esta diminuição pode encontrar justificação no decréscimo do número de casos de SIDA, diagnosticados em Portugal desde 2000, em consequência do efeito da HAART no atraso da progressão da infecção por VIH para SIDA [Antunes e Doroana, 2003; Centro de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis, 2005]. Desde a introdução da terapêutica HAART, em 1996, que diversos autores têm descrito, nos países industrializados, diminuição acentuada da ocorrência da criptosporidiose, em doentes infectados por VIH. Num estudo que envolveu seropositivos para VIH, da Austrália e de dez países europeus (Dinamarca, França, Alemanha, Grécia, Itália, Noruega, Espanha, Suíça, Holanda e Reino Unido), Babiker *et al.* (2005) compararam a taxa de ocorrência da criptosporidiose enquanto doença definidora de SIDA nos períodos 1994-1996 e 1997-2001, tendo os valores encontrados sido de 3,1% e 0,2%, respectivamente. Numa investigação efectuada num hospital em Londres foi observado, após introdução da HAART, decréscimo da incidência da criptosporidiose, em indivíduos com infecção por VIH, que, tendo sido de 1,1% no período de 1988 a 1995, passou para 0,3%, entre 1996 e 1998 [Miao *et al.*, 2000]. Num hospital associado à Universidade do Alabama, nos EUA, Call *et al.* (2000) observaram diminuição da incidência da criptosporidiose, como causa de diarreia em doentes com SIDA, de 2%, na era pré-HAART, para 0,3%, na era pós-HAART, em consequência da melhoria da função imunológica dos doentes, por acção da terapêutica anti-retroviral potente.

O facto de 61% (11/18) dos doentes com criptosporidiose não estarem sob a acção da terapêutica anti-retroviral, pode justificar os valores baixos de linfócitos TCD4⁺. Com excepção da criança de sete anos, que apresentava imunossupressão moderada, os restantes

doentes, com valores de linfócitos TCD4⁺ conhecidos, apresentavam valores inferiores a 125 céls/mm³ e 86,7% (13/15), destes, exibiam valores iguais ou inferiores a 50 céls/mm³. A relação entre a diarreia por *Cryptosporidium* spp. e os valores de linfócitos TCD4⁺ tem sido documentada por diversos autores [Blanshard *et al.*, 1992; Flanigan *et al.*, 1992]. Num estudo efectuado num hospital de Londres, entre 2000 e 2001, a criptosporidiose foi considerada a principal causa de diarreia em doentes com SIDA, com contagens de linfócitos TCD4⁺ inferiores a 200 céls/mm³, tendo sido diagnosticada em 12% destes doentes. Naqueles com contagens entre 200-350 céls/mm³ e superiores a 350 céls/mm³, a percentagem de infectados por *Cryptosporidium* spp. foi de 2,6% e 1,4%, respectivamente [Datta *et al.*, 2003]. Noutro estudo, na cidade de Uberlândia, no Brasil, todos os doentes com infecção por VIH e criptosporidiose apresentavam valores de linfócitos TCD4⁺ entre 8 e 49 céls/mm³. Nenhum destes doentes estava sob terapêutica anti-retroviral [Silva *et al.*, 2005].

No trabalho realizado por Matos *et al.* (1998), a categoria de transmissão de VIH mais representada, entre os doentes com infecção por *Cryptosporidium* spp., foi a dos heterossexuais (36%), seguida da dos homossexuais (33%) e da dos toxicodependentes (6%). No presente trabalho, observou-se um aumento do número dos casos de criptosporidiose nas categorias dos heterossexuais (56,25%) e dos toxicodependentes (37,5%) e um decréscimo na categoria dos homossexuais (6,25%). Estes valores acompanham o padrão epidemiológico verificado, anualmente, desde 2000, em que se tem registado um aumento do número de casos de SIDA, resultantes da transmissão heterossexual de VIH e diminuição naqueles de transmissão homossexual. Para os períodos 1983-1999 e 2000-2004, a categoria da transmissão heterossexual, totalizou, respectivamente, 26,9% e 40,9% dos casos de SIDA em Portugal, enquanto que na categoria da transmissão homossexual, os casos de SIDA constituíam, respectivamente, 17,3% e 7,3% dos casos totais de SIDA [Centro de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis, 2005].

Capítulo IV



INFECÇÃO POR *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM ANIMAIS DE COMPANHIA E SILVÁTICOS

1. INTRODUÇÃO

A criptosporidiose animal tem a sua maior expressão nos animais domésticos de importância económica, particularmente bovinos, ovinos e caprinos. Todavia, alguns autores têm chamado a atenção para o potencial zoonótico dos parasitas excretados, não só pelos animais de companhia, que se encontram em contacto estreito com os seus donos, mas, também, pelos animais silváticos, que, muitas vezes, partilham o habitat com o Homem e com os animais domésticos.

Os animais de companhia, principalmente os cães e os gatos, são, na sociedade actual, presença frequente em muitos lares, contribuindo para o bem-estar físico, emocional e social dos seus donos. Contudo, nos últimos anos, tem aumentado a preocupação com o risco que constitui, para a saúde humana, a presença destes animais no ambiente doméstico. Esta preocupação assenta no facto de alguns dos agentes causadores de doença nos cães e nos gatos poderem ser, também, responsáveis por infecções no Homem, sobretudo em populações mais susceptíveis, como as crianças e os imunodeficientes. Os parasitas do género *Cryptosporidium* constituem um dos vários agentes zoonóticos capazes de provocar doença, tanto em animais de companhia, como no Homem. De facto, encontram-se descritos, por diversos autores, casos de infecção por *C. felis* e *C. canis* em infectados por VIH e em crianças [Pieniazek *et al.*, 1999; Pedraza-Díaz *et al.*, 2001a; Xiao *et al.*, 2001a; Alves *et al.*, 2003b; Matos *et al.*, 2004]. No entanto, até à data, não se encontra documentado nenhum caso de transmissão de *C. felis* ou *C. canis* ao Homem em consequência do contacto directo com estes animais. Assim, o papel destes animais, como reservatórios da infecção para o Homem, permanece, ainda, desconhecido.

Os animais silváticos são, também, susceptíveis à infecção por parasitas do género *Cryptosporidium*, embora, na maioria dos casos, esta seja assintomática, particularmente nos animais adultos. A espécie *C. parvum*, uma das principais responsáveis pela criptosporidiose no Homem e em gado doméstico, tem sido encontrada, entre outros, em artiodáctilos, carnívoros e pequenos mamíferos (roedores e insectívoros) de vida livre. Nestes últimos foram, ainda, descritas infecções devidas a *C. muris* [Chalmers *et al.*, 1997; Deng e Cliver, 1999; Sturdee *et al.*, 1999; Dall'Olio e Franco, 2004]. Alguns autores têm sugerido uma possível implicação dos animais silváticos de vida livre na dispersão de oocistos no ambiente, na contaminação

dos recursos hídricos e, conseqüentemente, no aparecimento de alguns casos esporádicos de criptosporidiose humana [Chalmers *et al.*, 1997; Quy *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2000; Dall’Olio e Franco, 2004].

A infecção por parasitas do género *Cryptosporidium* tem, igualmente, sido descrita em animais silváticos, em cativeiro, nomeadamente em mamíferos, répteis e aves [Lindsay *et al.*, 1991; Majewska *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2000; Graczyk e Cranfield, 2000]. No período compreendido entre Setembro de 1998 e Agosto de 1999, Delgado (2000), estudou 388 amostras fecais, pertencentes a animais de 34 espécies de ruminantes artiodáctilos, do Jardim Zoológico de Lisboa, tendo, em 2,1% (8/388), observado oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Cinco das oito amostras fecais, com oocistos deste parasita, pertenciam a animais entre os dois e os 30 dias de vida. Tendo por base este trabalho, e decorridos dois anos e meio sobre o mesmo, decidimos investigar a situação, alargando o grupo de animais estudados, não só a outros mamíferos, como, também, a répteis e a aves.

Em Portugal, a escassez de estudos sobre este tema justifica a realização do presente trabalho, em que foi investigada a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp., em animais de companhia e silváticos.

2. RESULTADOS

2.1 ANIMAIS DE COMPANHIA

Entre os 109 gatos estudados, apenas em dois foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp., o que corresponde à percentagem de infecção de 1,8%. Ambos os animais haviam sido recolhidos da rua, apresentavam diarreia e eram jovens, tendo um três e, o outro, seis meses de vida. Este último animal apresentava, ainda, infecção respiratória por Calicivírus. A carga parasitária, observada nas fezes dos dois gatos, foi de nível I. Os oocistos, observados nos esfregaços fecais, apresentavam forma esférica a ovalada e dimensão média de $4,15 \times 3,78 \mu\text{m}$.

Não foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em nenhuma das amostras fecais recolhidas dos 157 cães que foram objecto do presente estudo.

2.2 ANIMAIS SILVÁTICOS DE VIDA LIVRE

O diagnóstico parasitológico da criptosporidiose foi negativo para todas as amostras fecais dos 147 animais silváticos de vida livre estudados: 13 raposas, 52 musaranhos de dentes brancos (*Crocidura russula*), 80 ratinhos ruivos (*Mus spretus*) e dois ratinhos do campo (*Apodemus sylvaticus*).

2.3 ANIMAIS SILVÁTICOS EM CATIVEIRO

Entre as 217 amostras fecais de mamíferos do Jardim Zoológico de Lisboa, apenas em duas, pertencentes a duas espécies de Bovídeos – bisonte americano (*Bison bison bison*) e gnu de cauda branca (*Connochaetes gnou*) –, foram observados oocistos de *Cryptosporidium* spp., o que corresponde a uma percentagem de amostras positivas de 0,9% (2/217). Oitenta e sete, das 217 amostras fecais dos mamíferos, pertenciam a ruminantes artiodáctilos; assim, se forem consideradas, somente, as amostras destes animais, a percentagem de positividade sobe para 2,3% (2/87). Ambas as amostras fecais pertenciam a animais adultos, sem sintomatologia gastrintestinal e apresentavam carga parasitária de nível I. Durante o período abrangido por esta investigação, foram feitas duas colheitas de fezes nestes animais, uma em Outubro de 2002 e outra em Fevereiro de 2003, tendo sido detectados oocistos, apenas, nas amostras da primeira colheita. A dimensão média dos oocistos, observados nos esfregaços fecais do bisonte americano e do gnu de cauda branca, foi de $4,82 \times 4,35 \mu\text{m}$ e $4,89 \times 4,45 \mu\text{m}$, respectivamente.

Relativamente aos répteis, foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp., nas fezes de uma tartaruga estrela indiana (*Geochelone elegans*), que havia chegado de Singapura, três dias antes da recolha fecal. Este animal fazia parte de um grupo de tartarugas confiscadas no mercado negro e encontrava-se muito debilitado, devido a diversos factores, como sobrepovoamento das instalações, malnutrição, exposição a diferenças de temperaturas e stress induzido pelo transporte, tendo morrido duas semanas após a chegada a Lisboa. Nas amostras fecais dos restantes répteis do Jardim Zoológico de Lisboa não foram encontrados oocistos. A carga parasitária, presente nas fezes da tartaruga estrela indiana era de nível I. A dimensão média dos oocistos, observados nas fezes deste animal, foi de $4,93 \times 4,51 \mu\text{m}$.

Nenhuma das aves que, no presente trabalho, foram objecto de estudo se apresentavam parasitadas com microrganismos do género *Cryptosporidium*.

3. DISCUSSÃO

3.1 ANIMAIS DE COMPANHIA

Os resultados obtidos mostram que, na amostra estudada, a percentagem de cães e gatos de companhia com infecção por *Cryptosporidium* spp. é baixa. Estes parasitas foram encontrados, apenas, em 1,8% (2/109) dos gatos estudados, não tendo sido detectados em nenhum dos cães, com ou sem dono, que foram objecto do nosso estudo. Na literatura sobre a criptosporidiose em animais de companhia, as percentagens de infecção documentadas são variáveis, embora, nalguns casos, os valores descritos sejam semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Na cidade de Fort Collins, nos EUA, Hill *et al.* (2000) encontraram, em gatos com dono, a percentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp. de 3,1% (4/128). Também, nos EUA, na cidade de Ithaca, a percentagem de criptosporidiose, encontrada em gatos com dono e idade inferior a 12 meses, foi de 2,6% (3/114) [Spain *et al.*, 2001]. Outros autores descreveram, também, em felídeos domésticos com dono, nas cidades de Tóquio e de Glasgow, percentagens de infecção de 3,8% (23/608) e de 5,1% (7/136), respectivamente [Arai *et al.*, 1990; Mtambo *et al.*, 1991]. No que respeita à população canina com dono, encontram-se documentadas percentagens de criptosporidiose de 1,8% (1/55) em Hobart, na Tasmânia [Milstein e Goldsmid, 1995], de 8,1% (3/37) em Saragoça, Espanha [Causapé *et al.*, 1996], de 0% (0/77) em Perth, na Austrália [Bugg *et al.*, 1999] e de 3,8% (5/130) em Fort Collins, nos EUA [Hackett e Lappin, 2003]. Relativamente aos cães de rua ou albergados em canis, foram encontradas percentagens de infecção por *Cryptosporidium* spp. de 6,8% (3/44) em Saragoça, Espanha [Causapé *et al.*, 1996], de 0% (0/100) em Perth, na Austrália [Bugg *et al.*, 1999] e de 6,4% (9/140) em Osaka, no Japão [Abe *et al.*, 2002]. Na cidade do Rio de Janeiro, no Brasil, Huber *et al.* (2005) encontraram, em cães com dono e em cães albergados num canil municipal, percentagens de infecção de 2,8% (2/72) e 2,1% (2/94), respectivamente.

Os gatos que encontrámos parasitados com oocistos de *Cryptosporidium* spp. tinham, ambos, menos de sete meses de vida. Outros autores observaram, também, que a infecção se regista, principalmente, em animais jovens [Arai *et al.*, 1990; Mtambo *et al.*, 1991]. Este facto é, provavelmente, consequência de alguma imaturidade imunológica, que torna estes animais mais susceptíveis a esta e a outras infecções, e da imunidade adquirida exibida pelos animais adultos [Glaser *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 2000].

A baixa percentagem de criptosporidiose encontrada na população de animais com dono, pode ser compreendida, se atendermos a alguns aspectos característicos dessa mesma população. Estes animais possuem donos, que se preocupam com a sua saúde e bem-estar e que lhes proporcionam cuidados médico-veterinários regulares. Regra geral, fazem uma alimentação saudável, equilibrada e de qualidade e consomem água tratada da rede pública de abastecimento, o que diminui o risco de exposição aos parasitas do género *Cryptosporidium*. Por outro lado, são sujeitos a desparasitação e a imunização activa, contra diversos agentes patogénicos, causadores de doenças, que induzem diminuição das defesas imunitárias (leucemia viral felina, rinotraqueíte viral felina, calicivirose felina, panleucopenia felina, entre outras, no caso dos gatos; esgana, parvovirose, raiva, entre outras, no caso dos cães). A conjugação de todos estes factores permite que a função imunitária destes animais, se desenvolva de modo normal, tornando-os menos susceptíveis à infecção por *Cryptosporidium* spp.. Para além disso, sendo a percentagem de infecção baixa, a contaminação ambiental também o é, diminuindo, assim, as oportunidades de transmissão a outros animais. Ainda, nas zonas urbanas, as possibilidades de transmissão entre animais de companhia com dono não serão muito elevadas. No caso dos cães com dono, o contacto directo entre animais, em parques públicos ou na rua, limita-se, muitas vezes, a alguns minutos diários. No que respeita aos cães albergados em canis, animais que foram recolhidos da rua, partindo da hipótese que a contaminação ambiental é baixa, a probabilidade deles serem infectados é, também, reduzida. Quanto aos gatos com dono, muitos deles passam a maior parte da sua existência dentro de casa, não tendo, por isso, contacto com outros animais ou ambientes contaminados, que possam ser fonte de infecção. No presente trabalho, os dois gatos com criptosporidiose haviam sido recolhidos da rua e, provavelmente, foi aí que contraíram a infecção por *Cryptosporidium* spp.. Um dos gatos encontrava-se debilitado, devido a infecção respiratória por Calicivírus, desconhecendo-se, em ambos os casos, se apresentavam imunossupressão, devida ao vírus da imunodeficiência felina.

Os resultados obtidos, no presente trabalho, sugerem que, nas regiões estudadas, os microrganismos do género *Cryptosporidium* não são parasitas comuns dos cães e gatos de companhia. Assim, o risco de transmissão da criptosporidiose ao Homem, por estes animais, deve ser baixo, sendo, no entanto, maior no caso dos gatos do que no dos cães. Esta situação pode estar relacionada com o facto do número de gatos de vida livre ser superior ao dos cães e de a maioria dos gatos com dono ter sido adoptada da rua [Henriques, J., 2005, comunicação

pessoal]. Devido à falta de colaboração por parte dos donos dos gatos infectados, não nos foi possível investigar se os membros da família e/ou outros animais de companhia, que partilhavam o ambiente doméstico com esses animais, estariam, também, infectados por *Cryptosporidium* spp..

A relação causa-efeito, entre a partilha do ambiente doméstico com um animal de companhia infectado por *Cryptosporidium* spp. e a infecção humana, é difícil de conseguir. Tal prende-se com o facto de a presença de oocistos, nas fezes de um animal, não comprovar a origem de uma eventual infecção do seu dono, devido à possibilidade de ambos terem sido expostos à mesma fonte de infecção ou de o animal ter sido infectado pelo seu dono [Casemore *et al.*, 1997; Glaser *et al.*, 1998]. Contudo, o facto de se encontrarem descritos diversos casos de criptosporidiose humana, devido a *C. felis* e a *C. canis*, nomeadamente em crianças e em doentes com infecção VIH/SIDA, leva-nos a crer que a prevenção é a melhor defesa. Assim, os donos de animais de companhia, principalmente aqueles com função imunitária diminuída, deverão dar aos seus animais alimentação e água de qualidade, conferir-lhes cuidados médico-veterinários regulares (desparasitação, imunização activa e exame parasitológico das fezes) e adoptar medidas de higiene, como lavar bem as mãos, após afagar o animal, evitar o contacto com as suas fezes e evitar o contacto com o animal, caso ele apresente diarreia [Angulo *et al.*, 1994]. Neste aspecto é, ainda, fundamental que o médico veterinário proporcione aos donos dos animais informação clara e objectiva sobre a existência destes parasitas, o seu potencial zoonótico e as medidas a tomar, no sentido de evitar uma eventual transmissão.

O papel dos animais de companhia, como fonte da infecção, por *Cryptosporidium* spp., para o Homem, encontra-se, ainda, pouco esclarecido, sendo necessárias investigações epidemiológicas mais abrangentes e aprofundadas que possam clarificar este assunto.

3.2 ANIMAIS SILVÁTICOS DE VIDA LIVRE

A investigação realizada, com o objectivo de contribuir para o conhecimento sobre a ocorrência da criptosporidiose, em animais silváticos de vida livre, mostrou que, na altura em que os animais estudados foram capturados, nenhum deles se encontrava a excretar oocistos de *Cryptosporidium* spp..

No que diz respeito aos carnívoros, não só o número de animais estudados foi muito reduzido (13 raposas), como a sua captura se confinou a uma única ocasião, factores que limitam o alcance dos resultados obtidos. O único trabalho encontrado na literatura, sobre a

presença de *Cryptosporidium* spp. em raposas, foi realizado na região de Warwickshire, no centro da Inglaterra, e descreve uma percentagem de infecção de 9% (2/23) [Sturdee *et al.*, 1999].

Relativamente aos pequenos mamíferos, apesar do número de animais estudados ter sido superior ao dos carnívoros, a sua captura foi realizada, apenas, em três ocasiões (Maio, Agosto e Novembro de 2003), facto que não nos permite obter um quadro representativo da globalidade da situação anual. Para além disso, não foram capturados animais durante os meses de Inverno, altura em que se regista maior precipitação. A excreção de *C. parvum* e *C. muris*, por pequenos mamíferos, tem sido documentada por diversos autores, que utilizaram as características morfológicas dos oocistos, como critério de identificação de espécie. Alguns desses autores observaram variações temporais, nos valores de prevalência encontrados, tanto entre diferentes alturas de um mesmo ano, como entre anos diferentes. Numa investigação, conduzida na região de Warwickshire, em Inglaterra, entre 1992 e 1997, Sturdee *et al.* (2003) observaram, não só uma variação sazonal da prevalência da criptosporidiose em pequenos roedores e insectívoros (*Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus*, *Mus domesticus*, *Sorex araneus* e *Sorex minutus*), com valores mínimos de 17,8% (33/185), na Primavera, e máximos, de 45,6% (139/305), no Outono, mas, também, uma variação ao longo dos anos, com um máximo de 46,2% (54/117) registado em 1996, e um mínimo de 9,3% (8/86), encontrado em 1997. No Reino Unido, Webster e MacDonald (1995) descreveram, também, a variação sazonal da prevalência da criptosporidiose em *Rattus norvegicus*, tendo registado valores de 95% na Primavera, 14% no Verão, 53% no Outono e 70% no Inverno. Esta variação sazonal foi, também, encontrada na província da Catalunha, em Espanha, por Torres *et al.* (2000), que, entre 1995 e 1997, observaram, em sete espécies de roedores e insectívoros (*Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus*, *Crocidura russula*, *Mus spretus*, *Rattus rattus* e *Sorex araneus*), prevalências de criptosporidiose de 32,9% (30/91), no Outono e de 21,9% (34/155), na Primavera. Na Polónia, Siski *et al.* (1993), descreveram, em pequenos mamíferos, pertencentes às espécies *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Clethrionomys glareolus*, *Sorex araneus* e *Sorex minutus*, variação da prevalência de infecção por *C. parvum*, durante a estação do Outono, em dois anos consecutivos, tendo registado um valor de 29,2% (24/82), no ano de 1989 e de 12,9% (17/131), no ano seguinte. Estes resultados demonstram que as observações efectuadas, em períodos de tempo curtos, não são representativas da situação global, sendo esta uma limitação associada à investigação que realizámos.

O facto de todos os animais capturados, no presente trabalho, serem adultos poderá, também, justificar a ausência de infecções por *Cryptosporidium* spp., na medida em que os animais jovens são, regra geral, mais susceptíveis a esta infecção. No Reino Unido, Quy *et al.* (1999) observaram, em *Rattus norvegicus*, jovens e adultos, percentagens de infecção por *C. parvum*, de 40% e 12%, respectivamente. Também, na Polónia, Bajer *et al.*, 2002 observaram, em três espécies de roedores (*Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus* e *Microtus arvalis*), maior prevalência de infecção por *C. parvum* nos animais jovens, do que nos adultos.

Por fim, não podemos excluir a influência que as características climáticas e orográficas, da região onde os animais foram capturados, possam ter tido nos resultados negativos que obtivemos. O Baixo Alentejo tem um clima sub-húmido a seco, caracterizado pela pouca precipitação anual, que se concentra, principalmente, nos meses de Outono e Inverno. Segundo dados recolhidos na estação meteorológica de Beja, fornecidos pelo Instituto de Meteorologia, a temperatura média do ar, registada entre Maio e Agosto de 2003, variou, aproximadamente, entre 20°C e 26°C. Durante os mesmos meses, a temperatura mínima oscilou entre 11,5°C e 18,5°C, enquanto que a temperatura máxima se situou entre 27,3°C e 35,7°C. De salientar, ainda, que, para o mesmo período, e de acordo com a mesma fonte, apenas se verificou alguma precipitação, durante o mês de Maio, tendo o valor registado sido cerca de 10 mm. [Pires *et al.*, 2004; <http://www.meteo.pt/InformacaoClimatica/Anos/Anos.htm>, consultado a 24 de Abril de 2005]. No mês de Novembro de 2003, foram registados, para a temperatura média do ar e a precipitação mensal total, valores compreendidos nos intervalos de 12 a 14°C e de 100 a 150 mm, respectivamente [<http://web.meteo.pt/resources/im/produtos/clima/mapas/mrrto200311.jpg> e <http://web.meteo.pt/resources/im/produtos/clima/mapas/mttme200311.jpg>, consultados a 18 de Agosto de 2005]. As elevadas temperaturas, que se fizeram sentir nesta região, sobretudo nos meses de Verão, associadas à secura do solo, em resultado da ausência de precipitação, constituem factores desfavoráveis à sobrevivência dos oocistos, contribuindo para a diminuição do número de oocistos viáveis existentes no ambiente. Por outro lado, não só a orografia pouco acentuada, dos locais estudados, como o tipo de biótopo, caracterizado por vegetação herbácea (juncos e gramíneas), silvados e loendros, criam condições que limitam a ocorrência de escorrimentos superficiais de água, nas alturas em que se verifica precipitação. Perante o exposto, pode colocar-se a hipótese de, nesta região, em consequência dos factores acima referidos, o nível de transmissão de *Cryptosporidium* spp. ser reduzido.

No presente estudo, realizado em pequenos mamíferos, na região do Baixo Alentejo, não foi observado nenhum animal com infecção por *Cryptosporidium* spp.. Todavia, os resultados obtidos foram limitados pelo facto de a captura dos animais ter sido realizada num período de tempo curto e de forma descontínua, sendo necessário proceder a investigações mais aprofundadas, de forma a obter resultados representativos da situação epidemiológica existente naquela região.

3.3 ANIMAIS SILVÁTICOS EM CATIVEIRO

Os resultados da investigação realizada em mamíferos, répteis e aves cativos no Jardim Zoológico de Lisboa, mostraram que, durante o período em que decorreu o trabalho, o número de animais a excretar oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi muito baixo. Entre os mamíferos estudados, foram encontrados oocistos, apenas, em duas amostras fecais, pertencentes a dois Bovídeos – um bisonte americano e um gnu de cauda branca. Estes eram, ambos, adultos e não apresentavam diarreia, observação concordante com as descrições, efectuadas por diversos autores, que dão conta do facto de a infecção por *Cryptosporidium* spp., em animais adultos, ser, com frequência, assintomática, [Majewska *et al.*, 1997; Deng e Cliver, 1999; Gómez *et al.*, 2000; Lourenço *et al.*, 2000]. No Jardim Zoológico de Barcelona, Gómez *et al.* (2000) e Gracenea *et al.* (2002) já haviam identificado oocistos de *Cryptosporidium* spp., nas fezes de bisontes americanos. A infecção por *Cryptosporidium* spp., em gnus de cauda branca, foi, também, descrita por Mtambo *et al.* (1997), em 27% (7/26) dos animais estudados no parque Nacional de Mikumi, na Tanzânia.

A percentagem de amostras fecais positivas, obtida no presente trabalho, para os ruminantes artiodáctilos (2,3% – 2/87), foi idêntica à encontrada por Delgado (2000), também no Jardim Zoológico de Lisboa, entre Setembro de 1998 e Agosto de 1999, para o mesmo grupo de animais (2,1% – 8/388). Todavia, ao contrário do sucedido no nosso trabalho, aquela autora estudou, não só animais adultos, mas, também, recém-nascidos. Cinco dos oito animais que Delgado (2000) encontrou parasitados tinham menos de dois meses de vida. O facto da criptosporidiose atingir, com mais frequência, animais jovens encontra-se descrito por diversos autores, quer em gado doméstico [Olson *et al.*, 1997a; Pereira da Fonseca *et al.*, 2001; Izumiyama *et al.*, 2001], quer em animais de companhia [Arai *et al.*, 1990; Mtambo *et al.*, 1991] e, ainda, em animais silváticos [Kalishman *et al.*, 1996; Atwill *et al.*, 1997; Quy *et al.*, 1999; Rickard *et al.*, 1999]. O nascimento das crias que Delgado (2000) identificou com criptosporidiose, aconteceu

no Inverno, altura em que a precipitação é mais intensa, levando à presença de águas de escorrência e poças de água, eventualmente contaminadas com oocistos, o que facilita a transmissão do parasita. Para além disso, as condições de humidade e temperatura, características desta estação do ano, são favoráveis à sobrevivência dos oocistos no solo.

Segundo informação disponibilizada pelo Instituto de Meteorologia, no período compreendido entre Setembro de 2002 e Março de 2003, a precipitação mensal total, registada em Lisboa, variou entre o valor máximo de 193 mm (em Novembro de 2002) e o mínimo de 76 mm (em Março de 2003) [<http://web.meteo.pt/pt/clima/clima.jsp>, consultado a 12 de Agosto de 2005]. À excepção do mês de Fevereiro de 2003, os valores de precipitação, que se verificaram naqueles sete meses, excederam, em média, 40,8 mm (valores mínimo e máximo de 7 mm e 79 mm, respectivamente), os valores médios mensais, registados entre 1961 e 1990. Apesar da elevada pluviosidade verificada, principalmente entre Setembro de 2002 e Março de 2003, o número de infecções por *Cryptosporidium* spp., identificado nos mamíferos estudados, foi muito baixo. Estes resultados sugerem que, no Jardim Zoológico de Lisboa, a contaminação ambiental é, provavelmente, pequena e que a limpeza dos recintos e o manejo higio-sanitário dos animais são eficazes no controlo da transmissão deste parasita.

Com excepção da tartaruga estrela indiana, que havia chegado de Singapura e que se encontrava em quarentena, não foi observada a excreção de oocistos, por parte de nenhum dos répteis do Jardim Zoológico de Lisboa, que foram alvo do nosso estudo. Estes animais vivem, em condições de temperatura e humidade constantes, em recintos isolados, não só do exterior como, também, de outros animais. Esta situação de isolamento não é propícia à introdução de parasitas nos habitats individuais, constituindo, provavelmente, uma das razões pela qual não foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp. neste grupo de animais. A infecção em tartarugas estrela já havia sido descrita nos EUA, no “San Diego Wild Animal Park” [Heuschele *et al.*, 1986], na “Wildlife Conservation Society”, em Nova Iorque [Raphael *et al.*, 1997] e no Zoo de Louisville [Xiao *et al.* 2004b].

Em relação às aves, apenas foi possível realizar uma única recolha de fezes, o que aconteceu no mês de Agosto, altura em que as condições de elevada temperatura e a ausência de precipitação, não favorecem a sobrevivência dos oocistos. Por esta razão, os resultados obtidos, para este grupo de animais, têm um alcance muito limitado.

As características de acomodação dos animais em cativeiro, em especial dos mamíferos, como a vida em grupo, ao ar livre, em recintos de terra batida e expostos aos elementos

climáticos, particularmente, à chuva, são factores que podem favorecer a transmissão da criptosporidiose. Contudo, a presente investigação parece indicar que esta é uma parasitose pouco frequente nos animais do Jardim Zoológico de Lisboa estudados. No entanto, sendo a transmissão zoonótica uma das vias de infecção do Homem, é importante, para a saúde pública, estudar a infecção por *Cryptosporidium* spp. nos animais presentes em locais públicos, como o Jardim Zoológico de Lisboa, que recebe, anualmente, milhares de visitantes e, entre estes, particularmente, crianças.

Capítulo V



CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS HUMANOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

1. INTRODUÇÃO

A maioria das infecções por *Cryptosporidium* spp. são confirmadas pela observação microscópica de oocistos do parasita, em amostras fecais. Todavia, a semelhança morfológica existente entre as diferentes espécies pertencentes a este género, não permite que a sua identificação seja efectuada por microscopia óptica [Petry, 2000; Fall *et al.*, 2003].

Ao longo da última década, assistiu-se à ampla utilização das técnicas de biologia molecular, aplicadas ao estudo da epidemiologia de *Cryptosporidium* spp.. Com recurso a técnicas de PCR, RFLP e sequenciação de DNA, entre outras, tendo como alvo diversos *loci* genéticos, foi possível desenvolver métodos que permitiram detectar e diferenciar as várias espécies pertencentes a este género [Peng *et al.*, 1997; Spano *et al.*, 1997b; Gibbons *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1998a; Spano *et al.*, 1998b; Sulaiman *et al.*, 1998; Cacciò *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999a, 1999c]. A aplicação destes métodos a inúmeros isolados, responsáveis por infecções humanas, em várias regiões do Mundo, permitiu, assim, conhecer a diversidade de espécies de *Cryptosporidium*, infectantes para o Homem. Apesar das espécies *C. parvum* e *C. hominis* serem as que mais se encontram associadas à criptosporidiose humana, sabe-se, hoje, que outras, como *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. suis* e *Cryptosporidium* genótipo cervo podem, também, ser responsáveis pela infecção no Homem [Peng *et al.*, 1997; Spano *et al.*, 1997b; Gibbons *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1998a; Spano *et al.*, 1998a, 1998b; Sulaiman *et al.*, 1998; Cacciò *et al.*, 1999; McLauchlin *et al.*, 1999; Pieniazek *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2000, 2001a; Guyot *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001a; Ong *et al.*, 2002; Cama *et al.*, 2003; Matos *et al.*, 2004].

Com o objectivo de identificar as espécies de *Cryptosporidium*, responsáveis pela criptosporidiose numa população de infectados por VIH, em Portugal, os isolados detectados, por diagnóstico parasitológico, no decurso do presente trabalho, foram caracterizados por PCR, RFLP e/ou sequenciação de quatro *loci* genéticos – COWP, DHFR, TRAP-C1 e SSU-rRNA. No genoma de *Cryptosporidium* spp., existem cinco cópias deste último gene e uma cópia dos restantes três [Vásquez *et al.*, 1996; Le Blancq *et al.*, 1997; Spano *et al.*, 1997a, 1998c]. Le Blancq *et al.* (1997) estudaram, num isolado bovino, pertencente à espécie *C. parvum*, a organização e a estrutura dos genes que codificam o rRNA, tendo observado, nas cinco cópias do ácido desoxirribonucleico ribossómico ou rDNA (sigla anglo-saxónica para “ribosomal deoxyribonucleic acid”), a existência de duas sequências nucleotídicas distintas, que denominaram de A e B. Estes autores verificaram que, das cinco cópias do rDNA, quatro

apresentavam a sequência nucleotídica A e uma a sequência B. A diferença nucleotídica entre as sequências A e B do rDNA localiza-se, essencialmente, nas regiões ITS, embora tenham, também, sido identificadas pequenas dissemelhanças nos genes que codificam as subunidades grande (28S), pequena (18S) e 5.8S do rRNA [Le Blancq *et al.*, 1997]. Em *C. parvum*, as sequências das cópias A e B do gene que codifica a subunidade pequena (SSU) do rRNA, diferem, entre si, por uma deleção de três nucleótidos e por duas substituições de um nucleótido [Xiao *et al.*, 1999b]. Estas diferenças não alteram os perfis de restrição dos produtos de PCR, obtidos por hidrólise com as endonucleases *SspI* e *VspI*, que utilizámos na análise de RFLP. Em *C. felis* e em *C. hominis*, foram, também, identificadas sequências nucleotídicas distintas nas diferentes cópias do gene que codifica a SSU-rRNA. Em *C. felis*, na sequência da cópia B, foi observada, relativamente à da cópia A, uma inserção, uma deleção e uma substituição, todas elas, de um único nucleótido. A substituição nucleotídica que se verifica em *C. felis*, na cópia B do gene SSU-rRNA, resulta na criação de um local de restrição adicional para a endonuclease *VspI*, originando, assim, perfis de restrição distintos para os dois tipos de cópias deste gene [Xiao *et al.*, 1999b]. Ao invés do descrito em *C. parvum*, nos isolados de *C. felis*, não foi observada a proporção de quatro cópias da sequência A para, apenas, uma da sequência B [Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. Em *C. hominis*, a diferença entre a sequência das cópias do gene que codifica a SSU-rRNA, consiste em duas substituições de um nucleótido e na variação do número de resíduos de timina (6T, 8T, 10T, 11T ou 12T), presentes numa região poli-T do gene. Ao contrário do que sucede em *C. felis*, estas diferenças não alteram os perfis de restrição dos fragmentos amplificados, que se obtêm com as endonucleases utilizadas na análise de RFLP, sendo detectadas, somente, por sequenciação dos produtos de PCR [Xiao *et al.*, 1999b; Dalle *et al.*, 2003]. Xiao *et al.* (1999b) alinharam as sequências das diferentes cópias do gene SSU-rRNA de *C. parvum*, *C. hominis* e *C. felis*, com as de outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* e verificaram, por análise filogenética do alinhamento de sequências resultante, que a relação existente, entre as várias espécies e genótipos do género *Cryptosporidium*, não é alterada pelas dissemelhanças na sequência nucleotídica das diversas cópias do gene que codifica a SSU-rRNA.

2. RESULTADOS

No conjunto dos quatro *loci* genéticos estudados (SSU-rRNA, COWP, DHFR e TRAP-C1), foi possível amplificar, por PCR, o DNA genómico de 50 isolados de *Cryptosporidium* spp.. Deste grupo fazem parte seis dos 15 isolados, identificados entre Dezembro de 1994 e Agosto de 1997, que se encontravam conservados em MIF, todos os 26 isolados, identificados entre Setembro de 1997 e Maio de 2001, que se encontravam conservados em dicromato de potássio a 5% e todos os 18 isolados, identificados entre Junho de 2001 e Janeiro de 2005, que foram caracterizados, logo após a sua detecção. No quadro XVI, encontram-se resumidos, para cada *locus* estudado, os resultados da amplificação, por PCR, do DNA destes isolados de *Cryptosporidium* spp..

QUADRO XVI – Resultados da amplificação, por PCR, do DNA dos isolados de *Cryptosporidium* spp. identificados numa população portuguesa com infecção por VIH

ISOLADOS (n.º estudado)	N.º DE ISOLADOS COM AMPLIFICAÇÃO POSITIVA			
	SSU-rRNA	COWP	DHFR	TRAP-C1
Dez.94-Ago.97 (MIF) (n = 15)	6 (40,0%)	4 (26,7%)	2 (13,3%)	2 (13,3%)
Set.97-Mai.01 (K ₂ Cr ₂ O ₇) (n = 26)	26 (100%)	22 (84,6%)	20 (76,9%)	16 (61,5%)
Jun.01-Jan.05 (n = 18)	18 (100%)	13 (72,2%)	13 (72,2%)	11 (61,1%)
Total (n = 59)	50 (84,7%)	39 (66,1%)	35 (59,3%)	29 (49,2%)

No quadro XVI é possível observar que, independentemente do gene alvo, a percentagem de amplificação do DNA dos isolados que se encontravam conservados em MIF, foi muito inferior à daqueles que se encontravam preservados em dicromato de potássio ou que foram caracterizados logo após a sua identificação. O método de PCR para o gene SSU-rRNA, foi o que permitiu a amplificação do DNA de um maior número de parasitas, seguindo-se-lhe, por ordem decrescente, os genes COWP, DHFR e TRAP-C1. Se excluirmos os isolados que se encontravam preservados em MIF, a percentagem de amplificação para o

gene SSU-rRNA foi de 100% (44/44) e a dos genes COWP, DHFR e TRAP-C1 de 79,5% (35/44), 75% (33/44) e 61,4% (27/44), respectivamente.

Em cada um dos quatro *loci* estudados, a comparação dos perfis de restrição descritos na literatura, com os obtidos após hidrólise dos produtos de PCR com endonucleases de restrição, permitiu identificar as espécies de *Cryptosporidium*, dos isolados detectados no diagnóstico parasitológico (figuras 9 a 11). Através da sequenciação dos produtos de PCR, em dois isolados representativos de cada espécie identificada e de cada *locus* estudado, obtiveram-se sequências nucleotídicas que, com recurso ao programa BLAST, foram comparadas com as depositadas no GenBank. Deste modo, foi possível encontrar sequências nucleotídicas iguais às que haviam sido determinadas e, assim, confirmar a identidade das espécies de *Cryptosporidium* feita por RFLP (*vide* números de acesso do Genbank no quadro XVII). Dos 50 isolados, cuja amplificação de DNA, por PCR, foi bem sucedida, 26 (52%) pertenciam à espécie *C. parvum*, 16 (32%) a *C. hominis*, cinco (10%) a *C. felis* e três (6%) a *C. meleagridis* (quadro XVII).

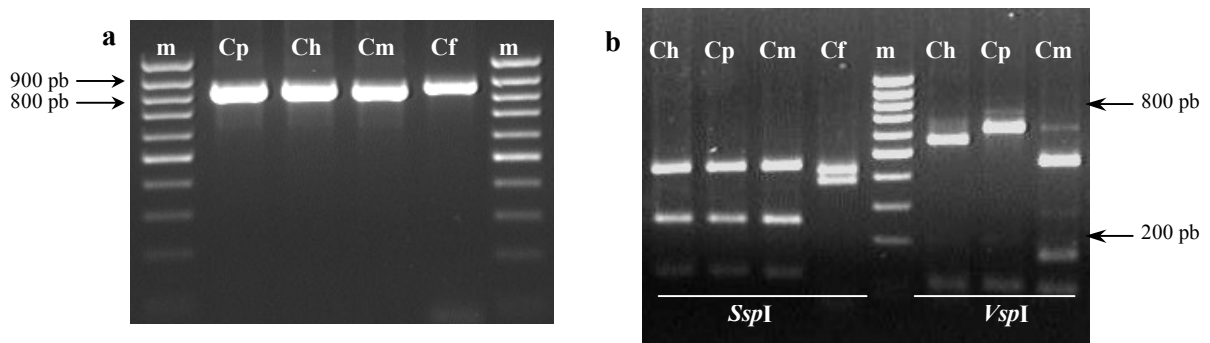


FIGURA 9 – Fotografias de géis de agarose, após electroforese (a) dos produtos de amplificação do gene SSU-rRNA e (b) dos fragmentos de restrição pelas endonucleases *SspI* e *VspI*. Cp – *C. parvum*, Ch – *C. hominis*, Cm – *C. meleagridis*, Cf – *C. felis*, m – marcador de pesos moleculares (“100 bp ladder”)

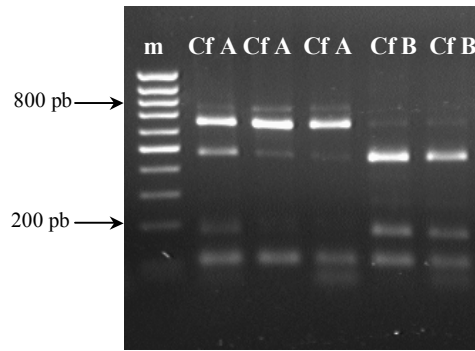


FIGURA 10 – Fotografia de um gel de agarose, após electroforese dos produtos de restrição do fragmento do gene SSU-rRNA, de *C. felis*, com a endonuclease *VspI*. Cf A – isolados de *C. felis*, com predomínio da cópia A do gene SSU-rRNA, Cf B – isolados de *C. felis*, com predomínio da cópia B do gene SSU-rRNA, m – marcador de pesos moleculares (“100 bp ladder”)

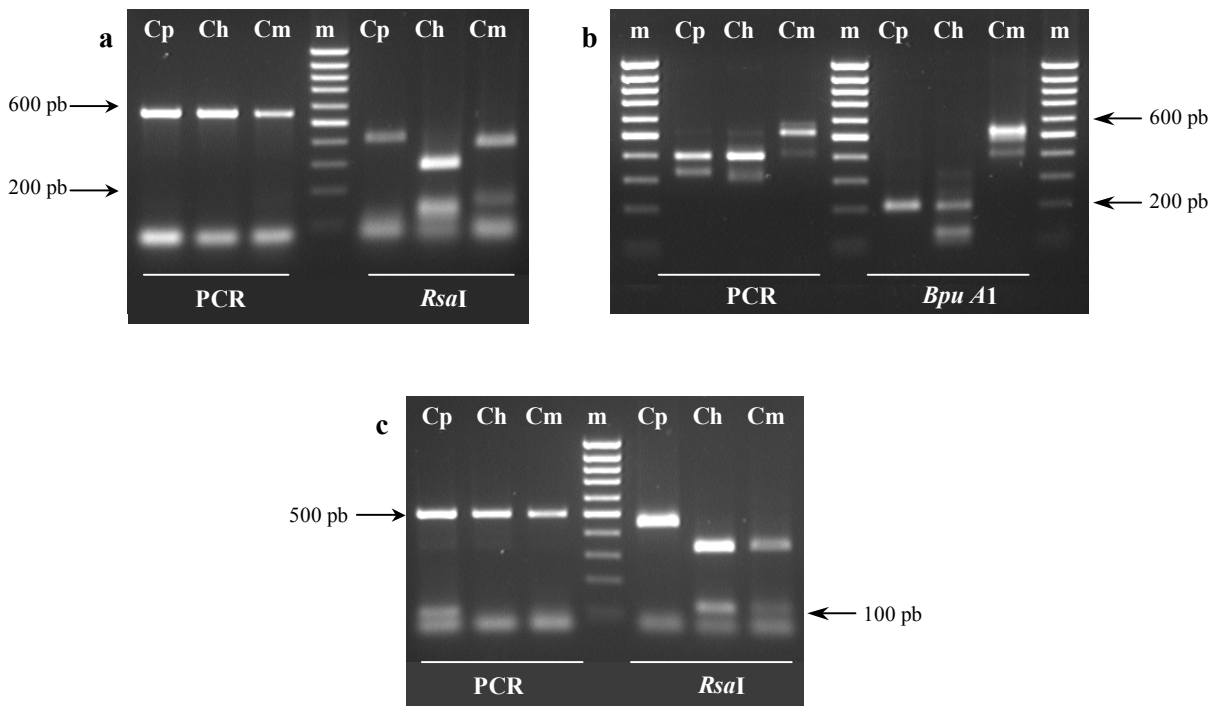


FIGURA 11 – Fotografias de géis de agarose, após electroforese dos produtos de PCR e dos respectivos fragmentos de restrição, para os genes (a) COWP, (b) DHFR e (c) TRAP-C1. Cp – *C. parvum*, Ch – *C. hominis*, Cm – *C. meleagridis*, m – marcador de pesos moleculares (“100 bp ladder”)

QUADRO XVII – Resultados da identificação da espécie de *Cryptosporidium* spp., dos isolados estudados, e respectivos números de acesso do GenBank, para cada *locus* caracterizado

GENE	N.º DE ISOLADOS (N.º DO GENBANK)			
	<i>C. parvum</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. felis</i>	<i>C. meleagridis</i>
SSU-rRNA	26 (AF093490)	16 (AF093492, AF159111)	5 (AF112575 ^a , AF159113 ^b)	3 (AY166839)
COWP	21 (AF248743)	14 (AF481960)	2 (AF266263)	2 (AY166840)
DHFR	19 (U41365)	15 (U41366)	a.a.	1 (AY391725)
TRAP-C1	14 (AF248745)	13 (AF248744)	a.a.	2 (AF248746)

^a – cópia A do gene SSU-rRNA; ^b – cópia B do gene SSU-rRNA; a.a. – ausência de amplificação

A análise das sequências nucleotídicas permitiu, ainda, identificar, com precisão, a dimensão dos fragmentos de restrição, visualizados em gel de agarose, cujos valores são apresentados no quadro XVIII.

Quadro XVIII – Dimensão dos fragmentos de restrição dos quatro *loci* amplificados, para as espécies de *Cryptosporidium* identificadas na população portuguesa estudada

GENE / ENZIMA DE RESTRIÇÃO	DIMENSÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (pb)			
	<i>C. parvum</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. felis</i>	<i>C. meleagridis</i>
SSU-rRNA / <i>SspI</i>	449, 254, 108, 12, 11	449, 254, 108, 12, 11	426, 391, 33, 14 ^a 426, 390, 33, 15 ^b	449, 254, 108, 11, 11
SSU-rRNA / <i>VspI</i>	628, 104, 102	558, 104, 102, 70	658, 104, 102 ^a 476, 182, 104, 102 ^b	456, 171, 104, 102
COWP / <i>RsaI</i>	413, 106, 34	284, 140, 129	406, 86, 61	372, 147, 34
DHFR / <i>BpuA1</i>	210, 198	198, 118, 92	a.a.	408*
TRAP-C1 / <i>RsaI</i>	455, 51	341, 114, 51	a.a.	341, 114, 51

^a – cópia A do gene SSU-rRNA; ^b – cópia B do gene SSU-rRNA; a.a. – ausência de amplificação; * – não se observou hidrólise do fragmento amplificado por PCR

Excluindo os isolados que se encontravam conservados em MIF e os que pertenciam à espécie *C. felis*, cujo DNA não foi amplificado pela PCR dos genes DHFR e TRAP-C1, observou-se maior insucesso de amplificação nos isolados provenientes de amostras fecais com carga parasitária baixa (nível I ou II), sobretudo no caso dos genes DHFR e TRAP-C1. Nas amostras fecais com carga parasitária de nível I ou II, a percentagem de não amplificação dos genes COWP, DHFR e TRAP-C1 foi de 15% (3/20), 20% (4/20) e 40% (8/20), respectivamente, enquanto que, nas fezes com carga parasitária de nível III ou IV, a percentagem de insucesso, para os mesmos genes, foi de 15,8% (3/19), 10,5% (2/19) e 21,1% (4/19). Entre os parasitas que registaram insucesso na amplificação do gene COWP, 50% (3/6) provinham de amostras fecais com carga parasitária de nível I ou II, valor que foi de 66,7% no caso dos genes DHFR (4/6) e TRAP-C1 (8/12).

A PCR do *locus* SSU-rRNA, permitiu a amplificação do DNA dos isolados pertencentes às espécies *C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis* e *C. meleagridis* (figura 9a). A hidrólise com a enzima de restrição *SspI*, permitiu diferenciar *C. felis* das restantes três espécies. A hidrólise com a endonuclease *VspI*, permitiu distinguir as espécies *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis* e as cópias A e B do gene SSU-rRNA de *C. felis* (figuras 9b e 10, quadro XVIII). Nos dois isolados de *C. hominis*, cujos produtos de amplificação do gene que codifica a SSU-rRNA foram sequenciados, as sequências nucleotídicas obtidas apresentavam, na região poli-T, seis e oito resíduos de timina.

A amplificação do fragmento do gene COWP, seguida de hidrólise pela endonuclease *RsaI*, permitiu identificar as espécies *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis* (figura 11a, quadro XVIII). No que respeita à espécie *C. felis*, a amplificação do DNA, por PCR, aconteceu, apenas, em dois dos cinco isolados, identificados pela PCR do *locus* SSU-rRNA. Para além disso, o rendimento da reacção de PCR foi muito baixo, o que se traduziu na observação, em gel de agarose, de um fragmento de DNA de fraca intensidade. Em consequência desta situação, não foi possível realizar, nestes dois parasitas, a análise de RFLP do fragmento amplificado, tendo a identificação da espécie sido realizada por sequenciação do produto de PCR e por comparação das sequências nucleotídicas obtidas, com as depositadas no GenBank, com recurso ao programa BLAST.

O método de PCR, para o *locus* DHFR, permitiu a amplificação do DNA dos isolados pertencentes às espécies *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis*, mas não a *C. felis*. A hidrólise dos produtos de PCR com a enzima de restrição *BpuA1*, permitiu obter perfis de

restrição distintos para *C. parvum* e *C. hominis*. No caso de *C. meleagridis*, não se verificou hidrólise do fragmento amplificado por PCR, devido à inexistência de locais de restrição da endonuclease *BpuA1* (figura 11b, quadro XVIII).

A reacção de PCR, para o gene TRAP-C1, possibilitou a amplificação do DNA das espécies *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis*, mas não o de *C. felis*. A análise de RFLP, após a hidrólise com *RsaI*, permitiu a identificação dos isolados pertencentes à espécie *C. parvum*, mas não a distinção entre *C. hominis* e *C. meleagridis*, uma vez que os perfis de restrição dos fragmentos amplificados, para estas duas espécies, eram indistinguíveis (figura 11c, quadro XVIII). Por este motivo, a distinção entre *C. hominis* e *C. meleagridis*, no locus TRAP-C1, foi feita por comparação das sequências nucleotídicas, obtidas por sequenciação, com as depositadas no GenBank, através do programa BLAST.

Os resultados da identificação das espécies de *Cryptosporidium*, obtidos por PCR, RFLP e/ou sequenciação do DNA dos isolados, foram concordantes para os quatro loci genéticos estudados. Apenas em *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis* se verificou a amplificação do DNA dos quatro genes estudados.

Sempre que possível, foram recolhidos dados clínicos e epidemiológicos dos doentes com diagnóstico de criptosporidiose. Esses dados encontram-se descritos no quadro XIX, para todos os doentes em que a espécie de *Cryptosporidium* spp., responsável pela infecção, foi identificada. Da observação do quadro XIX, é possível constatar que todos os doentes parasitados com as espécies *C. felis* ou *C. meleagridis* apresentavam amostras fecais com carga parasitária baixa (nível I ou II), enquanto que aqueles com carga parasitária elevada (nível III ou IV) se encontravam infectados, apenas, por *C. parvum* ou por *C. hominis*. Entre os infectados por *C. parvum* 46,2% (12/26) apresentavam carga parasitária de nível III ou IV, valor que, no caso de infecções por *C. hominis*, foi de 50% (8/16). Dez dos doentes com criptosporidiose faleceram, tendo esta infecção, em três deles, sido considerada como a causa da morte. Dois destes doentes encontravam-se parasitados por *C. meleagridis* e, o outro, por *C. parvum*. Para alguns doentes, não foi possível obter todos os dados clínicos, nem informação epidemiológica sobre o estilo de vida ou determinados comportamentos, que possam ser associados à transmissão da criptosporidiose (contacto com gado doméstico ou animais de companhia; utilização de água de recreio; tipo de água, habitualmente, consumida; contacto com pessoas com diarreia; deslocações recentes ao estrangeiro).

QUADRO XIX – Dados demográficos, clínicos, laboratoriais e epidemiológicos dos doentes com criptosporidiose, cujos isolados foram caracterizados no presente trabalho

ISOLADO	DATA	IDADE	SEXO	RAÇA	TRANSMISSÃO VIH	LINFÓCITOS CD4 ⁺ (cél/s/μl)	CARGA PARASITÁRIA	DIARREIA	OUTROS PARASITAS INTESTINAIS	EVOLUÇÃO CLÍNICA	OUTROS	ESPÉCIE
CT.2	Jan-95	43	M	–	–	100	I	S	N	Faleceu	–	<i>C. parvum</i>
CT.4	Mai-05	>18	F	Caucasiana	–	–	IV	S	N	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CT.9	Fev-96	30	M	–	Homo	–	I	S	N	Faleceu de criptosporidiose	–	<i>C. meleagridis</i>
CT.13	Jun-96	31	M	Caucasiana	–	–	I	S	N	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CT.14	Ago-96	>18	M	Caucasiana	Hetero	20	I	S	N	–	–	<i>C. meleagridis</i>
CT.15	Jan-97	>18	M	Caucasiana	–	–	I	S	N	–	–	<i>C. parvum</i>
CH.1	Set-97	47	M	Caucasiana	Homo	22	IV	S	N	–	–	<i>C. hominis</i>
CH.5	Out-97	36	M	Caucasiana	Hetero	27	I	S	N	–	–	<i>C. parvum</i>
CH.10	Out-97	33	M	Caucasiana	Toxico	<50	IV	S	Microsporidia	Faleceu (1998)	–	<i>C. hominis</i>
CH.22	Nov-97	25	M	–	Toxico	–	III	S	N	–	–	<i>C. parvum</i>
CH.23	Nov-97	24	F	–	Toxico	35	II	S	N	Melhorou	–	<i>C. felis</i>
CH.29	Jan-98	23	F	Caucasiana	Toxico	40	I	S	Microsporidia	Faleceu	–	<i>C. parvum</i>
CH.34	Jan-98	33	M	Caucasiana	Toxico	–	III	S	N	–	–	<i>C. hominis</i>
CH.36	Jan-98	16	F	–	Toxico	–	IV	S	N	–	–	<i>C. parvum</i>
CH.52	Mai-98	25	M	–	Toxico	200-300	I	S	Microsporidia	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CH.54	Mai-98	30	F	–	Toxico	–	III	S	N	–	–	<i>C. parvum</i>
CH.57	Dez-98	32	M	–	Toxico	13	III	S	N	Melhorou	–	<i>C. hominis</i>
CH.58	Jan-99	36	M	–	Toxico	20	I	S	N	Melhorou	–	<i>C. hominis</i>
CH.60 [‡]	Jun-99	>18	M	Negra	–	–	I	S	Microsporidia	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CH.61	Jun-99	37	F	–	Toxico	19	I	S	N	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CH.62	Out-99	44	M	Negra	Hetero	61	II	S	N	–	–	<i>C. felis</i>
CH.64	Mar-00	33	F	Negra	–	39	I	S	N	Faleceu	Estadia em Angola	<i>C. parvum</i>
CH.70	Abr-00	7	F	Caucasiana	Vertical	250	IV	S	N	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CH.71	Mai-00	>18	M	Negra	–	–	II	S	N	Melhorou	Regresso de Angola, dois meses antes	<i>C. hominis</i>
CH.72	Mai-00	29	M	–	Tóxico	15	IV	S	N	Faleceu	–	<i>C. parvum</i>
CH.73	Mai-00	35	M	Negra	–	7	II	S	N	–	Regresso da Guiné-Bissau, três meses antes	<i>C. hominis</i>
CH.76	Jun-00	29	F	–	–	–	IV	S (crónica)	N	–	–	<i>C. parvum</i>

[‡] doente seronegativo para VIH; M: masculino, F: feminino; “–”: informação desconhecida; Homo: homossexual; Hetero: heterossexual; Tóxico: toxicodependente; S: sim; N: não

QUADRO XIX – Dados demográficos, clínicos, laboratoriais e epidemiológicos dos doentes com criptosporidiose, cujos isolados foram caracterizados no presente trabalho (continuação)

ISOLADO	DATA	IDADE	SEXO	RAÇA	TRANSMISSÃO VIH	LINFÓCITOS CD4 ⁺ (cél/s/μl)	CARGA PARASITÁRIA	DIARREIA	OUTROS PARASITAS INTESTINAIS	EVOLUÇÃO CLÍNICA	OUTROS	ESPÉCIE
CH.84	Out-00	36	M	–	Homo	20	II	S	<i>Giardia</i> spp. (oito meses de evolução), Microsporidia	Faleceu de criptosporidiose (2001)	–	<i>C. meleagridis</i>
CH.86	Nov-00	34	M	–	Tóxico	19	II	S	N	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CH.87	Dez-00	27	M	Caucasiana	Tóxico	3	II	S	Microsporidia	Faleceu de criptosporidiose	–	<i>C. parvum</i>
CH.88	Jan-01	40	F	Negra	Hetero	22	I	S	N	Melhorou	–	<i>C. felis</i>
CH.96	Mai-01	55	M	Caucasiana	Hetero	16	IV	S	N	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CH.104	Jan-02	24	F	Cigana	Tóxico	17	II	S	N	–	–	<i>C. hominis</i>
CH.105	Jan-02	11	M	Negra	Vertical	<15% (39)	I	N	<i>Giardia</i> spp. (um mês antes), Microsporidia	Melhorou	–	<i>C. hominis</i>
CH.108	Mar-02	58	F	Negra	Hetero	13	IV	S	N	Faleceu	–	<i>C. hominis</i>
CH.113	Mai-02	40	F	Negra	Hetero	6	III	S	N	Melhorou	Residente em Angola	<i>C. hominis</i>
CH.128	Out-02	30	M	Caucasiana	Tóxico	7	IV	S	Microsporidia	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CH.129	Out-02	29	M	Caucasiana	Hetero	23	II	S	Microsporidia	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>
CH.130	Out-02	7	M	Caucasiana	Vertical	19% (213)	I	S	Microsporidia	Melhorou	Contacto com gatos no ambiente doméstico	<i>C. felis</i>
CH.151	Mai-03	40	M	Caucasiana	Tóxico	–	III	S	N	Melhorou	–	<i>C. hominis</i>
CH.170	Nov-03	30	M	Caucasiana	Tóxico	0	IV	S	N	Faleceu	–	<i>C. hominis</i>
CH.176	Jan-04	42	M	Caucasiana	Hetero	37	II	S	Microsporidia	–	–	<i>C. parvum</i>
CH.182	Mai-04	38	M	Caucasiana	Homo	42	IV	S	N	–	–	<i>C. parvum</i>
CH.183	Mai-04	42	M	Caucasiana	Hetero	57	III	S	Microsporidia	–	–	<i>C. parvum</i>
CH.187	Mai-04	52	M	Caucasiana	Hetero	7	I	S	Microsporidia	–	Residente em Angola	<i>C. felis</i>
CH.190	Mai-04	40	M	Negra	Hetero	24	I	S	N	–	–	<i>C. hominis</i>
CH.191	Jun-04	41	M	Negra	Hetero	7	II	S	N	–	–	<i>C. hominis</i>
CH.198	Jul-04	38	M	Caucasiana	Tóxico	20	I	S	N	–	–	<i>C. hominis</i>
CH.201	Nov-04	50	M	Caucasiana	Hetero	125	IV	S	<i>Giardia</i> spp.	–	–	<i>C. parvum</i>
CH.203	Jan-05	>18	M	Negra	Tóxico	50-100	II	S	N	Melhorou	–	<i>C. parvum</i>

M: masculino, F: feminino; “–”: informação desconhecida; Homo: homossexual; Hetero: heterossexual; Tóxico: toxicodependente; S: sim; N: não

Tendo por base todos os casos de criptosporidiose humana identificados por diagnóstico parasitológico, na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, no período compreendido entre Janeiro de 1995 e Janeiro de 2005, foi elaborado o gráfico da figura 12, onde se pode observar a distribuição do número de casos de criptosporidiose em função dos meses do ano. Os resultados representados neste gráfico mostram que, para a totalidade dos anos considerados, os meses de Janeiro e Maio foram aqueles em que se verificou maior número casos de criptosporidiose, seguindo-se-lhe os meses de Junho, Outubro e Novembro; o menor número de infecções foi registado nos meses de Abril e de Setembro. No gráfico da figura 13, é apresentada, para o mesmo período, a distribuição do total mensal de casos de criptosporidiose, em função da espécie causadora da infecção, nos casos em que a sua identificação foi possível. Esta representação gráfica mostra que, para o período considerado, as infecções por *C. hominis* ocorreram ao longo de todo o ano, à excepção dos meses de Fevereiro, Abril e Agosto, tendo apresentado picos em Janeiro e Maio. Por seu lado, os casos de criptosporidiose devidos a *C. parvum* concentraram-se entre os meses de Outubro e Junho, exceptuando o mês de Fevereiro, tendo sido verificados picos nos meses de Janeiro, Maio, Junho, Outubro e Novembro. Nos meses de Fevereiro e de Agosto, apesar de não terem sido observados casos de criptosporidiose devido a *C. hominis* ou a *C. parvum*, foram registadas infecções por *C. meleagridis*.

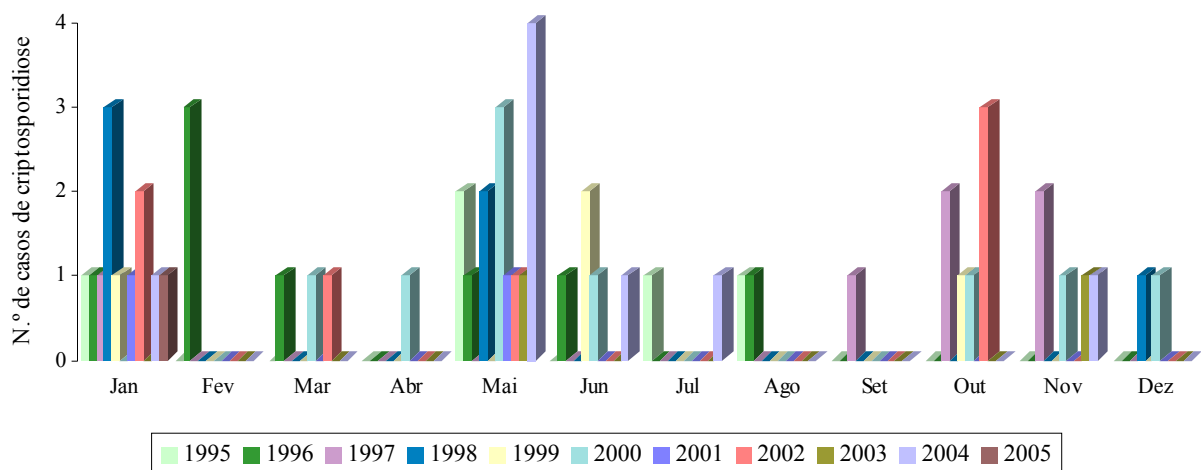


FIGURA 12 – Representação gráfica do número de casos de criptosporidiose, diagnosticados entre Janeiro de 1995 e Janeiro de 2005, em função dos meses do ano

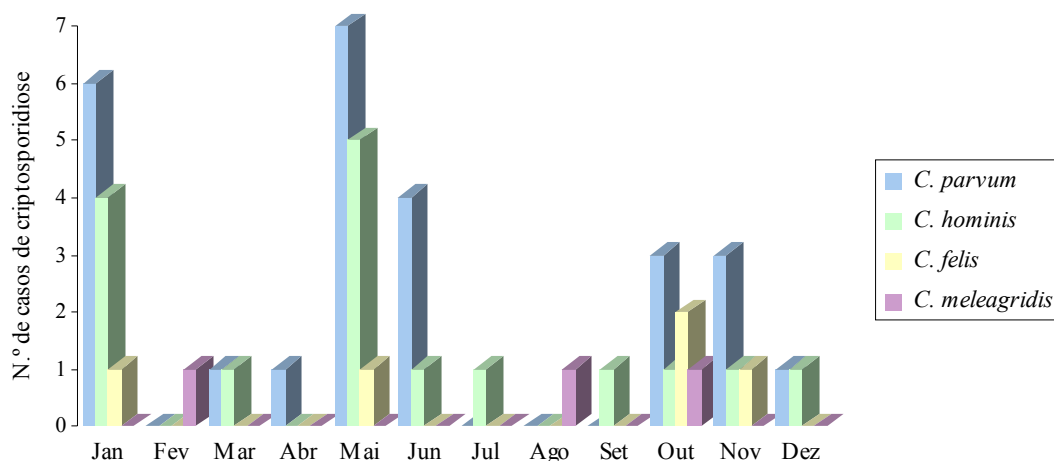


FIGURA 13 – Representação gráfica do total de casos de criptosporidiose, por mês, diagnosticados entre Janeiro de 1995 e Janeiro de 2005, em função da espécie de *Cryptosporidium* spp.

Em virtude do reduzido número de casos anuais de criptosporidiose estudados, não se verificaram as condições necessárias para a realização de qualquer inferência estatística, que permitisse avaliar a eventual variação sazonal da infecção humana pelas diversas espécies de *Cryptosporidium*.

Por fim, encontra-se descrita no quadro XX a dimensão média dos oocistos de cada espécie de *Cryptosporidium* spp., de acordo com os dados obtidos por microscopia óptica.

QUADRO XX – Dimensão dos oocistos pertencentes às espécies de *Cryptosporidium*, identificadas na população humana estudada

ESPÉCIE	DIMENSÃO MÉDIA DOS OOCISTOS (µm)
<i>C. parvum</i>	4,97 × 4,42
<i>C. hominis</i>	4,91 × 4,36
<i>C. felis</i>	4,13 × 3,81
<i>C. meleagridis</i>	4,72 × 4,52

3. DISCUSSÃO

No conjunto dos quatro *loci* estudados (SSU-rRNA, COWP, DHFR e TRAP-C1), foi possível caracterizar, geneticamente, 84,7% dos isolados de *Cryptosporidium* spp. de origem humana (quadro XVI). Esta percentagem é, no entanto, um valor global, que não reflecte as assimetrias observadas, quer entre diferentes grupos de isolados, quer entre os diversos *loci*.

Conforme se observa no quadro XVI, a percentagem de sucesso da PCR, no grupo de parasitas que se encontrava conservado em MIF, foi, no mínimo, duas vezes e meia inferior à observada no grupo dos que foram preservados em dicromato de potássio ou daqueles cuja caracterização molecular foi realizada logo após a sua identificação parasitológica. Esta situação está, com certeza, relacionada com o facto de os oocistos pertencentes ao primeiro grupo terem sido conservados, durante longo tempo, num meio contendo formaldeído (MIF). O formaldeído é um composto orgânico, amplamente utilizado na conservação de tecidos e seus componentes. No entanto, estudos realizados sobre as reacções químicas que ocorrem entre este composto e os ácidos nucleicos, revelaram que o formaldeído não só provoca a degradação das cadeias de DNA, através da formação de ligações cruzadas por pontes de metileno, da formação de nucleótidos apurínicos e apirimidínicos e da cisão da ligação fosfodiéster da cadeia nucleotídica, como inibe a sua reparação [Grafstrom *et al.*, 1983; Douglas e Rogers, 1998; Srinivasan *et al.*, 2002]. Como consequência destas reacções, o DNA extraído de tecidos preservados em formaldeído, encontra-se muito fragmentado e apresenta um peso molecular muito baixo, o que compromete, seriamente, a sua amplificação por PCR [Douglas e Rogers, 1998; Srinivasan *et al.*, 2002]. Gillespie *et al.* (2002), compararam, por PCR, a qualidade do DNA extraído de amostras de tecido humano preservadas em formaldeído e noutro tipo de conservantes, tendo, no último caso, observado maior facilidade de amplificação do DNA do que no primeiro. Resultados idênticos foram obtidos por Douglas e Rogers (1998), que descreveram o insucesso da PCR em amostras de tecidos vegetais tratadas com formaldeído, ao contrário do que aconteceu na amplificação do DNA de amostras idênticas não tratadas.

No que respeita à amplificação dos quatro *loci*, a PCR do *locus* SSU-rRNA foi a que permitiu amplificar o DNA de um maior número de isolados, seguindo-se-lhe, por ordem decrescente, as dos genes COWP, DHFR e TRAP-C1 (quadro XVI). Para os isolados que não se encontravam conservados em MIF, as taxas de amplificação dos genes SSU-rRNA, COWP, DHFR e TRAP-C1, foram de 100% (44/44), 79,5% (35/44), 75% (33/44) e 61,4%

(27/44), respectivamente. Sulaiman *et al.* (1999) compararam os mesmos quatro métodos de PCR, tendo identificado como mais sensíveis os que amplificaram os genes SSU-rRNA e DHFR, seguidos, por ordem decrescente, pelos dos *loci* COWP e TRAP-C1. McLaughlin *et al.* (1999) observaram, para as mesmas PCR's dos genes TRAP-C1 e COWP e para outra, dirigida para o *locus* SSU-rRNA, mas com oligonucleótidos iniciadores diferentes dos utilizados no presente trabalho, sensibilidades de 66% (139/211), 91% (191/211) e 97% (204/211), respectivamente, valores não muito díspares dos obtidos no presente trabalho. Resultados idênticos foram obtidos, ainda, por Pedraza-Díaz *et al.* (2001b), para estes mesmos métodos. A maior sensibilidade, exibida pela amplificação do gene SSU-rRNA, não será alheia à existência, no genoma de *Cryptosporidium* spp., de cinco cópias deste gene contra, apenas, uma dos genes COWP, DHFR e TRAP-C1 [Vásquez *et al.*, 1996; Le Blancq *et al.*, 1997; Spano *et al.*, 1997a, 1998c]. Deste modo, no início da PCR, para um mesmo número de oocistos, o número de cadeias alvo do gene SSU-rRNA disponível é cinco vezes superior ao do presente para os restantes genes, o que se traduz no aumento da sensibilidade da sua amplificação. A sensibilidade da PCR é, também, determinada pelo tipo de reacção de amplificação realizada, na medida em que as PCR's "nested" apresentam, regra geral, maior sensibilidade do que as simples. O método de PCR "nested", para amplificação do gene SSU-rRNA, apresentou sensibilidade superior à dos métodos de PCR simples, responsáveis pela amplificação dos genes COWP e TRAP-C1. Contrariamente ao esperado e aos resultados obtidos nos isolados de bovinos e de ruminantes do Jardim Zoológico de Lisboa (*vide* capítulo VI, quadro XXI), e, ainda, aos descritos por Sulaiman *et al.* (1999), nos isolados humanos, a percentagem de sucesso de amplificação do gene DHFR, por um método de PCR "nested", foi inferior à observada para a PCR simples do gene COWP. Contudo, esta situação pode, em parte, ser explicada, pelo facto da PCR do gene COWP ter amplificado o DNA de alguns parasitas da espécie *C. felis*, o que não sucedeu com a PCR do gene DHFR. O número de criptosporídeos presentes nas amostras fecais constituiu outro dos factores com influência no sucesso dos métodos de PCR, em particular, nos dos genes DHFR e TRAP-C1. Nestes dois *loci*, a percentagem de insucesso da PCR, observada nas amostras fecais com carga parasitária baixa (nível I e II), foi cerca de duas vezes superior (20% e 40%, respectivamente) à da obtida nas fezes com carga parasitária de nível III e IV (10,5% e 21,1%, respectivamente), facto que, contudo, não se verificou na amplificação do *locus* COWP. A influência da carga parasitária fecal, no sucesso da PCR, foi, igualmente, descrita por McLaughlin *et al.* (1999), que

observaram, na amplificação dos genes COWP e TRAP-C1, o aumento da sensibilidade da reacção, proporcional ao número de oocistos presentes nas amostras fecais. O sucesso de cada método de PCR é, também, medido em função da sua capacidade de amplificação do DNA das diferentes espécies de *Cryptosporidium*, o que depende, fundamentalmente, da escolha dos oligonucleótidos iniciadores. Para que o DNA de todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* seja amplificado, é essencial a ausência de polimorfismos do DNA alvo, na região de ligação dos oligonucleótidos iniciadores. No presente trabalho, apenas os métodos de amplificação dos genes SSU-rRNA e COWP permitiram amplificar o DNA das quatro espécies identificadas na população estudada (quadros XVII e XVIII). Porém, no caso do gene COWP, não só a amplificação do DNA de *C. felis* ocorreu em, apenas, 40% (2/5) dos isolados, como o rendimento da reacção foi muito baixo. Jiang e Xiao (2003) compararam diferentes métodos de PCR-RFLP (SSU-rRNA, COWP, DHFR, TRAP-C1, TRAP-C2, HSP70), no sentido de avaliar a sua capacidade de identificar as sete espécies de *Cryptosporidium* infectantes para o Homem, tendo verificado que, apenas, dois métodos, ambos baseados na amplificação de um fragmento do gene SSU-rRNA, permitiam a sua detecção e/ou diferenciação. Xiao *et al.*, (2000b) conseguiram amplificar, com o método de PCR do locus COWP, desenvolvido por Spano *et al.* (1997b), o DNA de *C. felis* o que, no entanto, aconteceu com baixo rendimento e, apenas, em oocistos purificados. Estes autores determinaram a sequência nucleotídica do gene COWP em várias espécies de *Cryptosporidium*, tendo observado grande variabilidade entre sequências de diferentes espécies, em particular, na região de ligação dos oligonucleótidos iniciadores, sendo esta a razão da grande dificuldade da amplificação do gene COWP, em espécies como *C. felis*, *C. canis*, *C. muris* ou *C. andersoni*. Xiao *et al.* (2000b) conseguiram amplificar o gene COWP destas espécies, somente, com DNA isolado a partir de um número superior a 100 oocistos purificados. Tanto o método de amplificação do gene COWP, como o dos genes TRAP-C1 e DHFR, foram desenvolvidos com base na sequência nucleotídica das espécies *C. hominis* e *C. parvum*. Assim, a amplificação do DNA de espécies cuja sequência nucleotídica, na zona de ligação dos oligonucleótidos iniciadores, seja distinta da daquelas espécies, fica comprometida [Morgan *et al.*, 2000a; Xiao *et al.*, 2000b]. Por fim, há, ainda, a referir o caso do gene TRAP-C1, no qual, apesar de se ter verificado a amplificação do DNA dos isolados pertencentes à espécie *C. meleagridis*, a reduzida variabilidade da região amplificada, não possibilitou a distinção entre estes parasitas e os pertencentes à espécie *C. hominis*. Perante o

exposto, a utilidade dos métodos de amplificação dos genes COWP, DHFR e TRAP-C1, na identificação das espécies de *Cryptosporidium* que causam infecção humana e daquelas presentes em amostras ambientais, encontra-se limitada, não só pela baixa sensibilidade da reacção, como, também, pelo facto de não permitirem a amplificação ou a diferenciação do DNA das várias espécies e génotipos deste parasita.

Em todos os isolados pertencentes à espécie *C. felis*, identificados no presente trabalho, a visualização, em gel de agarose, dos fragmentos de restrição do gene SSU-rRNA, obtidos por hidrólise com a endonuclease *VspI*, permitiu identificar a presença dos dois tipos de cópias deste gene. Em três isolados, foi observado o predomínio do perfil de restrição correspondente à cópia A do gene que codifica a SSU-rRNA, enquanto que, noutros dois, o perfil dominante dizia respeito à cópia B daquele gene. Nestes cinco isolados, a diferença de intensidade, observada nos fragmentos de restrição, correspondentes aos dois tipos de cópia do gene SSU-rRNA, sugere a existência de variabilidade na proporção do número de cópias A e B, presentes em cada um (figura 10).

Considerando os doentes com criptosporidiose nos quais foi identificada a espécie responsável pela infecção, 52% (26/50) encontravam-se parasitados por *C. parvum*, 32% (16/50) por *C. hominis*, 10% (5/50) por *C. felis* e 6% (3/50) por *C. meleagridis* (quadro XVII). Estes números põem em evidência o facto de mais de metade dos doentes se encontrarem infectados por *C. parvum*. O predomínio da infecção humana por esta espécie tem, também, sido observado em diversos países do Continente Europeu. Estudos realizados em França, no Reino Unido, na Irlanda do Norte e na Suíça, dão conta de percentagens de infecção humana, devidas a *C. parvum*, de 47,8% (22/46), 61,5% (1.049/1.075), 89,7% (35/39) e 53,8% (7/133), respectivamente, contra valores de 30,4% (14/46), 37,8% (645/1.075), 10,3% (4/39) e 15,4% (2/13), para a infecção por *C. hominis* [McLauchlin *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000a; Guyot *et al.*, 2001; Lowery *et al.*, 2002]. Pelo contrário, noutros Continentes, observa-se maior número de infecções devidas a *C. hominis*. Em dois estudos epidemiológicos, realizados no Peru, um em crianças e outro em adultos infectados por VIH, as percentagens de infecção por *C. hominis* foram de 78,8% (67/85) e 66,9% (204/302), respectivamente, contra valores de 9,4% (8/85) e 11,2% (34/302) para a infecção por *C. parvum* [Xiao *et al.*, 2001a; Cama *et al.*, 2003]. Nos Estados Unidos da América, a caracterização molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp., identificados em casos esporádicos e em surtos, revelou percentagens de infecção por *C. hominis* e *C. parvum* de 79,5% (35/44) e

20,5% (9/44), respectivamente [Sulaiman *et al.*, 1998]. No Malawi, no Uganda e na Tailândia, a percentagem de casos de criptosporidiose humana, atribuída à espécie *C. hominis*, foi de 95,3% (41/43), 73,4% (326/444) e 50% (17/34), respectivamente, enquanto que, para a infecção por *C. parvum*, foi de 4,6% (2/43), 19,1% (85/444) e 14,7% (5/34) [Gatei *et al.*, 2002b; Peng *et al.*, 2003a; Tumwine *et al.*, 2003]. No que respeita à infecção pelas espécies *C. felis* e *C. meleagridis*, as percentagens de infecção, encontradas na população portuguesa estudada, de 10% (5/50) e de 6% (3/50), respectivamente, são idênticas às de 13% (6/46) e de 6,5% (3/46) encontradas, em França, por Guyot *et al.* (2001), para as mesmas espécies. No Reino Unido, McLauchlin *et al.* (2000) encontraram uma percentagem de casos de criptosporidiose humana devidos a *C. meleagridis* de 0,46% (5/1705). Num estudo realizado, em crianças, no Uganda, a percentagem de infecção por *C. meleagridis*, registada por Tumwine *et al.* (2003), foi de 1,1% (5/444). Nas investigações realizadas nestes dois últimos países, não foram identificadas infecções devidas a *C. felis*. No entanto, a caracterização genética dos isolados foi efectuada pela técnica de PCR-RFLP, aplicada ao gene COWP, que, como já foi referido, não permite a detecção do DNA de todos os parasitas pertencentes a esta espécie. Contrariamente ao observado nos estudos acima descritos, noutros países, o número de casos de infecção por *C. meleagridis* foi mais elevado. No Peru, em doentes infectados por VIH, as percentagens de criptosporidiose, devidas a *C. meleagridis* e a *C. felis*, foram de 12,6% (38/302) e 3,3% (10/302), respectivamente [Cama *et al.*, 2003]. Na Tailândia, numa população semelhante, os valores encontrados, para estas duas espécies, foram de 20,6% (7/34) e 8,8% (3/34), respectivamente [Gatei *et al.*, 2002b]. Para além das quatro espécies já referidas, diversos autores descreveram, ainda, infecções humanas causadas pelas espécies *C. muris*, *C. canis* e *C. suis* e por *Cryptosporidium* genótipo cervo [Pieniazek *et al.*, 1999; Guyot *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001a; Gatei *et al.*, 2002a; Ong *et al.*, 2002; Cama *et al.*, 2003; Gatei *et al.*, 2003]. Estas espécies e genótipo não foram, porém, encontradas na população portuguesa estudada. O significado epidemiológico da diferente distribuição das várias espécies de *Cryptosporidium* responsáveis pela infecção humana, em diversas zonas geográficas, é, ainda, desconhecido, embora se pense que possa estar relacionado com a existência de variadas fontes de infecção e/ou ser o reflexo de diferenças na contribuição de cada modo de transmissão, para a epidemiologia da criptosporidiose, numa dada região. A ocorrência, nos países europeus, de um maior número de infecções por *C. parvum*, leva a supor a existência, não só de um elevado reservatório zoonótico desta espécie, como de um predomínio da transmissão zoonótica, sobre a

antroponótica [Xiao *et al.*, 2000c; Thompson, 2003]. Estudos epidemiológicos, conduzidos no Reino Unido, mostraram que os casos esporádicos, devidos a *C. parvum*, se encontram associados, sobretudo, ao contacto com gado doméstico e ao consumo de água da rede de abastecimento não fervida, enquanto que os devidos a *C. hominis* são mais frequentes em indivíduos que viajaram para fora do País ou que estiveram em contacto directo com pessoas parasitadas [McLauchlin *et al.*, 2000; Pedraza-Díaz *et al.*, 2001b; Goh *et al.*, 2004]. Num estudo caso-controlo, sobre a criptosporidiose esporádica em Inglaterra e no País de Gales, Hunter *et al.* (2004) encontraram uma associação, estatisticamente significativa, entre a infecção por *C. hominis* e a deslocação recente ao estrangeiro ou o proceder à muda de fraldas em crianças com idade inferior a cinco anos. Os mesmos autores encontraram, ainda, o mesmo tipo de associação, entre a infecção por *C. parvum* e o contacto com gado doméstico. O facto de as medidas adoptadas, no Reino Unido, para o controlo da epidemia de febre aftosa, em 2001, terem tido como consequência um decréscimo do número de casos de criptosporidiose humana por *C. parvum*, sustenta a hipótese da importância da transmissão zoonótica naquele País [Smerdon *et al.*, 2003; Xiao e Ryan, 2004]. Num estudo realizado na Suíça, em crianças com diarreia, Glaeser *et al.* (2004) observaram que a infecção por *C. hominis* era responsável por 90% (9/10) dos casos de criptosporidiose associados a viagens para fora do País. Os dados epidemiológicos recolhidos, ao longo do presente trabalho, não foram suficientes para permitir a associação entre a infecção por determinada espécie de *Cryptosporidium* spp. e os factores de risco que se sabe poderem favorecer a sua transmissão. A informação sobre a permanência no estrangeiro, nos meses que antecederam o diagnóstico, apenas foi disponibilizada para cinco doentes. Destes, três infectados por *C. hominis*, um por *C. parvum* e outro por *C. felis*, quatro haviam regressado de Angola (dois deles eram residentes neste País) e um da Guiné-Bissau (quadro XIX). Nos dois doentes, que se sabia residirem em Angola, a criptosporidiose não pode, contudo, ser considerada como infecção do viajante. Quanto aos restantes três doentes, todos eles africanos, desconhece-se se teriam residência em Angola e na Guiné-Bissau ou se a chegada a Portugal se terá verificado na sequência da deslocação àqueles países. No que se refere ao contacto com gado doméstico ou com animais de companhia, apenas foi conseguida a informação de que um dos doentes, com infecção por *C. felis*, tinha contacto com gatos, no seu ambiente doméstico. Contudo, não foi possível realizar um exame parasitológico às fezes desses animais, para averiguar se estariam a excretar oocistos.

A variação sazonal, do número de casos de criptosporidiose humana encontra-se bem descrita em países, como os EUA ou o Reino Unido. Nos EUA, verifica-se que o número de casos de criptosporidiose notificados regista um aumento entre os meses de Junho e Outubro, o que os epidemiologistas associam à prática de actividades ao ar livre, particularmente à utilização de água de recreio (rios, lagos, piscinas) [Dietz *et al.*, 2000; Hlavsa *et al.*, 2005]. No Reino Unido, McLauchlin *et al.* (2000) e Pedraza-Díaz *et al.* (2001b), observaram a existência de dois picos de ocorrência da criptosporidiose, um durante a Primavera, que se encontra associado à infecção por *C. parvum*, devido ao aumento dos casos de criptosporidiose no gado doméstico na época do parto e, outro, no fim do Verão e início do Outono, associado à infecção por *C. hominis* e a deslocações para fora do País. No que respeita ao presente trabalho, a observação das figuras 12 e 13 revela a existência de picos do número de casos de criptosporidiose, sobretudo, nos meses de Janeiro e Maio, mas, também, nos de Junho, Outubro e Novembro. Enquanto que as infecções devidas a *C. hominis* foram registadas em todas as estações do ano, o mesmo não se verificou com as causadas por *C. parvum*, que não foram observadas durante os meses de Verão (entre Julho e Setembro). Ainda, enquanto que a criptosporidiose por *C. hominis* evidencia uma transmissão mais ou menos constante, destacando-se, somente, dois picos de infecção, um em Janeiro e outro em Maio, os casos devidos a *C. parvum* parecem registar maior número anual de picos de infecção (Janeiro, Maio, Junho, Outubro e Novembro). Dado que o número de casos anuais de criptosporidiose estudado foi muito reduzido, desconhece-se se estas observações constituem, ou não, o reflexo da realidade epidemiológica do nosso País. Para além disso, também não dispomos de dados epidemiológicos suficientes que nos permitam interpretar e fundamentar as variações na distribuição temporal dos casos de criptosporidiose, acima descritas.

A análise dos resultados da identificação das espécies de *Cryptosporidium*, em função da carga parasitária excretada pelos doentes, mostrou que todos aqueles com infecção por *C. felis* ou *C. meleagridis* exibiam cargas parasitárias de nível I ou II, enquanto que os doentes que excretavam maior número de oocistos (nível III ou IV) se encontravam parasitados por *C. hominis* ou por *C. parvum* (quadro XIX). A comparação dos casos de infecção devidos a estas duas últimas espécies revelou, ainda, que a percentagem de infectados por *C. hominis* e com elevada carga parasitária (nível III ou IV) – 50% (8/16) – foi ligeiramente superior à dos parasitados por *C. parvum* – 46,2% (12/26). No Reino Unido, McLauchlin *et al.* (1999) verificaram que 52,7% (39/74) dos infectados por *C. hominis* exibiam carga parasitária

elevada, contra, apenas, 36,7% (44/120) dos parasitados por *C. parvum*. Também no Peru, Xiao *et al.*, (2001a) observaram que o número de oocistos, presentes nas fezes de crianças infectadas por *C. hominis*, era superior ao daquelas que se encontravam parasitadas por *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* ou *C. canis*. Os mesmos autores descreveram, ainda, que a duração do período de excreção de oocistos foi, significativamente, superior no caso das infecções causadas por *C. hominis*. As espécies *C. felis* e *C. meleagridis*, apesar de responsáveis por um número de infecções humanas inferior ao originado por *C. hominis* e *C. parvum*, e de provocarem cargas parasitárias mais baixas são, todavia, capazes de causar infecção sintomática no hospedeiro humano. Conforme se verifica pelo descrito no quadro XIX, todos os infectados por *C. felis* e por *C. meleagridis* apresentavam diarreia e, alguns, diarreia crónica. Para além disso, a espécie *C. meleagridis* foi identificada em dois dos três doentes que faleceram de criptosporidiose [Matos *et al.*, 2004].

A determinação da dimensão dos oocistos de cada espécie de *Cryptosporidium* spp., efectuada pela sua observação em microscopia óptica, revelou valores idênticos aos descritos por outros autores, para as mesmas espécies [Fayer *et al.*, 2000; Egyed *et al.*, 2002; Fall *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004a]. Estes resultados colocam em evidência o facto da semelhança morfométrica, observada entre os oocistos das diferentes espécies de *Cryptosporidium*, não permitir a sua diferenciação por microscopia óptica e demonstram a necessidade da utilização de técnicas de biologia molecular para a sua identificação.

Os resultados da caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium* spp., responsáveis pela criptosporidiose na população humana estudada, apontam para a existência de infecções com espécies potencialmente zoonóticas. Assim, se existirem reservatórios zoonóticos destas espécies e condições epidemiológicas favoráveis, podem criar-se condições para a sua transmissão zoonótica ao Homem, quer directa, quer indirectamente, através da água ou de alimentos contaminados. No entanto, a possibilidade da transmissão de espécies zoonóticas se processar pela via antropónótica, sobretudo em meio urbano, não pode ser esquecida. O desconhecimento da epidemiologia da criptosporidiose, não só em Portugal, como noutras zonas geográficas, sublinha a necessidade de se realizarem investigações epidemiológicas mais abrangentes e aprofundadas que, à semelhança do que acontece, por exemplo, no Reino Unido, permitam compreender a importância dos diversos modos de transmissão em cada região.

Capítulo VI



CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS ANIMAIS DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

1. INTRODUÇÃO

O número de espécies animais susceptíveis à infecção por organismos do género *Cryptosporidium* ascende a mais de 240, entre mamíferos, répteis e aves [O'Donoghue, 1995; Fayer *et al.*, 1997; Fayer, 2004]. Todavia, a maioria das infecções, provocadas por estes parasitas, tem sido descrita em gado doméstico de importância económica (bovino, ovino e caprino) e em alguns animais silváticos (Cervídeos e pequenos mamíferos). Enquanto que o gado doméstico se encontra associado a diversas actividades humanas, os pequenos mamíferos (roedores e insectívoros) são ubíquos, tanto em meio urbano, como em meio rural. Os Cervídeos são animais que habitam parques naturais e florestas, locais de lazer, habitualmente, frequentados por crianças e adultos. Desde que ocorra partilha de habitats e susceptibilidade às mesmas espécies de *Cryptosporidium*, não só os animais silváticos podem constituir possíveis reservatórios de *Cryptosporidium* spp. para o gado doméstico, como estes últimos podem ser fonte destes parasitas para os primeiros [Sturdee *et al.*, 1999; Perz e Le Blancq, 2001; Fayer, 2004; Olson *et al.*, 2004]. Estudos recentes mostraram que isolados de *C. parvum* de vitelos e de ratos das margens (*Clethrionomys glareolus*), naturalmente infectados, foram capazes de produzir infecção, em laboratório, em ratos do campo (*Microtus arvalis*) [Donskow *et al.*, 2005]. Estes autores pretenderam demonstrar a possibilidade da transmissão natural de *C. parvum*, entre bovinos e roedores, em situações de partilha do habitat. A criptosporidiose em gado doméstico e em animais silváticos, pode constituir risco para a saúde pública, uma vez que existe a possibilidade de transmissão da infecção ao Homem, não só por contacto directo, mas, também, por contaminação do ambiente, dos recursos hídricos e de alimentos [Fayer, 2004; Olson *et al.*, 2004]. Para além da possibilidade do gado doméstico e de alguns animais silváticos poderem constituir fontes de infecção para o Homem, a hipótese de o mesmo poder acontecer com os animais de companhia, nomeadamente cães e gatos, não se encontra, ainda, excluída [Juraneck, 1995; Glaser *et al.*, 1998].

Em muitos dos casos de criptosporidiose que se encontram documentados, tanto em gado doméstico, como em animais silváticos, a causa da infecção tem sido atribuída à espécie *C. parvum*, com base, unicamente, nas características morfométricas dos oocistos [Chalmers *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 1997a; Sturdee *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2000; Bajer *et al.*, 2002; Castro-Hermida *et al.*, 2002; Causapé *et al.*, 2002; Sturdee *et al.*, 2003; Dall'Olio *et al.*, 2004]. Nestes casos, dada a ausência de

informação molecular sobre os isolados, desconhece-se quantos deles pertencem, realmente, a *C. parvum* [Fayer, 2004].

Sendo *C. parvum*, a espécie responsável por cerca de metade das infecções humanas em Portugal e, tendo em conta, também, aquelas causadas pelas espécies *C. felis* e *C. meleagridis* [Alves *et al.*, 2001b, 2003b; Matos *et al.*, 2004], é essencial que sejam identificadas as espécies responsáveis pela infecção nos animais que se encontram em maior proximidade com o Homem, para que se possa conhecer o seu potencial zoonótico e o risco que constituem, para a saúde pública.

2. RESULTADOS

No conjunto dos quatro *loci* genéticos estudados (SSU-rRNA, COWP, DHFR e TRAP-C1), foi possível amplificar, por PCR, o DNA genómico de 98 dos 140 isolados de *Cryptosporidium* spp. de origem animal que foram identificados, por diagnóstico parasitológico, quer no decorrer do presente trabalho, quer em estudos epidemiológicos anteriores (*vide* capítulos II e IV). No quadro XXI, encontram-se descritos os resultados da amplificação, por PCR, do DNA de todos os isolados animais, para cada um dos quatro genes em estudo.

A PCR do gene SSU-rRNA, foi a que permitiu amplificar o DNA de um maior número de isolados (70%), seguindo-se-lhe, por ordem decrescente, as reacções de amplificação dos *loci* DHFR (43,6%), COWP (32,1%) e TRAP-C1 (16,4%). O método de PCR do *locus* SSU-rRNA amplificou o DNA dos isolados pertencentes a todos os grupos de hospedeiros, enquanto que, os dos restantes três *loci*, amplificaram, somente, o DNA dos isolados de gado bovino e ovino e dos Bovídeos do Jardim Zoológico estudados em 1996 e em 1998-1999. Sempre que a amplificação dos genes COWP, DHFR e/ou TRAP-C1 foi positiva, o mesmo aconteceu, também, com a amplificação do gene SSU-rRNA.

A amplificação do DNA dos isolados pertencentes aos gamos da Tapada Nacional de Mafra foi a que registou maior percentagem de insucesso (75% – 9/12). A carga parasitária observada nas fezes destes animais era muito baixa (nível I). No gado bovino, 87,5% (28/32), 77,2% (44/57), 76,1% (54/71) e 72,7% (64/88), respectivamente, dos casos de insucesso nas PCR's dos genes SSU-rRNA, DHFR, COWP e TRAP-C1 correspondiam a amostras fecais

com carga parasitária baixa (nível I ou II). Entre os Bovídeos do Jardim Zoológico de Lisboa, estudados em 1996 e em 1998-1999, apenas o DNA de um isolado detectado num elande não foi amplificado por nenhum dos quatro métodos de PCR. Neste animal, o número de oocistos presentes nas fezes era muito baixo (nível I). Quanto aos restantes isolados encontrados neste grupo de animais, 50% daqueles cujo DNA não foi amplificado pela PCR dos genes DHFR (2/4) e COWP (3/6) pertenciam a amostras fecais com carga parasitária de nível II, tendo o mesmo acontecido em 66,7% (6/9) dos isolados em que não ocorreu amplificação do gene TRAP-C1.

QUADRO XXI – Resultados da amplificação, por PCR, do DNA dos isolados de *Cryptosporidium* spp. de origem animal

HOSPEDEIROS (n.º estudado)	N.º DE ISOLADOS COM AMPLIFICAÇÃO POSITIVA				TOTAL AMPLIFICADO
	SSU-rRNA	DHFR	COWP	TRAP-C1	
Gatos (n = 2)	2 (100%)	0	0	0	2 (100%)
Bovinos (n = 110)	78 (70,9%)	53 (48,2%)	39 (35,5%)	22 (20,0%)	78 (70,9%)
Ovinos (n = 2)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	0	2 (100%)
Gamos (n = 12)	3 (25,0%)	0	0	0	3 (25,0%)
Bovídeos Zoo (1996, 1998–1999) (n = 11)	10 (90,9%)	6 (54,5%)	4 (36,4%)	1 (9,1%)	10 (90,9%)
Bovídeos Zoo (presente estudo) (n = 2)	2 (100%)	0	0	0	2 (100%)
Répteis Zoo (n = 1)	1 (100%)	0	0	0	1 (100%)
Total (n = 140)	98 (70,0%)	61 (43,6%)	45 (32,1%)	23 (16,4%)	98 (70,0%)

A análise dos perfis de restrição, obtidos por hidrólise dos produtos de PCR com determinadas endonucleases, permitiu, por comparação com os descritos na literatura, identificar algumas das espécies dos isolados em estudo (figuras 14 a 16).

Nos isolados detectados nos dois gatos, a hidrólise do fragmento do gene SSU-rRNA, com as endonucleases *SspI* e *VspI*, mostrou ser *C. felis* a espécie responsável pela infecção naqueles animais. Ambos os isolados exibiam um predomínio da cópia A do gene SSU-rRNA (figura 14).

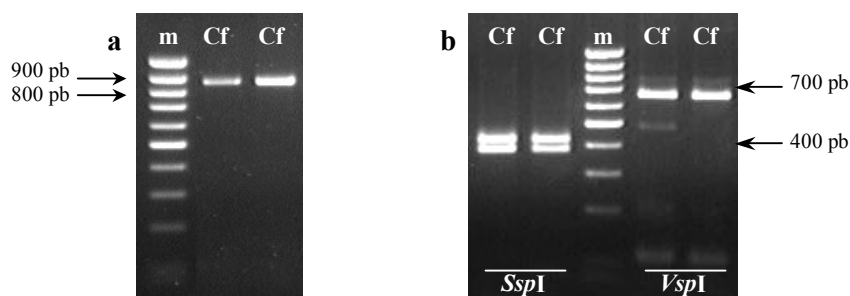


FIGURA 14 – Fotografias de géis de agarose, após electroforese (a) dos produtos de amplificação do gene SSU-rRNA e (b) dos respectivos fragmentos de restrição, pelas endonucleases *SspI* e *VspI*, dos isolados detectados em gatos. Cf – *C. felis*, m – marcador de pesos moleculares (“100 bp ladder”)

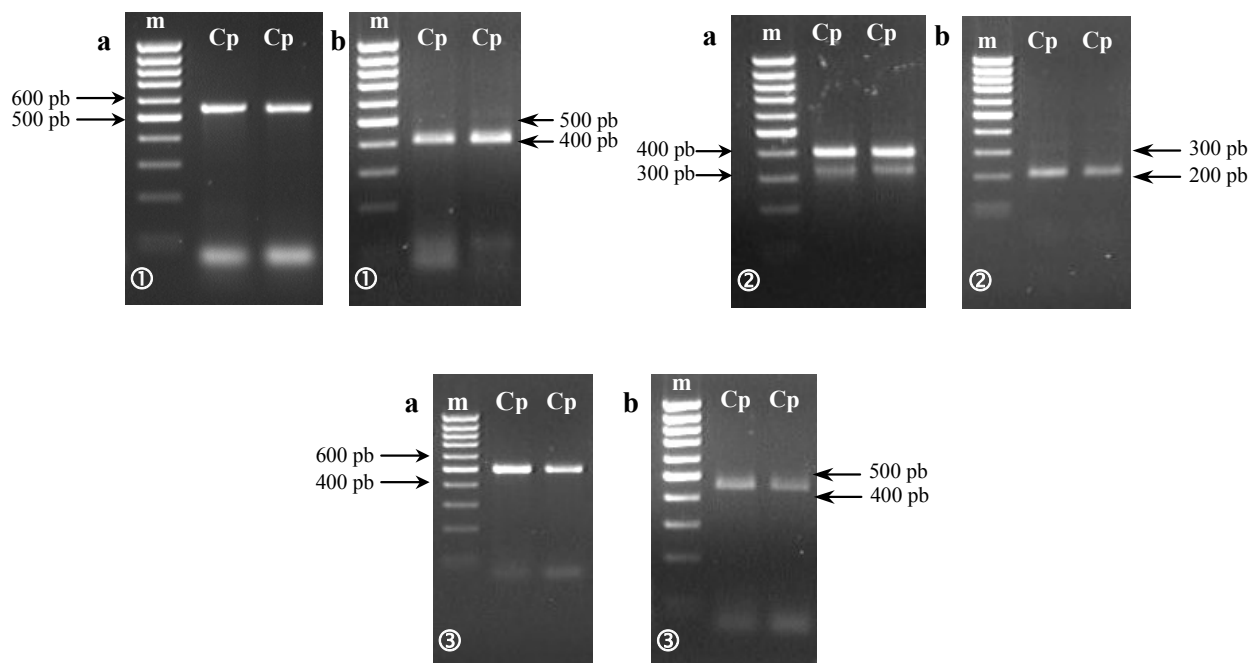


FIGURA 15 – Fotografias de géis de agarose, após electroforese (a) dos produtos de PCR e (b) dos respectivos fragmentos de restrição, para os genes COWP (①), DHFR (②) e TRAP-C1 (③). Cp – *C. parvum*, m – marcador de pesos moleculares (“100 bp ladder”)

Todos os criptosporídeos de ruminantes (gado bovino e ovino, gamos e Bovídeos do Jardim Zoológico, estudados retrospectivamente) com amplificação positiva para os genes COWP, DHFR e TRAP-C1 foram, após análise de RFLP dos respectivos produtos de PCR, identificados como pertencendo à espécie *C. parvum* (figura 15). A hidrólise do fragmento do gene SSU-rRNA amplificado, com as endonucleases *SspI* e *VspI*, permitiu identificar a espécie *C. parvum* em todos os isolados de ovinos, dos gamos e dos Bovídeos do Jardim Zoológico (estudados em 1996 e em 1998-1999). Nos isolados de bovinos, foram identificadas, por RFLP, as espécies *C. parvum* e *C. andersoni* (figura 16). Ainda, neste último grupo de parasitas, a sequenciação do fragmento SSU-rRNA amplificado permitiu identificar, também, a espécie *C. bovis* (GenBank AF120911) e o genótipo semelhante ao do gamo (do inglês, “deer-like”) (GenBank AY587166). Os resultados da sequenciação permitiram, ainda, confirmar a identificação de *C. parvum* (GenBank AF093490) e de *C. andersoni* (GenBank AF093496), feita por RFLP. Conforme se observa na figura 16, os perfis de restrição de *C. parvum*, *C. bovis* e *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo são, praticamente, indistinguíveis. Apenas nos isolados de *C. parvum* se verificou a amplificação do DNA dos quatro genes estudados. Os resultados da identificação desta espécie, obtidos por PCR, RFLP e/ou sequenciação dos fragmentos amplificados, foram concordantes para os quatro *loci* genéticos em estudo.

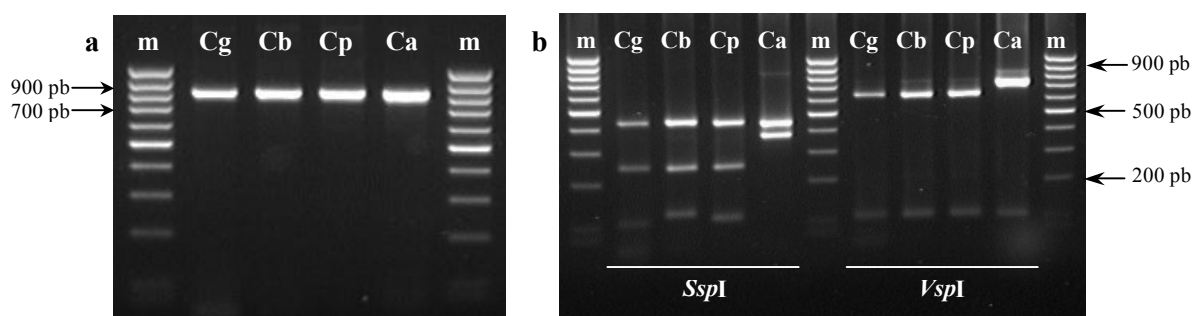


FIGURA 16 – Fotografias de géis de agarose após electroforese (a) dos produtos de amplificação do gene SSU-rRNA e (b) dos respectivos fragmentos de restrição pelas endonucleases *SspI* e *VspI* de isolados de bovinos. Cg – *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo, Cb – *C. bovis*, Cp – *C. parvum*, Ca – *C. andersoni*, m – marcador de pesos moleculares (“100 bp ladder”)

No quadro XXII, encontram-se descritas as dimensões dos fragmentos de restrição, que se obtêm por RFLP, em cada *locus* caracterizado, para cada espécie ou genótipo identificado nos isolados de origem animal.

QUADRO XXII – Dimensão dos fragmentos de restrição obtidos para as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* identificadas em animais

GENE / ENZIMA DE RESTRIÇÃO	DIMENSÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (pb)				
	<i>C. felis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. andersoni</i>	<i>C. bovis</i>	Genótipo “deer-like”
SSU-rRNA / <i>SspI</i>	426, 391, 33, 14 ^a	449, 254, 108, 12, 11	448, 384	449, 254, 119, 9	432, 250, 103, 33
SSU-rRNA / <i>VspI</i>	658, 104, 102 ^a	628, 104, 102	730, 102	625, 104, 102	616, 104, 98
COWP / <i>RsaI</i>	a.a.	413, 106, 34	a.a.	a.a.	a.a.
DHFR / <i>BpuA1</i>	a.a.	210, 198	a.a.	a.a.	a.a.
TRAP-C1 / <i>RsaI</i>	a.a.	455, 51	a.a.	a.a.	a.a.

^a – cópia A do gene SSU-rRNA; a.a. – ausência de amplificação

No que respeita aos isolados dos três animais do Jardim Zoológico, encontrados parasitados no presente trabalho, a intensidade do fragmento do gene SSU-rRNA amplificado, observada em gel de agarose, foi muito reduzida, pelo que não se realizou a análise de RFLP e se procedeu, apenas, à sua sequenciação. A comparação da sequência nucleotídica daquele fragmento, com as depositadas no GenBank, permitiu identificar os isolados pertencentes à tartaruga estrela indiana e ao bisonte americano como *Cryptosporidium* genótipo tartaruga (AY120914) e *Cryptosporidium* genótipo rato (AF112571), respectivamente. A sequência nucleotídica do fragmento do gene SSU-rRNA do parasita detectado no gnu de cauda branca, apresentava diferenças significativas relativamente às de outros isolados animais existentes no GenBank tendo, por isso, sido considerada como um novo genótipo de *Cryptosporidium* spp. em animais. Esta sequência foi depositada no GenBank, com o número de acesso AY883022 [Alves *et al.*, 2005]. A árvore filogenética, apresentada na figura 17, mostra que este novo genótipo se encontra agrupado com outras espécies (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. wairi*, *C. suis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* e *C. saurophilum*) e genótipos (coelho, cavalo, furão, rato, toirão americano, cervo, gamo-rato, raposa, esquilo, gambá I e II, urso e rato-almiscareiro I e II) de parasitas intestinais, com um valor de confiança de 87%, determinado por análise de “bootstrap”.

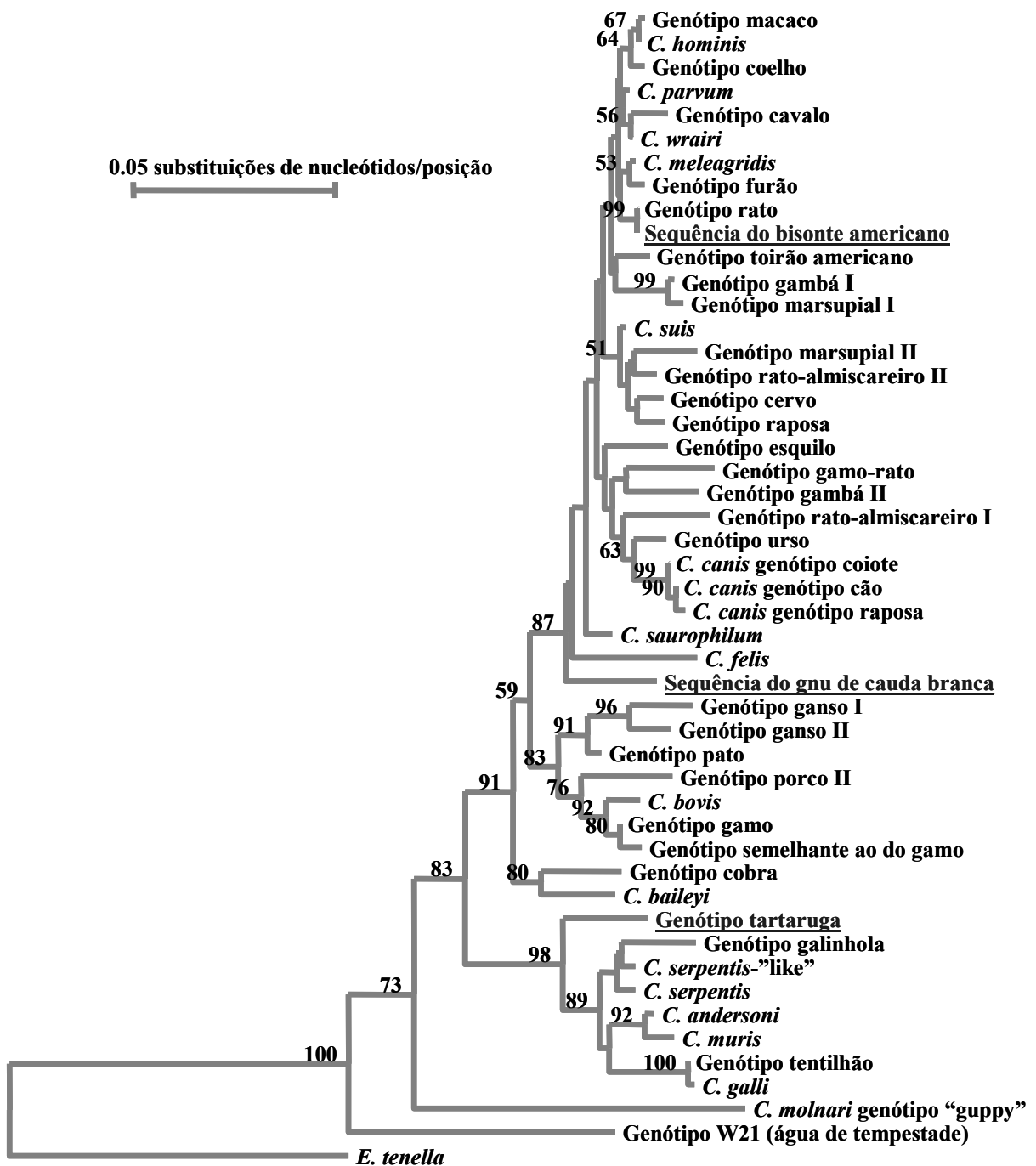


Figura 17 – Relação filogenética entre os genótipos identificados nos animais do Jardim Zoológico de Lisboa e outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, inferida pela análise de sequências do gene SSU-rRNA através do método “neighbor joining”, tendo por base distâncias genéticas calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. A árvore foi construída utilizando como grupo externo a sequência AF026388 de *Eimeria tenella*. Os números sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1.000 réplicas

O novo genótipo, encontrado no presente trabalho, apresenta elevada semelhança com o genótipo W5 (GenBank AY737594), descrito por Jiang *et al.* (2005), numa amostra de água de tempestade, recolhida numa região de floresta, no Estado de Nova Iorque, nos EUA. A diferença entre a sequência do novo genótipo, encontrado no gnu de cauda branca, e a do genótipo W5 reside na substituição de uma guanina por uma adenina.

No quadro XXIII, encontram-se resumidos os resultados da caracterização molecular de todos os isolados de origem animal estudados.

QUADRO XXIII – Espécies e genótipos identificados nos isolados de *Cryptosporidium* spp. de origem animal

HOSPEDEIROS	N.º DE ISOLADOS					
	<i>C. felis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. andersoni</i>	<i>C. bovis</i>	Genótipo “deer-like”	Outro genótipo
Gatos	2	0	0	0	0	0
Bovinos	0	73	2	2	1	0
Ovinos	0	2	0	0	0	0
Gamos	0	3	0	0	0	0
Bovídeos Zoo (1996, 1998–1999)	0	10	0	0	0	0
Bisonte americano	0	0	0	0	0	rato
Gnu de cauda branca	0	0	0	0	0	novo
Tartaruga estrela indiana	0	0	0	0	0	tartaruga

O vitelo que se encontrava parasitado com *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo (“deer-like”) tinha 29 dias de vida. Entre os animais infectados por *C. bovis*, um tinha 30 dias de vida, desconhecendo-se a idade do outro vitelo. Um dos vitelos parasitados por *C. andersoni* tinha quatro meses, sendo desconhecida a idade do outro animal infectado por esta espécie. Entre os bovinos, com infecção por *C. parvum* e idade conhecida, 97,9% (46/47) tinham menos de 38 dias de vida e 2,1% (1/47) tinham 80 dias. Desconhece-se a idade de 26 dos bovinos, parasitados por *C. parvum*.

Do grupo de cinco bovinos infectados por parasitas que não pertencem à espécie *C. parvum*, um dos parasitados por *C. bovis* pertencia a uma exploração leiteira, em São Miguel, nos Açores, enquanto que os restantes quatro eram provenientes de explorações do Concelho de Montemor-o-Novo.

A dimensão média dos oocistos pertencentes às espécies e genótipos, identificados nos animais estudados, encontra-se descrita no quadro XXIV.

QUADRO XXIV – Dimensão dos oocistos, pertencentes às espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, identificados na população animal estudada

ESPÉCIE OU GENÓTIPO	DIMENSÃO MÉDIA DOS OOCISTOS (µm)
<i>C. parvum</i>	5,08 × 4,34
<i>C. andersoni</i>	6,25 × 5,29
<i>C. bovis</i>	4,97 × 4,41
Genótipo semelhante ao do gamo	5,04 × 4,38
<i>C. felis</i>	4,15 × 3,78
Genótipo rato	4,82 × 4,35
Genótipo novo (gnu de cauda branca)	4,89 × 4,45
Genótipo tartaruga	4,93 × 4,51

3. DISCUSSÃO

A caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium* spp. de origem animal, permitiu identificar a espécie de 70% (98/140) dos parasitas em estudo. Nos restantes 30% (42/140), tal não foi possível, devido ao insucesso da PCR na amplificação do DNA genómico dos parasitas (quadro XXI). De modo semelhante ao registado nos isolados humanos, também nos de origem animal, as PCR's que exibiram maior e menor percentagem de amplificação foram, respectivamente, as do *loci* SSU-rRNA (70%) e TRAP-C1 (16,4%). No entanto, ao invés do sucedido nos parasitas humanos, o número de isolados animais com amplificação positiva para o gene COWP (32,1%) foi inferior ao daqueles em que se verificou a amplificação do gene DHFR (43,6%). Estes resultados encontram-se de acordo com o esperado, uma vez que, sendo ambos genes de cópia única, a PCR “nested” do gene DHFR deverá apresentar sensibilidade superior à da PCR simples do gene COWP. Em cada um dos quatro *loci* genéticos estudados, a percentagem de amplificação do DNA, observada nos parasitas animais (quadro XXI), foi inferior à registada nos de origem humana (*vide* capítulo V, quadro XVI).

As diferenças verificadas entre a amplificação do *locus* SSU-rRNA e a dos restantes três genes podem encontrar justificação nos seguintes factos, já desenvolvidos no capítulo anterior: i) no genoma de *Cryptosporidium* spp. existem cinco cópias do gene SSU-rRNA e, apenas, uma dos genes COWP, DHFR e TRAP-C1, o que diminui a sensibilidade da amplificação destes três últimos, sobretudo, em situações de carga parasitária baixa; ii) a amplificação do *locus* SSU-rRNA foi realizada através de um método de PCR “nested”, tendo o mesmo acontecido com a PCR do gene DHFR, mas não com as dos genes COWP e TRAP-C1, o que justifica a maior sensibilidade observada nas duas primeiras reacções; iii) as reacções de PCR dos *loci* COWP, DHFR e TRAP-C1 amplificam, essencialmente, o DNA de *C. parvum* e de *C. hominis*, mas não o de *C. felis*, *C. andersoni*, *C. bovis* ou dos genótipos semelhante ao do gamo, rato, tartaruga e o identificado no gnu de cauda branca.

O baixo número de parasitas presente nas fezes dos animais estudados pode ser apontado como possível causa do insucesso da PCR que, em maior ou menor grau, se verificou em todos os *loci*. De facto, a maioria das amostras onde não ocorreu amplificação do DNA, apresentava carga parasitária baixa. Este factor parece ter sido mais acentuado nas amostras dos gamos da Tapada Nacional de Mafra, cujo número de oocistos nas fezes era muito reduzido e onde se observou uma percentagem de amplificação de, apenas, 25% (quadro XXI). Para além da carga parasitária, a presença de compostos de origem fecal, inibidores da PCR, pode, também, ter tido um papel determinante no insucesso daquela reacção, nos isolados de ruminantes domésticos e silváticos. Segundo Wilson (1997), a acção inibidora destes compostos sobre a PCR, pode resultar do sequestro ou da degradação do DNA, tornando-o, assim, indisponível para a amplificação, ou da inibição da actividade da enzima polimerase do DNA. Entre os inibidores da PCR mais comuns, encontram-se componentes de fluidos corporais, normalmente, encontrados em amostras clínicas e forenses (hemoglobina, sais biliares, ureia e heparina), constituintes de origem alimentar (compostos orgânicos e fenólicos, lípidos, glicogénio, polissacáridos e ião cálcio) e compostos de origem ambiental (ácidos húmicos, metais pesados e compostos fenólicos) [Monteiro *et al.*, 1997; Wilson, 1997]. As amostras fecais, sendo um material biológico de composição complexa, colocam, com frequência, algumas dificuldades à realização da PCR [Widjoatmodjo *et al.*, 1992; Monteiro *et al.*, 1997]. No caso particular das fezes dos ruminantes, não só a presença de determinados compostos inibidores da PCR é elevada (ácido fítico e polissacáridos), como a sua acção inibidora é muito acentuada [Thornton e Passen, 2004]. O ácido fítico ou fitato é a principal forma

sob a qual o fósforo se encontra armazenado nas plantas, sendo um constituinte das forragens (entre 1 a 7,5%), rações e outros alimentos de origem vegetal, que fazem parte da dieta dos ruminantes [Plaami, 1997; Thornton e Passen, 2004]. Este composto não é completamente digerido, durante a fermentação microbiana no rúmen destes animais, pelo que a sua presença nas fezes é inevitável [Thornton e Passen, 2004]. Thornton e Passen (2004) demonstraram que, em concentrações superiores a 0,4 mM, o fitato inibe, completamente, a reacção de PCR. Esta inibição pode ocorrer, quer por ligação ao ião magnésio, fazendo diminuir a sua disponibilidade em solução para níveis abaixo do necessário à actividade da polimerase do DNA, quer por alteração da composição iónica da reacção, quando presente sob a forma de sais de cálcio, magnésio, potássio ou sódio [Thornton e Passen, 2004]. Também, alguns polissacáridos têm efeito inibidor da PCR. Estes são os principais componentes das plantas, tendo uma função estrutural, enquanto constituintes da parede celular das células vegetais (pectina, hemicelulose e celulose), e de reserva energética, que é acumulada nas respectivas sementes e raízes (amido). Em virtude da dieta rica em fibras vegetais, característica dos ruminantes, os polissacáridos encontram-se, também, presentes nas suas fezes. Devido à sua carga negativa, estas macromoléculas apresentam comportamento semelhante ao dos ácidos nucleicos, sendo co-purificados com o DNA durante o seu processo de extracção. A inibição da PCR, por alguns polissacáridos, acontece porque estas macromoléculas, ao competirem com o DNA alvo, impedem a acção da enzima polimerase do DNA [Shioda e Murakami-Murofushi, 1987; Demeke e Adams, 1992; Monteiro *et al.*, 1997]. A presença dos inibidores acima referidos, nas fezes de gado doméstico e de ruminantes silváticos, poderá justificar a diferença observada nas percentagens de amplificação dos quatro *loci*, entre os isolados humanos e os daqueles animais.

A caracterização molecular dos isolados detectados nos dois gatos, revelou que ambos se encontravam parasitados por *C. felis* (figura 14, quadro XXIII), a mesma espécie que foi, também, encontrada em cinco doentes com infecção por VIH. Em ambos os isolados foi observado um predomínio da cópia A do gene SSU-rRNA (quadro XXII), tal como sucedeu em três dos cinco isolados humanos. O facto da espécie *C. felis* se encontrar associada, tanto à infecção em humanos, como em gatos domésticos, se, por um lado, não prova que o hospedeiro felino seja a fonte da infecção humana, por outro, também, não permite excluir a possibilidade de uma eventual transmissão zoonótica da infecção ao Homem, caso se verifiquem condições epidemiológicas favoráveis à transmissão. Apesar de se encontrarem

documentados alguns estudos epidemiológicos sobre a infecção por parasitas do género *Cryptosporidium* em animais de companhia, poucos são aqueles em que, através da utilização de técnicas de biologia molecular, foi identificada a espécie responsável pela infecção. Na Austrália, Sargent *et al.* (1998) caracterizaram, por sequenciação de um fragmento do gene SSU-rRNA, dois isolados de *Cryptosporidium* spp., detectados em dois gatos domésticos, tendo observado que a sua sequência nucleotídica exibia 8,1% de divergência em relação às sequências de isolados de origem humana e animal. Heitman *et al.* (2002) identificaram, por PCR-RFLP da região ITS1 do gene rRNA, a espécie *C. felis* como a responsável pela infecção de um gato, numa zona rural do Canadá.

A caracterização molecular dos isolados responsáveis pela infecção nos gamos da Tapada Nacional de Mafra, permitiu identificá-los como pertencendo à espécie *C. parvum* (figura 15, quadros XXII e XXIII). Dadas as características orográficas da Tapada, a eliminação para o solo de fezes contaminadas com oocistos de *C. parvum*, conduz à dispersão dos parasitas no ambiente. A orografia da Tapada Nacional de Mafra apresenta declives entre 80 e 358 m, o que, quando ocorre precipitação, favorece o aparecimento de águas de escorrência, que confluem para a Ribeira de Safarujo. Para além de ser utilizada como local de abeberamento pelos animais da Reserva Nacional, a Ribeira de Safarujo atravessa a Tapada, percorre os campos agrícolas do Concelho de Mafra, indo, por fim, desaguar na Praia de São Lourenço, entre a Ericeira e Ribamar. A elevada humidade relativa do solo (70-83%) e o seu teor argiloso constituem factores favoráveis à manutenção da viabilidade dos oocistos [Lourenço *et al.*, 2000]. Estes factores propiciam a dispersão dos oocistos no ambiente e a transmissão da infecção a outros animais. Uma vez que a espécie *C. parvum* é, também, a responsável por um elevado número de infecções humanas, os resultados da caracterização molecular destes isolados evidenciam o potencial zoonótico da infecção nestes animais silváticos de vida livre e o risco que ela pode constituir para a saúde pública. Apesar de se encontrarem na literatura alguns estudos epidemiológicos sobre a criptosporidiose em Cervídeos, muito poucos são aqueles em que foi determinada a espécie causadora da infecção. Nos Estados Unidos da América, Deng e Cliver (1999) e Perz e Le Blancq (2001), identificaram a espécie *C. parvum* como a responsável por infecções assintomáticas em Cervídeos adultos, nos Estados da Califórnia e de Nova Iorque, respectivamente. A mesma espécie foi, ainda, descrita por Siefker *et al.* (2002), numa cria de veado com uma semana de vida, num Parque Natural do Estado da Virgínia, também nos EUA.

A espécie *C. parvum* foi, também, identificada como a responsável pela infecção nos Bovídeos do Jardim Zoológico de Lisboa estudados em 1996 e em 1998-1999 (figura 15, quadros XXII e XXIII). Esta situação chama a atenção para o risco que a infecção por *C. parvum* constitui para aqueles que contactam, directamente, com estes animais, como é o caso dos seus tratadores. Uma eventual infecção, nestes trabalhadores, acarreta, ainda, o risco de transmissão secundária, no ambiente doméstico, a crianças ou a outros familiares. Por outro lado, através de águas de escorrência ou de fomites (botas dos tratadores, mangueiras, utensílios de limpeza dos recintos, rodas dos tractores) pode, ainda, ocorrer dispersão dos oocistos no ambiente. Sendo o Jardim Zoológico um local de lazer, que recebe muitos visitantes, em particular, crianças, a presença de animais infectados por *C. parvum* exige a adopção medidas que impeçam a transmissão desta parasitose ao Homem. No entanto, estes isolados de *C. parvum* correspondem a animais com diagnóstico parasitológico de criptosporidiose realizado em estudos epidemiológicos anteriores ao ano 2000. No que se refere ao estudo que efectuámos entre 2002 e 2003, não só não foi encontrado nenhum animal com infecção por *C. parvum*, como nenhum dos genótipos identificados, nos dois mamíferos e no réptil parasitados, foi, até à data, encontrado em infecções humanas (quadro XXIII). Deste modo, à luz dos conhecimentos actuais, nenhum dos parasitas encontrados, em animais do Jardim Zoológico de Lisboa, no período de 2002 a 2003, constitui risco para a saúde pública.

A identificação de *Cryptosporidium* genótipo rato no bisonte americano (figura 17), constitui a primeira descrição deste genótipo num ruminante. Gómez *et al.* (2000) e Gracenea *et al.* (2002) também observaram oocistos de *Cryptosporidium* spp., nas fezes de bisontes americanos, no Zoo de Barcelona, mas não realizaram a caracterização molecular dos parasitas, pelo que se desconhece a sua identidade. O genótipo rato é muito comum em roedores, tendo sido associado a infecções em *Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*, *Microtus arvalis* e *Mus musculus* na Austrália, no Reino Unido, em Espanha e na Polónia [Morgan *et al.*, 1999c; Bajer *et al.*, 2003]. Dada a ausência de sintomas gastrintestinais, o baixo número de oocistos encontrado nas fezes e o facto de a sua detecção ter acontecido uma única vez (numa colheita de fezes posterior não foram encontrados oocistos), desconhece-se se o bisonte estaria, realmente, infectado pelo genótipo rato (infecção assintomática) ou, apenas, a excretar oocistos, de passagem pelo tracto gastrintestinal, após a sua ingestão, em alimentos e/ou água contaminados com fezes de roedores. Em estudos anteriores, de caracterização

molecular de isolados de répteis, Xiao *et al.* (2004b) identificaram, em três tartarugas estrela indianas do Zoo de Saint Louis, nos EUA, o genótipo tartaruga. Este foi, também, o genótipo encontrado na tartaruga estrela indiana, no Jardim Zoológico de Lisboa, sendo provável que este animal seja um hospedeiro natural dos parasitas com este genótipo. A infecção por *Cryptosporidium* spp. em gnus de cauda branca foi descrita, pela primeira vez, no Parque Nacional de Mikumi, na Tanzânia [Mtambo *et al.*, 1997]. Contudo, os autores não efectuaram a caracterização molecular dos parasitas, pelo que se desconhece a espécie ou genótipo a que pertencem. Parasitas do género *Cryptosporidium* foram, também, observados nas fezes de um gnu azul (*Connochaetes taurinus taurinus*), no Zoo de Barcelona [Gómez *et al.* 2000], tendo a sua caracterização molecular permitido identificá-los como pertencendo à espécie *C. parvum* [Morgan *et al.* 1999c]. No presente estudo, a caracterização molecular dos oocistos excretados pelo gnu de cauda branca mostrou tratarem-se de parasitas pertencentes a um novo genótipo (figura 17). Devido à elevada semelhança da sua sequência nucleotídica com a do genótipo W5, identificado numa amostra de água de tempestade no Estado de Nova Iorque [Jiang *et al.*, 2005], e, também, ao facto de os gnus não fazerem parte da fauna daquela região, é provável que o novo genótipo não seja específico deste hospedeiro Africano, mas, sim, de outro animal presente, tanto no Jardim Zoológico de Lisboa, como na região onde foi recolhida a amostra W5. O facto de a infecção neste animal ser assintomática, do número de oocistos excretados ser reduzido e de, em colheitas fecais posteriores, não terem sido identificados mais parasitas, advoga a favor desta hipótese.

Entre os isolados de gado bovino e ovino, cuja caracterização molecular foi bem sucedida, 93,8% (75/80) pertenciam à espécie *C. parvum*. Apenas cinco parasitas de origem bovina foram identificados como pertencendo a outras espécies ou genótipos: dois a *C. andersoni*, dois a *C. bovis* e um a *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo (quadro XXIII). Uma vez que os perfis de restrição do fragmento do gene SSU-rRNA de *C. parvum*, *C. bovis* e *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo são indistinguíveis (figura 16, quadro XXII), a sua diferenciação foi efectuada, por sequenciação do produto amplificado por PCR, em todos os isolados de vitelos com idade desconhecida ou superior a 15 dias e em que não ocorreu amplificação dos genes COWP, DHFR e TRAP-C1. A escolha deste critério, para selecção dos parasitas que iriam ser submetidos a sequenciação, assenta no facto de as PCR's dos genes COWP, DHFR e TRAP-C1 permitirem a identificação do DNA de *C. parvum*, mas não de *C. bovis* ou de *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo e de, a partir das

duas semanas de vida, alguns vitelos já se encontrarem infectados por estes dois parasitas [Santín *et al.*, 2004]. A caracterização, por PCR-RFLP e/ou sequenciação dos produtos de amplificação dos genes SSU-rRNA, DHFR, COWP e/ou TRAP-C1, mostrou que todos os vitelos, cuja idade se sabia ser inferior a duas semanas, se encontravam parasitados por *C. parvum*, enquanto que os infectados por *C. bovis*, *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo e *C. andersoni* tinham, respectivamente, 30 e 29 dias e quatro meses de vida. Estes resultados são coincidentes com os descritos por Santín *et al.* (2004) que, em animais de 15 explorações leiteiras, distribuídas por sete Estados Norte Americanos, identificaram *C. bovis* e *Cryptosporidium* genótipo semelhante ao do gamo em alguns vitelos com mais de duas semanas de vida e *C. andersoni* em animais com idade superior a três meses. Os mesmos autores observaram que a percentagem de infecção por *C. parvum*, em animais não desmamados (idade inferior a 3 meses) e desmamados (idade superior a 3 meses), era de 85% e 1%, respectivamente, enquanto que *C. bovis* era a espécie mais prevalente nestes últimos (55%), apresentando uma prevalência de, apenas, 9% nos vitelos não desmamados. O genótipo semelhante ao do gamo, também, se encontrava associado, principalmente, à infecção em animais desmamados, tendo os valores de prevalência, observados em vitelos antes e depois do desmame, sido de 5% e 31%, respectivamente. No que respeita à infecção por *C. andersoni*, aqueles autores descreveram prevalências de 1% e 13%, em animais antes e depois do desmame, respectivamente. Na República Checa, Kváč e Vítovec (2003) observaram a excreção de oocistos de *C. andersoni*, em vitelos a partir dos 63 dias de vida. Estes autores descreveram, ainda, em vitelos até aos nove meses, prevalências de infecção por *C. andersoni* que, consoante a idade dos animais, variaram entre 11,1% e 92,9%. A prevalência da infecção por esta espécie foi mais acentuada nos vitelos com idade superior a 14 semanas. Na Dinamarca, Enemark *et al.* (2002b) documentaram percentagens de infecção, por *C. parvum* e *C. andersoni*, em novilhos entre os dois e os 24 meses de vida, de 3,0% (4/133) e 21,1% (28/133), respectivamente. Na Irlanda do Norte, Moriarty *et al.* (2005) encontraram, em fezes de bovinos, entre os 12 e os 24 meses de idade, recolhidas do recto dos animais, após o seu abate num matadouro, prevalências de *C. parvum* e *C. andersoni* de 45,5% e 54,5%, respectivamente. Num estudo efectuado no Japão, a infecção por *C. parvum* foi identificada em vitelos, entre os oito dias e os dois meses, enquanto que a espécie *C. andersoni* foi associada à infecção em animais, entre os oito e os 21 meses de idade [Sakai *et al.*, 2003]. No presente trabalho foi encontrado claro predomínio da infecção por *C. parvum*

(quadro XXIII), a que não será alheio o facto de, a maioria dos animais estudados, ser muito jovem. Na realidade, dos 66 animais cuja idade era conhecida, 93,9% (62/66) tinham menos de 38 dias e 4,5% (3/66) menos de três meses de vida; apenas um vitelo tinha quatro meses de idade. Todos os animais infectados por *C. parvum* e com idade conhecida tinham menos de três meses e, destes, 97,9% (46/47) tinham menos de 38 dias de vida. Infelizmente, não foi possível conhecer a idade dos restantes 26 vitelos infectados por *C. parvum*. Em virtude de, no presente trabalho, terem sido estudados, essencialmente, vitelos não desmamados, desconhece-se qual a percentagem de infecção por *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* e pelo genótipo semelhante ao do gamo em vitelos desmamados e em gado adulto. O facto dos parasitas pertencentes à espécie *C. bovis* terem sido encontrados, tanto em Portugal Continental como nos Açores, leva-nos a supor que esta espécie possa apresentar ampla distribuição geográfica, à semelhança do descrito por Santín *et al.* (2004) que, nos EUA, observaram a presença de *C. bovis* em bovinos de diversas explorações pecuárias, dispersas ao longo de uma extensão superior a 2.100 km. Para confirmar esta hipótese seria necessário estudar um maior número de animais desmamados e adultos, provenientes de diversas regiões de Portugal Continental e Insular. Alguns estudos de caracterização molecular de isolados bovinos, realizados no Reino Unido, dão conta, apenas, da infecção por *C. parvum* [Patel *et al.*, 1998; McLauchlin *et al.*, 2000]. Contudo, essa caracterização foi efectuada por amplificação do locus COWP que, em algumas espécies de *Cryptosporidium*, entre as quais *C. andersoni*, só se verifica em condições de elevada pureza e concentração de oocistos [Xiao *et al.*, 2000b]. No Reino Unido, a primeira descrição de infecção por *C. andersoni*, em bovinos, foi feita em 2005, por Daniel *et al.*, numa vaca leiteira adulta com diarreia. Neste caso, a identificação do isolado foi efectuada por caracterização do locus SSU-rRNA. Para além dos trabalhos aqui descritos, encontram-se documentados vários estudos epidemiológicos sobre a criptosporidiose bovina. No entanto, os seus autores não realizaram a caracterização molecular dos parasitas detectados, pelo que se desconhece a sua identidade [Olson *et al.*, 1997b; Wade *et al.*, 2000; Castro-Hermida *et al.*, 2002]. Os isolados de origem ovina, caracterizados no presente trabalho, pertenciam, ambos, à espécie *C. parvum*. No Reino Unido, Chalmers *et al.* (2002) caracterizaram, por PCR-RFLP e sequenciação do gene COWP, isolados de ovinos, tendo encontrado, em alguns deles, a espécie *C. parvum* e, noutros, um genótipo distinto, não identificado. Em ovinos adultos, na Austrália, foram encontrados, por caracterização do gene SSU-rRNA, parasitas pertencentes às espécies *C. bovis* e *C. andersoni*, a *Cryptosporidium*

genótipo cervo e a um novo genótipo [Ryan *et al.*, 2005]. Uma vez que a caracterização dos isolados ovinos com o genótipo desconhecido, realizada por Chalmers *et al.* (2002), no Reino Unido, compreendeu, apenas, a amplificação do gene COWP, desconhece-se se aqueles parasitas pertenceriam a alguma das espécies ou genótipos identificados por Ryan *et al.* (2005), na Austrália. A caracterização molecular de isolados, em *loci* como o COWP, tem um alcance limitado, na medida em que, dada a impossibilidade de amplificar o DNA de todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, são poucos os isolados que se encontram caracterizados para este gene, facto que dificulta a identificação daqueles com sequências nucleotídicas distintas das já conhecidas. Deste modo, é preferível a caracterização do *locus* SSU-rRNA, que, para além de permitir a amplificação do DNA de todos os parasitas pertencentes ao género *Cryptosporidium*, se encontra muito bem caracterizado, para um grande número de isolados, das mais diversas origens.

A dimensão dos oocistos de *C. parvum* e de *C. felis* de origem animal foi idêntica à da determinada para os parasitas da mesma espécie, identificados em humanos (*vide* capítulo V, quadro XX). De entre os criptosporídeos identificados em gado bovino, apenas os oocistos de *C. andersoni* se distinguem das restantes espécies, em virtude da sua maior dimensão (quadro XXIV). À semelhança do sucedido nos isolados de origem humana, estes resultados mostram a impossibilidade de identificar a espécie ou genótipo responsável pela infecção, tanto em gado doméstico, como em animais silváticos, tendo por base, unicamente, as características morfométricas dos oocistos.

Os resultados da caracterização molecular dos isolados de origem animal evidenciam o elevado número de infecções por *C. parvum* observado, tanto em gado doméstico, como em animais silváticos. A espécie *C. parvum* é, também, a responsável por grande parte dos casos de criptosporidiose humana em Portugal. Deste modo, a infecção naqueles animais apresenta um potencial zoonótico de transmissão ao Homem, quer por contacto directo, quer indirecto, através da contaminação de recursos hídricos ou de alimentos. Para além de *C. parvum*, foram, também, identificadas, em gado doméstico e em animais silváticos, espécies e genótipos que, com base no conhecimento actualmente disponível, não se encontram associados a infecções humanas, mas cujos oocistos são morfologicamente indistinguíveis. Estes resultados demonstram como a identificação molecular das espécies e dos genótipos dos parasitas responsáveis pela criptosporidiose, em animais, é fundamental para a determinação do seu potencial zoonótico e do risco da sua transmissão zoonótica ao Homem.

Capítulo VII

*CARACTERIZAÇÃO INTRA-ESPECÍFICA DE C. HOMINIS
E C. PARVUM*

1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes de alguns autores têm documentado a existência de polimorfismos intra-específicos em isolados de *C. hominis* e de *C. parvum*. A avaliação desta heterogeneidade intra-específica tem sido efectuada, sobretudo, através da análise de microssatélites e da sequenciação e análise filogenética do gene GP60 [Aiello *et al.*, 1999; Cacciò *et al.*, 2000, 2001; Feng *et al.*, 2000; Strong *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2001; Sulaiman *et al.*, 2001; Enemark *et al.*, 2002a; Glaberman *et al.*, 2002; Leav *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003a, 2003b; Mallon *et al.*, 2003b].

Os microssatélites, pela sua natureza polimórfica e pela abundância nos genomas eucariotas, constituem marcadores genéticos muito informativos. Num estudo de caracterização parcial do genoma de *C. parvum*, Liu *et al.* (1999) identificaram, em cerca de 2,5% do genoma do parasita, 57 microssatélites, compostos por repetições dinucleotídicas e trinucleotídicas.

O estudo de *loci* de microssatélites exige a determinação exacta do número de pares de bases de um fragmento de DNA amplificado, o que pode ser conseguido através da técnica de análise de fragmentos por metodologia fluorescente. Em virtude da incorporação de um fluorocromo na extremidade 5' de um dos oligonucleótidos iniciadores, os produtos amplificados por PCR encontram-se, também, marcados. A cada produto de PCR a analisar é adicionado um padrão interno, constituído por fragmentos de dimensão conhecida, marcados com um fluorocromo diferente daquele que se encontra incorporado no fragmento amplificado. A mistura da amostra é, posteriormente, submetida a electroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, num sequenciador automático que detecta a fluorescência emitida pelos fluorocromos da amostra e do padrão interno e a transmite para um computador. A informação recolhida, durante a electroforese, é processada através de software específico que, com base nas dimensões dos fragmentos do padrão interno, constrói uma curva de calibração, utilizada para calcular a dimensão do fragmento em estudo. Os resultados são apresentados sob a forma de electroforetograma, no qual se observam os picos correspondentes a cada fragmento do padrão interno e, a cor diferente, ao fragmento em análise. Esta metodologia permite obter resultados de fácil interpretação e que não necessitam de processamentos adicionais. Dada a sua elevada precisão e reprodutibilidade, esta técnica tem sido descrita como uma alternativa rápida e barata à sequenciação de *loci* de microssatélites [Enemark *et al.*, 2002a].

Durante a fase assexuada do desenvolvimento de *Cryptosporidium* spp., o gene GP60, também chamado gp 15/45/60, é transcrito e traduzido nas formas intracelulares do parasita, originando uma glicoproteína precursora de 60-kDa. Após a sua síntese, esta proteína sofre uma clivagem proteolítica, dando origem a duas glicoproteínas, uma de 15-kDa e outra de 40-kDa. A glicoproteína de 15-kDa localiza-se por toda a superfície dos merozoítos e dos esporozoítos e é libertada durante o movimento destes últimos. A glicoproteína de 40-kDa localiza-se na superfície da região apical dos esporozoítos e por toda a superfície dos merozoítos. Admite-se que estas duas glicoproteínas estejam envolvidas no processo de ligação e/ou de invasão dos enterócitos [Cevallos *et al.*, 2000; Strong *et al.*, 2000]. Strong *et al.* (2000) observaram que o gene GP60 apresentava um elevado número de polimorfismos, principalmente entre isolados de *C. hominis*, tendo identificado, não só quatro famílias de subtipos, como, também, diferenças na sequência nucleotídica, entre isolados da mesma família. A este trabalho, seguiram-se outros, de vários autores, que procederam à caracterização do gene GP60 em isolados de diferentes regiões do Mundo, tendo observado, a par da grande variabilidade existente entre isolados de *C. hominis*, também, vasta diversidade genética nos parasitas que pertencem à espécie *C. parvum*. Assim, até à data, encontram-se identificadas cinco famílias de subtipos em *C. hominis* – Ia, Ib, Id, Ie e If – e seis em *C. parvum* – IIa, IIb, IIc, IId, IIe e IIe. Na sua maioria, as várias famílias contêm mais do que um subtipo e, algumas delas (Ia, Id e IIa), mais de dez [Peng *et al.*, 2001; Sulaiman *et al.*, 2001; Leav *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003b; Peng *et al.*, 2003a, 2003b; Wu *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003; Sulaiman *et al.*, 2005; Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. As diversas famílias de subtipos diferem, entre si, por variações na sequência nucleotídica ao longo de todo o *locus* GP60. Os subtipos existentes em cada família diferem, entre si, pelo número de repetições das unidades trinucleotídicas (TCA), (TCG) e/ou (TCT) presentes num STR existente neste gene.

O elevado número de polimorfismos encontrados no gene GP60 confere à sua caracterização grande resolução, tornando os resultados, assim obtidos, muito informativos e de grande utilidade em estudos epidemiológicos, contribuindo, não só para clarificar a dinâmica da transmissão da criptosporidiose, em zonas endémicas, como, também, para identificar fontes de infecção, em situações de surtos hídricos e alimentares.

No presente trabalho, procedeu-se à caracterização dos *loci* ML2 e GP60, em todos os isolados de *C. parvum* e de *C. hominis*, a fim de se determinar a sua variabilidade intra-específica e avaliar a importância dos diversos modos de transmissão da criptosporidiose

humana em Portugal e o papel desempenhado, sobretudo pelo gado doméstico, nessa mesma transmissão.

2. RESULTADOS

2.1 ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES

No presente trabalho, foram submetidos à caracterização do *locus* ML2, 32 isolados humanos, pertencentes às espécies *C. hominis* (n = 11) e *C. parvum* (n = 21), 46 isolados de *C. parvum* de origem bovina e 11 isolados de *C. parvum* provenientes dos Bovídeos do Jardim Zoológico de Lisboa (estudados em 1996 e em 1998-1999). Na figura 18 podem observar-se os produtos de PCR do *locus* ML2 e, no quadro XXV, os resultados da amplificação, por PCR, do DNA destas duas espécies, em todos os isolados estudados.

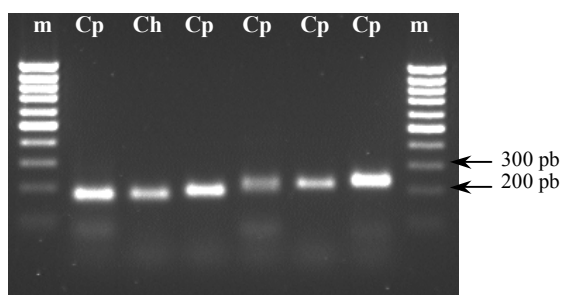


FIGURA 18 – Fotografia de um gel de agarose, após electroforese dos produtos de amplificação do *locus* ML2. Cp – *C. parvum*, Ch – *C. hominis*, m – marcador de pesos moleculares (“100 bp ladder”)

QUADRO XXV – Amplificação, por PCR, do *locus* ML2 em isolados de *C. parvum* e de *C. hominis*

HOSPEDEIROS (n.º estudado)	N.º DE ISOLADOS	
	PCR POSITIVA	PCR NEGATIVA
Humanos (n = 32)	27 (84,4%)	5 (15,6%)
Bovinos (n = 46)	23 (50,0 %)	23 (50,0%)
Bovídeos Zoo (n = 11)	6 (54,5%)	5 (45,5%)
Total (n = 89)	56 (62,9%)	33 (37,1%)

A percentagem de amplificação do *locus* ML2, nos isolados de gado bovino e dos Bovídeos do Jardim Zoológico foi semelhante entre si, mas bastante inferior à verificada nos de origem humana. Oitenta por cento (4/5) dos isolados humanos com PCR negativo eram

provenientes de amostras fecais com carga parasitária de nível I. No caso dos isolados de gado bovino e dos Bovídeos do Jardim Zoológico, 67,9% (19/28) daqueles em que não se obteve amplificação provinham de fezes com carga parasitária de nível I e II.

Através da técnica de análise de fragmentos por metodologia fluorescente, foi possível determinar a dimensão de alguns dos produtos de PCR do *locus* ML2 e identificar os alelos presentes nos respectivos isolados (figura 19, *vide* página seguinte). De acordo com o proposto por Cacciò *et al.* (2001), a designação de cada alelo baseia-se na dimensão do fragmento amplificado por PCR, que, por sua vez, depende do número de repetições AG nele presentes (figura 20). Todos os isolados de *C. hominis* apresentaram o alelo ML2-179 ([AG]₃). Este alelo não havia sido descrito por outros autores, pelo que foi depositado no GenBank, com o número de acesso AY342297 [Alves *et al.*, 2003a]. Em alguns isolados de *C. parvum* de origem humana, foram identificados os alelos ML2-176 ([AG]₄) e ML2-191 ([AG]₁₃). O alelo ML2-191 já havia sido descrito, anteriormente, por Cacciò *et al.* (2001), enquanto que o ML2-176 foi descrito, pela primeira vez, no presente trabalho, e depositado no GenBank com o número de acesso AY342296 [Alves *et al.*, 2003a]. A determinação da sequência nucleotídica do fragmento do *locus* ML2, em dois isolados representativos de cada alelo identificado, permitiu confirmar o resultado obtido pela análise de fragmentos. Na figura 20, podem observar-se as diferenças entre as sequências nucleotídicas dos três alelos identificados no presente trabalho. O número de repetições AG, nos alelos ML2-191, ML2-176 e ML2-179, foi de 13, quatro e três, respectivamente.

ML2-191	CAATGTAAGTTTACTTATGATTATTAAGATAATAAGCCTATTTATTGAGGTAGGG AG AG AG AG	63
ML2-176AT.----- -- -- -- --	49
ML2-179AT.----- -- -- -- --	49
ML2-191	AG AG AG AG AG AG AG AG AG GAAGAAAAGGAAGAAGCATGATAGGCTTGGAAAATGATC	121
ML2-176	.. GT .. G. --A.....T...	105
ML2-179	.. GT .. G. GGA.....T...	107
ML2-191	TTAATAAGAATTTTAAACATTTCAAATGATTAACCTTTTAA--TATTTTTTCTCTCTCATCTTTAT	186
ML2-176A.....A.C.TTT.....TA-----	171
ML2-179G.....G.T.AAC.....TAA-----	174
ML2-191	AGTCG 191	
ML2-176 176	
ML2-179 179	

FIGURA 20 – Comparação da sequência nucleotídica de cada um dos três alelos do *locus* ML2, identificados no presente trabalho. As repetições (AG)_n encontram-se assinaladas a negrito. Os pontos indicam identidade nucleotídica, relativamente ao alelo ML2-191 e, os traços, deleções

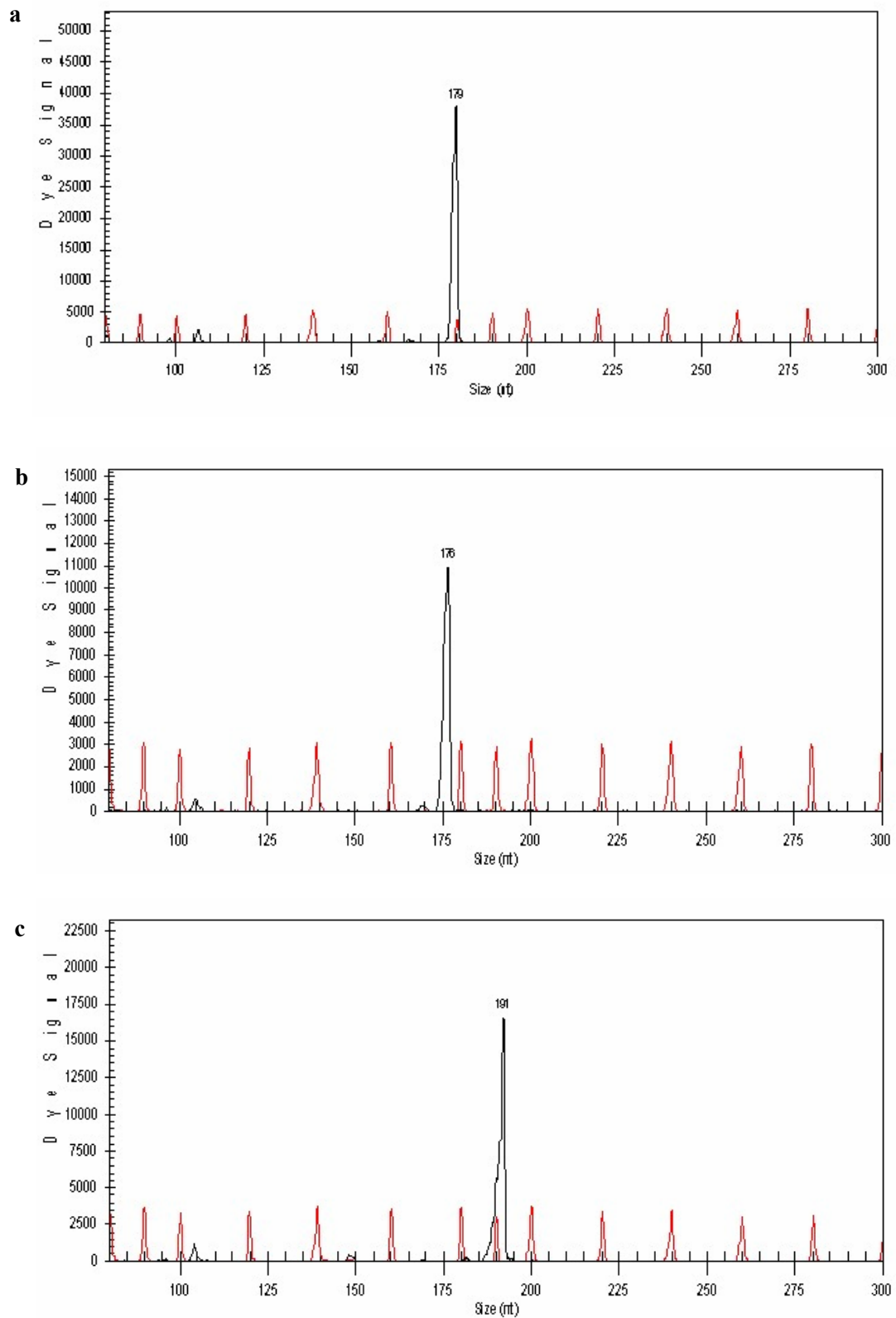


FIGURA 19 – Electroforetogramas resultantes da análise de fragmentos do *locus* de microssatélites ML2. **(a)** – alelo ML2-179, **(b)** – alelo ML2-176, **(c)** – alelo ML2-191. Picos a preto – fragmento ML2 amplificado. Picos a vermelho – padrão interno, nt – nucleótidos

Em alguns isolados humanos de *C. parvum* e em todos os dos outros animais, não foi possível a identificação dos alelos ML2, em consequência dos electroforetogramas apresentarem vários picos, que diferiam entre si, por um ou dois nucleótidos (figura 21). No conjunto de todos os isolados em que esta situação se verificou, os fragmentos correspondentes aos diversos picos observados apresentavam dimensões entre 187 e 239 nucleótidos. A sequenciação de alguns destes produtos de PCR, confirmou a existência de vários fragmentos.

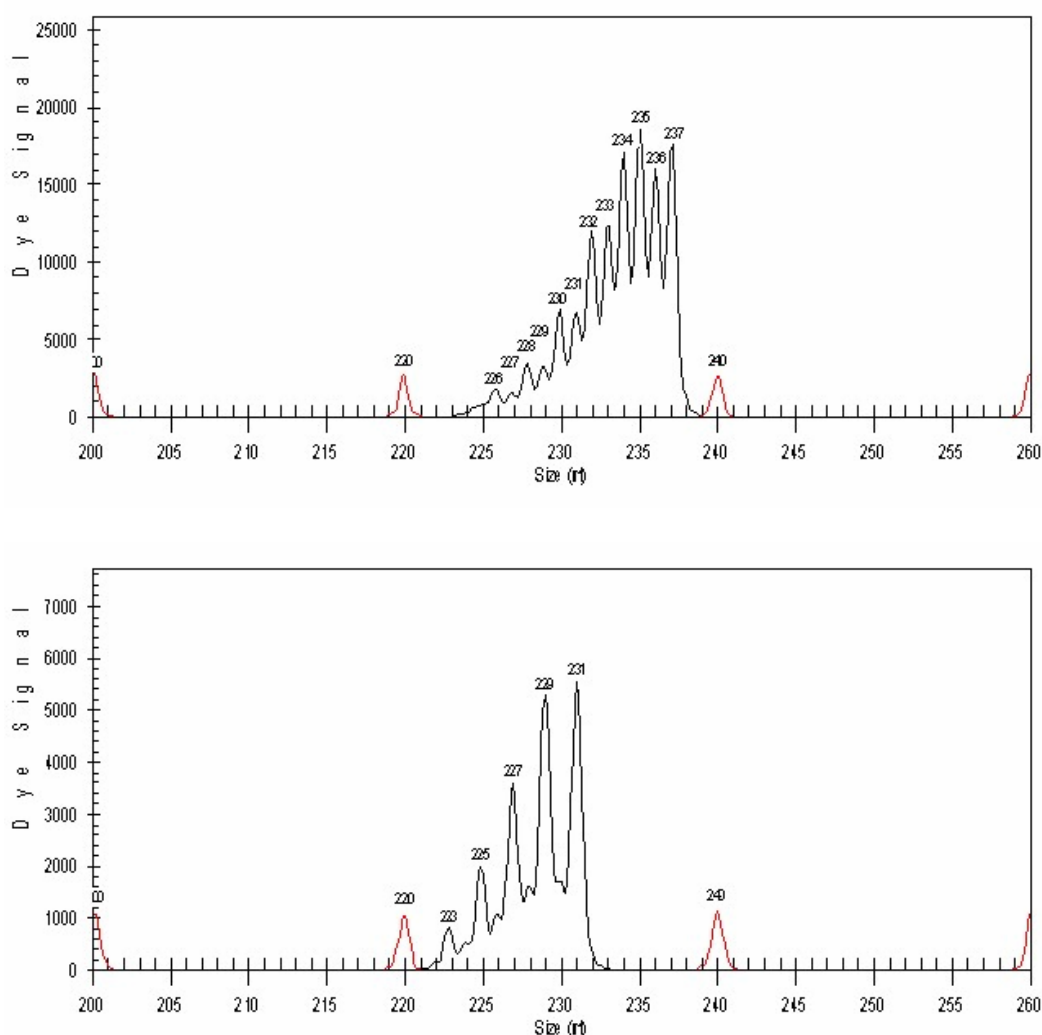


FIGURA 21 – Electroforetogramas de isolados de *C. parvum*, ilustrativos da presença de múltiplos picos. Picos a preto – fragmentos ML2 amplificados. Picos a vermelho – padrão interno, nt – nucleótidos

Com o objectivo de eliminar os picos que não correspondiam ao alelo correcto, foram introduzidas algumas modificações à reacção de PCR, nomeadamente: i) adição de DMSO à mistura reaccional, em concentrações de 1%, 2,5%, 5% e 7,5%; ii) alteração da temperatura de ligação para 54°C e 56°C; iii) utilização de uma enzima de outro fabricante (*Taq* DNA Polymerase, Promega). Em três isolados humanos, o problema foi solucionado através da adição de DMSO e da alteração da temperatura de ligação permitindo, assim, identificar, em todos eles, o alelo ML2-191. No entanto, noutros isolados humanos e em todos os de gado bovino e dos Bovídeos do Jardim Zoológico, a eliminação dos múltiplos picos não foi conseguida. Nos isolados em que este problema foi solucionado, a dimensão dos fragmentos correspondentes a cada pico variava entre 187 e 193 nucleótidos; naqueles em que o problema persistiu, os fragmentos apresentavam dimensões entre 199 e 239 nucleótidos.

No quadro XXVI encontram-se resumidos os resultados da caracterização do *locus* ML2, pela técnica de análise de fragmentos por metodologia fluorescente, em todos os isolados de *C. hominis* e *C. parvum* estudados.

QUADRO XXVI – Resultados da análise de fragmentos por metodologia fluorescente, aplicada ao *locus* ML2, em isolados de *C. parvum* e de *C. hominis*

ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	N.º DE ISOLADOS COM O ALELO			MÚLTIPLOS
		ML2-176	ML2-179	ML2-191	PICOS
<i>C. hominis</i>	Humano	0	10	0	0
<i>C. parvum</i>	Humano	5	0	3	9
<i>C. parvum</i>	Bovino	0	0	0	23
<i>C. parvum</i>	Bovídeos Zoo	0	0	0	6

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO GENE GP60

Todos os isolados de *C. parvum*, *C. hominis* e aqueles em que a identificação da espécie, pela amplificação dos *loci* SSU-rRNA, DHFR, COWP e TRAP-C1, não foi conseguida, foram submetidos à amplificação do gene GP60. Assim, foram sujeitos a caracterização deste *locus*, um total de 181 isolados, sendo 51 de humanos, dois de ovinos, 105 de bovinos, 12 de gamos da Tapada Nacional de Mafra e 11 de Bovídeos do Jardim Zoológico de Lisboa. O procedimento de PCR GP60₁ foi aplicado a todos estes parasitas, tendo sido bem sucedido em

109 dos mesmos. Naqueles em que a amplificação GP60₁ foi negativa, o procedimento de PCR GP60₂ permitiu a amplificação do DNA, em mais 15 isolados (figura 22).

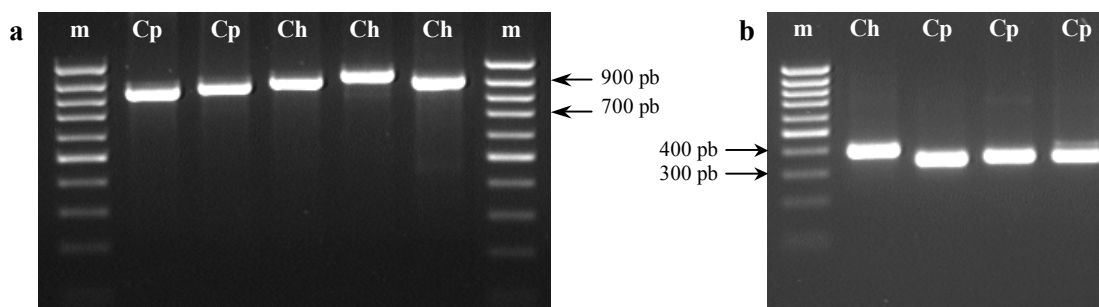


FIGURA 22 – Fotografias de géis de agarose, após electroforese dos produtos de amplificação do *locus* GP60, pelo procedimento (a) GP60₁ e (b) GP60₂. Cp – *C. parvum*, Ch – *C. hominis*, m – marcador de pesos moleculares (“100 bp ladder”)

Os resultados totais da amplificação do gene GP60, pelos dois procedimentos de PCR – GP60₁ e GP60₂ – encontram-se resumidos no quadro XXVII.

QUADRO XXVII – Resultados da amplificação, por PCR, do *locus* GP60 em isolados de *C. parvum* e de *C. hominis*

HOSPEDEIROS (n.º estudado)	N.º DE ISOLADOS	
	PCR POSITIVA	PCR NEGATIVA
Humanos (n = 51)	40 (78,4%)	11 (21,6%)
Bovinos (n = 105)	72 (68,6%)	33 (31,4%)
Ovinos (n = 2)	2 (100%)	0 (0%)
Gamos (n = 12)	1 (8,3%)	11 (91,7%)
Bovideos Zoo (n = 11)	9 (81,8%)	2 (18,2%)
Total (n = 181)	124 (68,5%)	57 (31,5%)

A percentagem de amplificação do gene GP60, nos isolados pertencentes aos hospedeiros humanos, apresentada no quadro XXVII, diz respeito à totalidade dos parasitas de origem humana. Contudo, a sua estratificação em dois grupos, aqueles que se encontravam preservados em MIF e os que foram conservados em dicromato de potássio ou estudados logo

após o diagnóstico parasitológico (*vide* Material e Métodos), leva à alteração dos valores do quadro XXVII, para 30,8% (4/13) nos isolados preservados em MIF e 94,7% (36/38) nos restantes.

Entre os isolados humanos conservados em dicromato de potássio ou estudados após o diagnóstico parasitológico, nos dois em que o gene GP60 não foi amplificado, o número de oocistos presentes nas respectivas amostras fecais era muito baixo (carga parasitária de nível I). Nos parasitas que se encontravam preservados em MIF, 77,8% (7/9) daqueles com amplificação negativa correspondiam a amostras fecais com carga parasitária de nível I ou II. Nos criptosporídeos de bovinos com PCR negativa, 81,8% (27/33) pertenciam a amostras fecais com carga parasitária de nível I ou II. Do mesmo modo, a carga parasitária observada nas amostras fecais dos 11 gamos com amplificação negativa, era muito baixa (nível I). No que respeita aos isolados dos dois Bovídeos do Jardim Zoológico, cujo o gene GP60 não foi amplificado, um tinha associada carga parasitária de nível II e, o outro, de nível III.

Em dois isolados humanos, um previamente identificado como *C. parvum* e outro como *C. hominis*, não se verificou a amplificação do gene GP60, o mesmo ocorrendo em oito isolados de bovinos, dois de Bovídeos do Jardim Zoológico (detectados entre 1998 e 1999) e dois de gamos, anteriormente identificados como *C. parvum*. Porém, a PCR aplicada ao *locus* GP60 permitiu amplificar o DNA de um isolado humano, de sete de origem bovina, de um de um Bovídeo do Jardim Zoológico (diagnosticado em 1996) e de outro de um gamo, cuja PCR dos genes SSU-rRNA, DHFR, COWP e TRAP-C1 havia sido negativa.

A determinação da sequência nucleotídica de todos os fragmentos do gene GP60 amplificados, o seu alinhamento com outras sequências de identidade conhecida e a construção de uma árvore filogenética, a partir de todas as sequências alinhadas, permitiu identificar o subtipo de todos os isolados com amplificação positiva. As sequências nucleotídicas dos subtipos IIaA15G2R1, IIcA5G3, IbA10G2 e IeA11G3T3, que foram alinhadas com as sequências determinadas nos nossos isolados, encontram-se depositadas no GenBank sob os números de acesso AY738190, AY738195, AY738187 e AY738184, respectivamente. As sequências relativas aos restantes subtipos não se encontram depositadas no GenBank [Xiao, L., dados não publicados]. Devido ao elevado número de isolados analisados e à dificuldade em discriminar cada um deles nos respectivos ramos da árvore filogenética, na figura 23 são apresentadas, apenas, as famílias de subtipos e os respectivos subtipos

identificados em Portugal. O modo como os isolados estudados se distribuíram pelos vários subtipos encontra-se, depois, descrito no quadro XXVIII.

Conforme se observa na figura 23, os isolados estudados no presente trabalho distribuem-se por nove famílias de subtipos, quatro em *C. parvum* (IIa, IIb, IIc e IId) e cinco em *C. hominis* (Ia, Ib, Id, Ie e If). Nas famílias IIa e IId foram encontrados, respectivamente, dois (IIaA15G2R1, IIaA16G2R1) e quatro (IIdA22G1, IIdA21G1, IIdA19G1, IIdA17G1) subtipos. Nas restantes famílias, foi identificado, apenas, um subtipo. As famílias IIb e IId foram descritas, pela primeira vez, em isolados portugueses de humanos e de bovinos [Peng *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2003b]. A sequência nucleotídica do *locus* GP60 do isolado pertencente à família IIb (subtipo IIbA14) foi depositada no GenBank sob os números de acesso AF402285 e AY166805 e a de um isolado da família IId (subtipo IIdA22G1), sob o número AY166806 [Peng *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2003b]. Até à data, a família IIb, que coincide com o único subtipo que lhe é conhecido (IIbA14), só foi descrita em Portugal, num isolado de um doente com infecção por VIH. Quanto à família IId, dois novos subtipos foram, posteriormente, identificados em crianças no Kuwait [Sulaiman *et al.*, 2005], sendo ambos diferentes dos quatro encontrados em Portugal. As sequências nucleotídicas dos subtipos IIaA15G2R1, IIcA5G3, IeA11G3T3, IfA14G1 e IbA10G2 foram depositadas no GenBank sob os números de acesso AY166804 e AY166807 a AY166810 [Alves *et al.*, 2003b] e as dos IIaA16G2R1, IIdA17G1, IIdA19G1, IIdA21G1, IdA15 e IaA19R3 sob os números DQ280494 a DQ280499.

QUADRO XXVIII – Distribuição dos isolados de *C. parvum* e de *C. hominis* estudados, pelos vários subtipos do gene GP60 identificados em Portugal

HOSPEDEIROS	N.º DE ISOLADOS COM O SUBTIPO												
	IIa A15G2R1	IIa A16G2R1	IIb A14	IIc A5G3	IId A17G1	IId A19G1	IId A21G1	IId A22G1	Ia A19R3	Ib A10G2	Id A15	Ie A11G3T3	If A14G1
Humanos	9	0	1	7	2	3	2	1	1	10	1	2	1
Bovinos	61	7	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Ovinos	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Gamos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bovideos Zoo	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

No que diz respeito à espécie *C. parvum*, a observação do quadro XXVIII coloca em evidência os seguintes resultados: i) 80,7% (88/109) dos isolados pertencem à família IIa; ii) 11,9% (13/109) dos isolados pertencem à família IId; iii) 6,4% (7/109) dos isolados pertencem à família IIc; iv) 0,9% (1/109) dos isolados pertencem à família IIb. Nas famílias IIb e IIc, cada uma compreendendo, apenas, um subtipo, encontram-se, respectivamente, 4% (1/25) e 28% (7/25) dos isolados humanos. A família IIa é representada por 36% (9/25) dos isolados humanos, por 94,4% (68/72) dos isolados de gado bovino, por todos os isolados de gamos da Tapada de Mafra e de Bovídeos do Jardim Zoológico e por um dos dois isolados de ovinos. Dentro desta família, todos os parasitas apresentam o subtipo IIaA15G2R1, com exceção dos de sete bovinos, que pertencem ao subtipo IIaA16G2R1. Na família IId encontram-se 32% (8/25) dos isolados humanos, um dos dois isolados de ovinos e 5,6% (4/72) dos isolados de gado bovino. Os criptosporídeos humanos distribuem-se de um modo mais ou menos equitativo pelos quatro subtipos da família IId, enquanto que os dos bovinos se concentram todos no subtipo IIdA17G1 e o do ovino no IIdA21G1. A distribuição dos parasitas estudados pelas diferentes famílias de subtipos e pelos diferentes subtipos de *C. parvum*, em função do respectivo hospedeiro, encontra-se representada nas figuras 25 e 26. À exceção do subtipo IIaA16G2R1, os isolados de origem humana distribuem-se por todos os subtipos de *C. parvum*, em especial, pelos IIaA15G2R1 e IIcA5G3. Todos os isolados de ruminantes silváticos (Tapada de Mafra e Jardim Zoológico) apresentam o subtipo IIaA15G2R1, os dois de ovinos distribuem-se, equitativamente, pelos subtipos IIdA21G1 e IIaA15G2R1 e os de gado bovino concentram-se, sobretudo, neste último e, em menor grau, nos subtipos IIaA16G2R1 e IIdA17G1.

Quanto aos isolados de *C. hominis*, a sua distribuição pelas várias famílias de subtipos foi a seguinte: i) 66,7% (10/15) na família Ib; ii) 13,3% (2/15) na família Ie; iii) 6,7% (1/15) nas famílias Ia, Id e If. No presente trabalho, em cada uma destas cinco famílias, foi identificado, apenas, um subtipo. O subtipo IbA10G2 encontra-se representado por dois terços dos isolados de *C. hominis*, enquanto que os restantes quatro compreendem, somente, um ou dois parasitas.

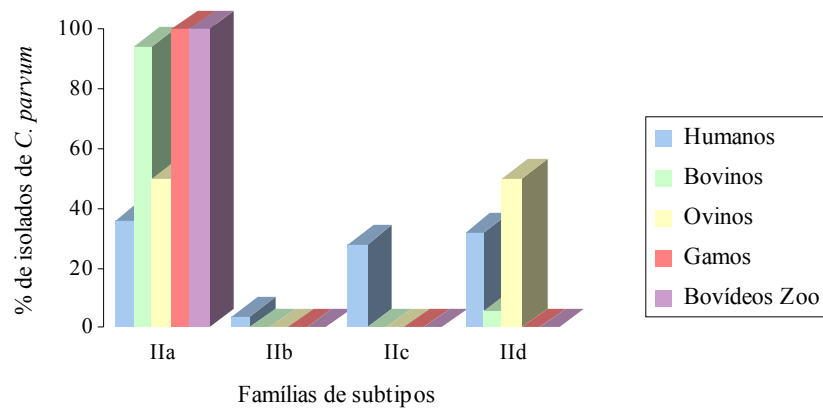


FIGURA 25 – Representação gráfica da distribuição dos isolados de *C. parvum* pelas famílias de subtipos do gene GP60, em função do hospedeiro em que foram detectados

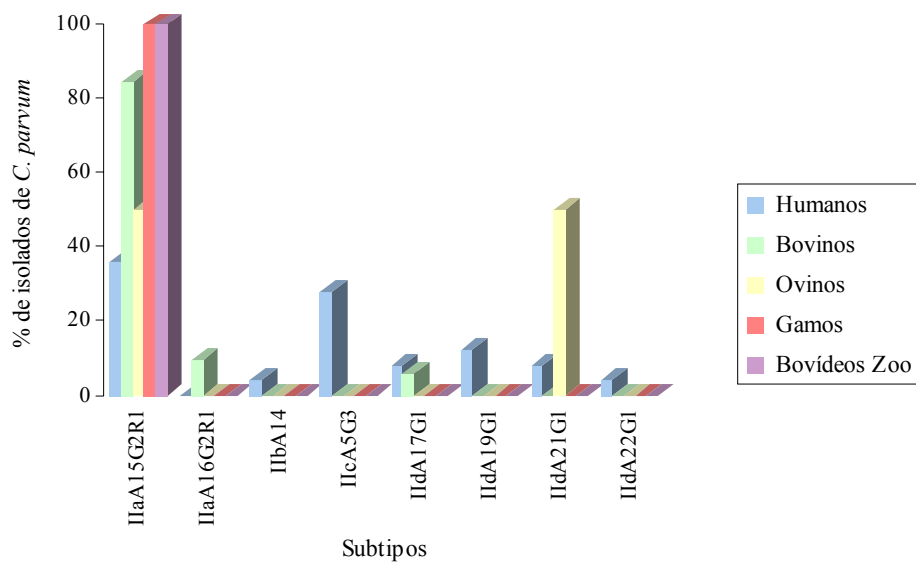


FIGURA 26 – Representação gráfica da distribuição dos isolados de *C. parvum* pelos diferentes subtipos do gene GP60, em função do hospedeiro em que foram detectados

Uma vez que o gado bovino estudado era proveniente de diferentes regiões de Portugal Continental e dos Açores, foi avaliada a possibilidade da existência de variação geográfica, na distribuição dos diversos subtipos identificados nos criptosporídeos daqueles animais. O gráfico representado na figura 27 foi construído com base na informação sobre a proveniência dos bovinos estudados, disponível para 66 dos isolados, em que a caracterização do gene GP60 foi bem sucedida.

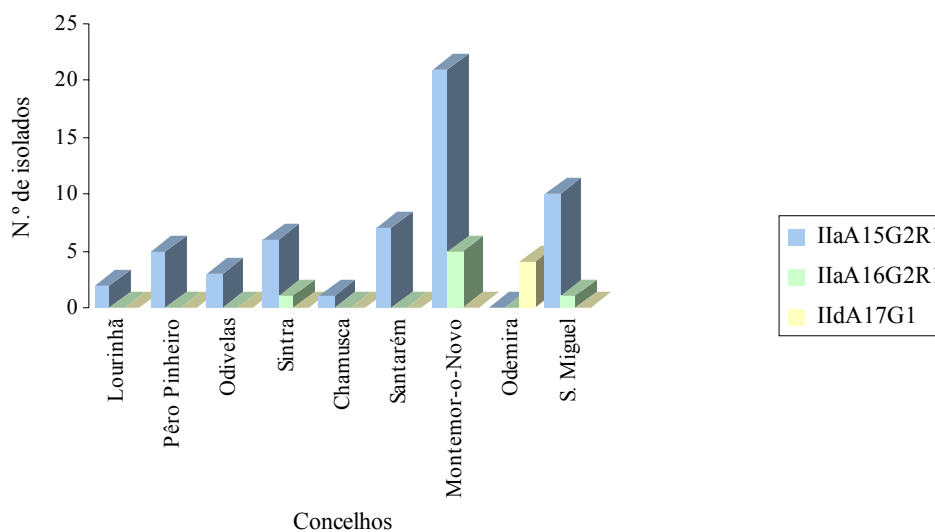


FIGURA 27 – Representação gráfica da distribuição dos subtipos do gene GP60, identificados nos isolados bovinos de *C. parvum*, em função do Concelho de origem dos animais

Conforme se observa na figura 27, o subtipo IIaA15G2R1, representado pela maioria dos isolados bovinos estudados, foi encontrado em todos os Concelhos, à exceção do de Odemira. O subtipo IIaA16G2R1 foi identificado em criptosporídeos de animais de três dos nove Concelhos estudados (Sintra, Montemor-o-Novo e São Miguel), dois pertencentes a duas regiões distintas de Portugal Continental (Estremadura e Alto Alentejo) e um à Região Autónoma dos Açores. Do conjunto dos nove Concelhos estudados, destaca-se o de Odemira, não só por ser o único onde foi encontrado o subtipo IIdA17G1, mas, também, por nenhum dos isolados deste Concelho apresentar os subtipos IIaA15G2R1 e IIaA16G2R1 presentes, respectivamente, em oito e três dos restantes Concelhos. Os quatro isolados do subtipo IIdA17G1, encontrados em Odemira, os únicos deste Concelho que foram caracterizados, pertenciam a animais provenientes de duas explorações leiteiras. Em consequência do baixo número de parasitas caracterizados em cada um dos nove Concelhos investigados, não se verificaram as condições necessárias para a realização de qualquer inferência estatística, que permitisse avaliar a associação de determinado subtipo a um Concelho ou a uma região do País.

Para além da variação geográfica foi, também, analisada a possibilidade de variação sazonal na ocorrência dos isolados humanos de *C. parvum* e de *C. hominis* com os diferentes subtipos GP60. Os resultados da distribuição dos parasitas com os diversos subtipos, ao longo

dos 12 meses do ano, encontram-se representados nas figuras 28 e 29. Dado o pequeno número de parasitas, não foi possível realizar uma inferência estatística que permitisse avaliar a existência, ou não, de variação sazonal. Na figura 28, pode observar-se que infecções por isolados com o subtipo de *C. hominis* IbA10G2, o mais frequente nos isolados por nós estudados, ocorreram em todas as estações do ano, embora em Janeiro e em Maio se tenha registado maior número de casos, do que nos restantes meses. Estes dois meses foram, precisamente, aqueles em que se verificou maior número de casos de criptosporidiose humana devida a *C. hominis* (*vide* capítulo V, figura 13). Quanto aos parasitas com os restantes três subtipos, o seu número baixo impossibilitou qualquer análise de variação sazonal.

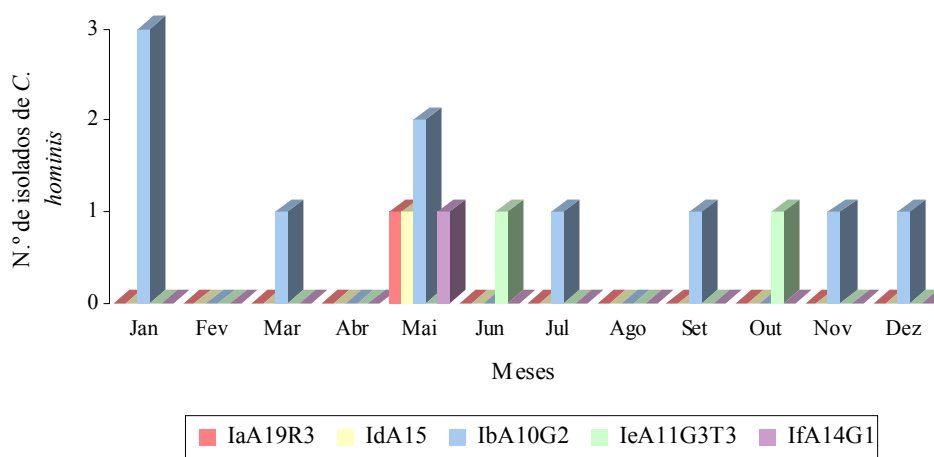


FIGURA 28 – Representação gráfica da distribuição dos isolados de *C. hominis* com os diferentes subtipos do gene GP60, em função dos meses do ano

Na figura 29 encontra-se bem evidenciada a ausência de casos de criptosporidiose humana devidos a *C. parvum*, durante os meses de Verão (Julho a Setembro), conforme, também, já havia sido descrito no capítulo V (*vide* figura 13). Tanto os três subtipos comuns aos criptosporídeos de humanos e de bovinos e ovinos (IIaA15G2R1, IIdA17G1 e IIdA21G1, representados a azul), como aqueles que foram identificados, apenas, nos isolados de humanos, se distribuíram por todas as Estações do ano, à excepção do Verão, época em que não se verificaram casos de criptosporidiose humana devidos a *C. parvum*. A representação da distribuição dos casos de criptosporidiose bovina ao longo do ano não é apresentada, em

virtude de não se dispor de informação consistente sobre a data da colheita fecal, para muitos dos animais estudados.

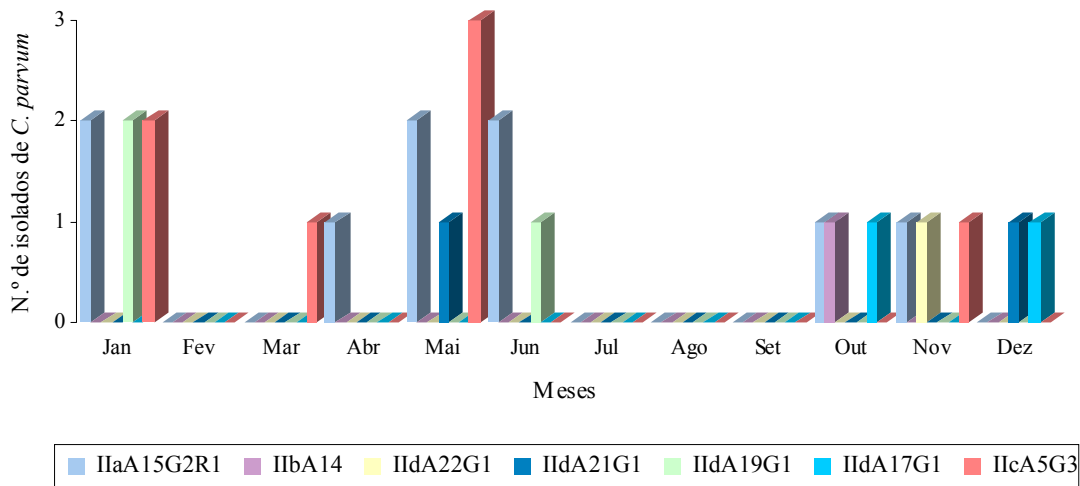


FIGURA 29 – Representação gráfica da distribuição dos isolados humanos de *C. parvum* com os diferentes subtipos do gene GP60, em função dos meses do ano

Por fim, os resultados da caracterização do gene GP60 foram comparados com os do locus ML2 (figura 30).

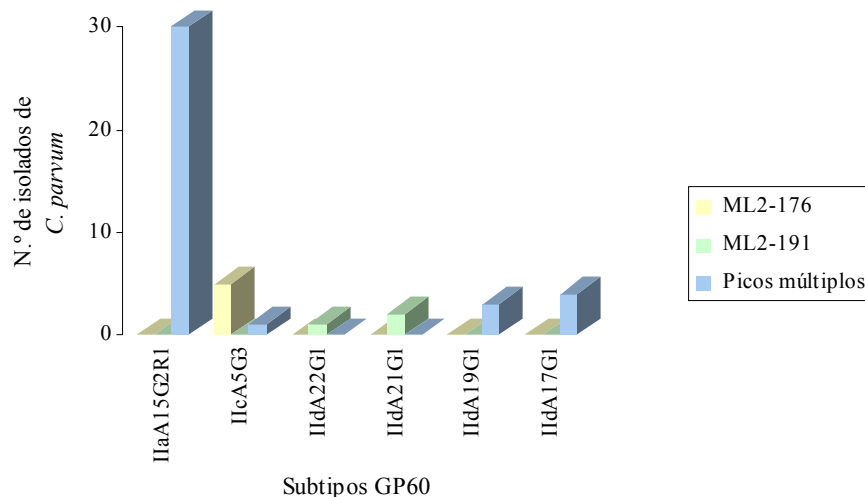


FIGURA 30 – Representação gráfica da relação entre os alelos e os subtipos de *C. parvum* obtidos, respectivamente, por caracterização dos loci ML2 e GP60

Em *C. hominis*, como não se registaram polimorfismos no *locus* ML2, a todos os subtipos GP60 corresponde, sempre, o alelo ML2-179. No que respeita a *C. parvum*, conforme se observa na figura 30, os cinco isolados com o alelo ML2-176 pertencem à família IIc – subtipo IIcA5G3 –, os três isolados com o alelo ML2-191 apresentam dois dos subtipos da família IId – IIdA22G1 e IIdA21G1 – e, aqueles em que foram observados picos múltiplos distribuem-se, na sua maioria, pelo subtipo IIaA15G2R1 mas, também, pelos outros dois da família IId – IIdA19G1 e IIdA17G1 – e pelo IIcA5G3. O número muito limitado de parasitas em que foi possível caracterizar o *locus* ML2, impossibilitou a realização de qualquer inferência estatística que permitisse avaliar a eventual associação entre os alelos deste *locus* e os subtipos do gene GP60.

3. DISCUSSÃO

A amplificação dos *loci* ML2 e GP60 foi bem sucedida em, respectivamente, 62,9% (56/89) e 68,5% (124/181) dos isolados de *C. hominis* e de *C. parvum* estudados (quadros XXV e XXVII). Contudo, estes valores escondem as assimetrias verificadas na amplificação do DNA dos parasitas de diferentes hospedeiros. Nos criptosporídeos de humanos, tanto no *locus* ML2, como no GP60 (excluindo os parasitas conservados em MIF), a taxa de sucesso da PCR (84,4% – 27/32 e 94,7% – 36/38, respectivamente) foi superior à daqueles com origem no gado bovino e nos Bovídeos do Jardim Zoológico (50,9% – 29/57 e 69,8% – 81/116, respectivamente). Também nas PCR's dos genes SSU-rRNA, COWP, DHFR e TRAP-C1, a percentagem de sucesso de amplificação do DNA dos isolados humanos foi superior à da dos restantes animais (*vide* capítulo V, quadro XVI e capítulo VI, quadro XXI). Conforme já discutido no capítulo VI, na base desta diferença pode encontrar-se a presença, nas fezes dos ruminantes, de compostos de origem vegetal com acção inibidora sobre a reacção de PCR, como o ácido fítico e polissacáridos. A percentagem de sucesso da PCR do *locus* GP60 foi superior à do *locus* ML2, quer nos isolados de humanos (excluindo os que se encontravam preservados em MIF), quer nos de gado bovino e de Bovídeos do Jardim Zoológico (quadros XXV e XXVII); esta situação pode ser justificada pelo facto de a amplificação do gene GP60 ter sido realizada por uma reacção “nested” e, a do *locus* ML2, por uma reacção simples, que se sabe ser menos sensível do que a primeira. A percentagem de

amplificação do *locus* GP60 apresentou, nos parasitas dos vários grupos de hospedeiros (quadro XXVII), valores que, embora próximos, foram inferiores aos registados para a PCR do *locus* SSU-rRNA (*vide* capítulo V, quadro XVI e capítulo VI, quadro XXI); tendo ambos os genes sido amplificados por reacções “nested”, a maior sensibilidade da amplificação do gene SSU-rRNA, pode ser o reflexo da existência de cinco cópias deste gene contra, apenas, uma do gene GP60 [Le Blancq *et al.*, 1997; Cevallos *et al.*, 2000]. Para além dos factores já referidos, a ausência de amplificação dos *loci* ML2 e GP60, que se registou em alguns isolados, pode, também, ser justificada pela carga parasitária baixa observada na maioria das amostras fecais em que não se obteve amplificação.

No *locus* ML2, a presença de múltiplos picos nos electroforetogramas (figura 21) impossibilitou a identificação do alelo de 82,6% (38/46) dos isolados de *C. parvum* com amplificação positiva (quadro XXVI). A observação de múltiplos picos, em vez de um único, correspondente ao alelo que se pretende identificar, tem sido descrita por diversos autores, ao amplificarem, por PCR, vários *loci* de STR's, sobretudo mono e dinucleotídicos [Hauge e Litt, 1993; Hite *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1996; Clarke *et al.*, 2001]. Após a amplificação do microssatélite (CA)₁₈, Clarke *et al.* (2001) verificaram que, apenas, 33% dos fragmentos formados durante a PCR apresentavam a dimensão correcta. Os picos múltiplos correspondem a fragmentos que são sintetizados durante a reacção de PCR, ao que se pensa, segundo um modelo de deslizamento da cadeia de DNA. De acordo com este modelo, durante a síntese da região de repetição ocorre a separação entre a cadeia de DNA molde e a que está em formação, permitindo que, na primeira, uma ou mais unidades de repetição formem uma estrutura em forma de ansa. Assim, no final da síntese, a cadeia recém-formada encontra-se encurtada pelo número de unidades de repetição que formaram a ansa. Caso a sua formação aconteça na cadeia que está a ser sintetizada, ela apresentará, no final, mais unidades de repetição do que o DNA molde. Os fragmentos assim sintetizados são, em seguida, utilizados como molde para a síntese de novas cadeias nos ciclos subsequentes [Hauge e Litt, 1993; Hite *et al.*, 1996]. Segundo Walsh *et al.* (1996), a formação destes fragmentos adicionais é tanto maior, quanto maior for o número de unidades de repetição, presentes no DNA molde. Os resultados obtidos, no presente trabalho, são concordantes com esta observação, uma vez que os isolados em que se obtiveram os múltiplos picos foram aqueles cujos fragmentos, correspondentes a cada pico, exibiam dimensões entre 187 e 239 nucleótidos e que, provavelmente, apresentariam um dos alelos já descritos por Cacciò *et al.* (2001), em que o número de repetições AG varia entre 11

e 33. Os isolados em que não se verificaram os problemas dos múltiplos picos, foram aqueles que apresentavam os alelos ML2-176 e ML2-179, nos quais existem, respectivamente, quatro e três unidades de repetição AG (figura 20). Com o objectivo de eliminar a formação dos fragmentos adicionais, durante a PCR, diversos autores testaram várias polimerases do DNA termofílicas, com e sem actividade exonucleolítica 3'→5', não tendo, no entanto, conseguido solucionar este problema [Walsh *et al.*, 1996; Hite *et al.*, 1996; Clarke *et al.*, 2001]. A actividade exonucleolítica 3'→5' das polimerases corrige os erros de incorporação, aumentando a fidelidade da cadeia neo-sintetizada, relativamente à cadeia molde. A alteração de outras condições da reacção, que se sabe influenciarem, também, a fidelidade da síntese do DNA, como o pH ou a concentração de dNTPs ou do íão magnésio foi, igualmente, ineficaz [Hite *et al.*, 1996]. No presente trabalho, apenas a utilização de DMSO, em combinação com o aumento da temperatura de ligação, permitiu, nalguns casos, eliminar os múltiplos picos observados nos electroforetogramas, nomeadamente, nos de três parasitas da espécie *C. parvum* em que foi identificado o alelo ML2-191, que contém 13 repetições da unidade AG. Os fragmentos correspondentes aos múltiplos picos observados nos electroforetogramas destes três isolados apresentavam dimensões entre 187 e 193 nucleótidos. Nos casos em que os vários fragmentos sintetizados durante a PCR apresentavam dimensões superiores a 199 nucleótidos, o problema dos múltiplos picos não foi solucionado. O DMSO é um composto orgânico frequentemente adicionado à mistura reaccional da PCR, com o objectivo de melhorar o rendimento e a especificidade da amplificação [Cheng *et al.*, 1994; Chakrabarti e Schutt, 2001]. O aumento da temperatura de ligação aumenta a estringência da reacção e, conseqüentemente, a especificidade da amplificação.

Conforme descrito no quadro XXVI, não foi observada variação intra-específica em *C. hominis*, apresentando todos os parasitas estudados o alelo ML2-179. Entre os isolados de *C. parvum* de origem humana, 29,4% (5/17) e 17,6% (3/17) apresentavam, respectivamente, os alelos ML2-176 e ML2-191 [Alves *et al.*, 2003a]. Estes dois alelos não foram, contudo, encontrados em nenhum isolado de *C. parvum* de bovinos ou de Bovídeos do Jardim Zoológico. Em Itália, Cacciò *et al.* (2001) obtiveram, por sequenciação do mesmo *locus*, resultados diferentes dos acima descritos: i) o alelo ML2-191 foi identificado, respectivamente, em 11,1% (1/9) e 20% (10/50) dos isolados de *C. parvum* de humanos e de gado bovino e ovino; ii) o alelo ML2-176 não foi encontrado em nenhum parasita; iii) o alelo ML2-187 foi descrito, respectivamente, em 33,3% (3/9) e 42% (21/50) dos isolados de *C.*

parvum de humanos e de gado bovino, ovino e caprino; iv) o alelo ML2-193, foi descrito em 12% (6/50) dos isolados de *C. parvum* de gado bovino, ovino e caprino. Em Portugal, estes dois últimos alelos (ML2-187 e ML2-193) não foram encontrados em nenhum parasita da espécie *C. parvum*. Os restantes alelos deste locus (ML2-213, ML2-227, ML2-229 e ML2-231), descritos por Cacciò *et al.* (2001), em isolados de humanos e/ou de gado bovino, ovino e caprino, não foram identificados devido à observação de múltiplos picos nos respectivos electroforetogramas. No entanto, as dimensões determinadas para os fragmentos correspondentes aos diversos picos (entre 199 e 239 nt) deixam prever a presença desses alelos, em alguns dos parasitas. No presente trabalho foram descritos dois novos alelos, ambos em isolados humanos, um em *C. hominis* (ML2-179) e outro em *C. parvum* (ML2-176). O facto de, em Portugal, os alelos ML2-176 e ML2-191 terem sido encontrados nos parasitas de origem humana, mas não nos dos bovinos e dos Bovídeos do Jardim Zoológico, sugere que a sua transmissão possa ocorrer pela via antroponótica e não pela zoonótica. As diferenças verificadas entre os resultados obtidos no presente trabalho e os encontrados em Itália, parecem indicar a existência de alguma variação geográfica na distribuição dos diversos alelos. Situação idêntica foi, também, observada por caracterização do locus G35348, em criptosporídeos de origem humana e bovina, na Dinamarca e em Itália. Na Dinamarca, Enemark *et al.* (2002a) encontraram, em *C. parvum* de humanos, sobretudo, os alelos C2 e C3, não tendo observado a presença do alelo C4. Em Itália, os principais alelos encontrados, em isolados semelhantes, foram o C1 e o C4, não tendo sido identificado nenhum parasita com o alelo C3 [Cacciò *et al.*, 2001]. Nos isolados de bovinos e ovinos, verificou-se situação idêntica: enquanto que, em Itália, foram encontrados os alelos C1, C2 e C4, mas não o C3, na Dinamarca foram identificados os alelos C1, C2 e C3, mas não o C4 [Cacciò *et al.*, 2001; Enemark *et al.*, 2002a]. As diferenças geográficas na distribuição dos diferentes parasitas, evidenciadas pelos resultados destes trabalhos, podem ser o reflexo de diferenças na epidemiologia da criptosporidiose em regiões distintas. Contudo, dado o reduzido número de isolados e a limitada diversidade de regiões estudadas é, ainda, precoce atribuir significado epidemiológico a estas observações.

Nos casos em que foi possível identificar o alelo dos isolados de *C. hominis* ou de *C. parvum*, os resultados da análise de fragmentos por metodologia fluorescente foram coincidentes com os obtidos por sequenciação do fragmento ML2 amplificado. Assim, a técnica de análise de fragmentos por metodologia fluorescente mostrou ser, para este tipo de

estudos, uma alternativa mais rápida, de custo menor e tão eficiente quanto a sequenciação. Contudo, a caracterização do *locus* ML2 revelou ser de pouca utilidade em estudos epidemiológicos, em virtude não só da inexistência de variabilidade em *C. hominis*, como das dificuldades de amplificação dos alelos com um elevado número de repetições da unidade dinucleotídica AG.

A caracterização do gene GP60 mostrou ser muito superior à do *locus* ML2, não só ao nível da taxa de sucesso e qualidade da reacção de amplificação, como, também da variabilidade genética existente, sobretudo, em *C. hominis*. A percentagem de sucesso da PCR, obtida para a amplificação do gene GP60, apresentou-se próxima da verificada na amplificação do gene SSU-rRNA, principalmente nos parasitas humanos (excluindo os preservados em MIF) e nos de gado bovino (*vide* capítulos V, quadro XVI e capítulo VI, quadro XXI). Através da amplificação do gene GP60, foi possível caracterizar dez isolados que não haviam sido identificados anteriormente, devido ao insucesso da amplificação dos genes SSU-rRNA, COWP, DHFR e TRAP-C1. Deste grupo de dez parasitas, fazia parte um isolado humano que apresentava o subtipo IIdA17G1, tendo, assim, sido identificado como pertencente à espécie *C. parvum*, elevando para 27 o número de doentes com infecção por esta espécie de *Cryptosporidium* (*vide* capítulo V, quadro XVII). Nos restantes nove isolados, o subtipo IIaA16G2R1 foi identificado em três de origem bovina e, o IIaA15G2R1, em quatro de bovinos, um de gamos da Tapada de Mafra e um de Bovídeos do Jardim Zoológico. Deste modo, todos eles foram identificados como *C. parvum*, elevando para 80, quatro e 11 o número de parasitas desta espécie, encontrados, respectivamente, no gado bovino, nos gamos da Tapada de Mafra e nos Bovídeos do Jardim Zoológico de Lisboa (estudados em 1996 e em 1998-1999) (*vide* capítulo VI, quadro XXIII).

Os resultados da caracterização do gene GP60 evidenciam a existência de grande variabilidade genética nos isolados de *C. hominis* e de *C. parvum* que infectam o Homem e outros animais em Portugal. Os isolados de *C. parvum* distribuíram-se por quatro famílias de subtipos e oito subtipos e, os de *C. hominis*, por cinco famílias e o mesmo número de subtipos (figura 23). Somente em *C. parvum*, foram identificadas famílias compreendendo mais do que um subtipo, nomeadamente a IIa e a IId. Nos parasitas estudados no presente trabalho, foram encontradas todas as famílias actualmente conhecidas, à excepção das IIe e IIf. Até à data, a família IIe foi identificada em isolados de quatro crianças, uma no Malawi e três no Quénia; a família IIf foi encontrada, somente, num parasita de uma criança no Kuwait [Peng *et al.*, 2003a;

Sulaiman *et al.*, 2005; Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. As famílias I Ib e I Id foram identificadas, pela primeira vez, em isolados portugueses [Peng *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2003b]. A família I Ib não foi encontrada em parasitas de outras regiões. Deste modo, o isolado português, de um doente com infecção por VIH, constitui o único parasita onde, até à data, foi identificada esta família. Quanto à família I Id, ela foi, posteriormente, identificada no Kuwait, em 46,8% (29/62) dos isolados de crianças estudados [Sulaiman *et al.*, 2005]. Contudo, os dois subtipos encontrados nos parasitas daquelas crianças (I IdA20G1 e I IdA18G1) são diferentes dos identificados em Portugal (I IdA22G1, I IdA21G1, I IdA19G1 e I IdA17G1).

A comparação dos resultados da caracterização do *locus* GP60 obtidos para os parasitas da espécie *C. parvum* de humanos e de outros animais (quadro XXVIII, figuras 25 e 26), coloca em evidência a disparidade no número de subtipos encontrado nos isolados dos hospedeiros humanos e não humanos, com os primeiros a apresentarem maior diversidade de subtipos do que os segundos. Todos os criptosporídeos dos Bovídeos do Jardim Zoológico de Lisboa, um de gamos da Tapada de Mafra, um de ovinos e 94,4% (68/72) dos de bovinos pertencem à mesma família de subtipos – I Ia. À excepção de sete parasitas de origem bovina, que apresentam o subtipo I IaA16G2R1, todos os outros têm o mesmo subtipo – I IaA15G2R1. Este último foi, também, identificado em nove isolados de origem humana. Os restantes quatro isolados de bovinos e o segundo dos dois isolados de ovinos pertencem à família I Id; no entanto, enquanto os primeiros apresentam o subtipo I IdA17G1, o segundo apresenta o I IdA21G1. A infecção de gamos da Tapada Nacional de Mafra por parasitas do subtipo I IaA15G2R1, responsáveis, também, por vários casos de criptosporidiose humana, salienta o potencial zoonótico da infecção nestes animais silváticos de vida livre; a contaminação do solo com fezes destes animais, a eventual contaminação da água da Ribeira de Safarujo com oocistos e a sua dispersão em campos agrícolas e na Praia de São Lourenço (*vide* características orográficas e hidrológicas da Tapada de Mafra, capítulo VI), poderão contribuir para a transmissão da infecção por estes parasitas ao Homem. O facto de animais silváticos e gado doméstico se encontrarem naturalmente infectados, por isolados de *C. parvum* com o mesmo subtipo, aponta para a possibilidade de transmissão desta espécie entre os dois tipos de hospedeiro e suporta a hipótese, colocada por alguns autores, de que, em situações de partilha do habitat, os primeiros podem constituir reservatórios da infecção para os segundos e vice-versa [Sturdee *et al.*, 1999; Perz e Le Blancq, 2001; Fayer, 2004; Olson *et al.*, 2004]. A família I Ia e os seus inúmeros subtipos têm sido, frequentemente, encontrados em parasitas de

humanos e de bovinos. Diversos autores descreveram infecções humanas, devidas a isolados de *C. parvum* com subtipos da família IIA (IIA13G2R1, IIA15G2R1, IIA16G2R1, IIA17G1R1, IIA18G3R1 e IIA20G3R1, entre outros), em regiões tão distintas quanto a Austrália, os Estados Unidos da América, o Reino Unido, o Japão, a Eslovénia ou o Kuwait [Peng *et al.*, 2001; Sulaiman *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2003; Chalmers *et al.*, 2005; Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. Na Irlanda do Norte, Glaberman *et al.* (2002) também encontraram, em amostras fecais de doentes infectados durante dois surtos hídricos, parasitas pertencentes a esta família. O subtipo IIA15G2R1, encontrado na maioria dos isolados bovinos por nós estudados, foi identificado em isolados de bovinos em três cidades do Japão e nos Estados do Ohio, Iowa, Minnesota, Alabama, Georgia, Idaho e Kansas, nos EUA [Peng *et al.*, 2003b; Wu *et al.*, 2003]. Ainda, nos EUA, Peng *et al.* (2003b) identificaram, em 34 isolados de *C. parvum* de gado bovino, de oito explorações leiteiras do Estado do Michigan, seis subtipos pertencentes à família IIA, entre eles os dois identificados em Portugal; dois dos seis subtipos encontrados foram, igualmente, identificados em isolados humanos da mesma região. No Peru, foram, também, encontrados, em criptosporídeos de origem bovina, diversos subtipos da família IIA [Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. A grande variabilidade de subtipos, observada nos isolados de bovinos nos EUA e no Peru, contrasta com os resultados obtidos em Portugal, em que a maioria dos parasitas de gado bovino estudados apresenta o mesmo subtipo. A esta particularidade, registada no nosso País, junta-se, ainda, outra, a da infecção de gado doméstico, por parasitas com subtipos pertencentes à família IID. A infecção de hospedeiros não humanos por isolados pertencentes à família IID, foi documentada, unicamente, em Portugal e em Itália. Neste último país, Wu *et al.* (2003) identificaram, num isolado de uma cabra, o subtipo IID18G1, o mesmo encontrado em crianças no Kuwait, tendo-o denominado de IIC, sem atender à nomenclatura já existente; no entanto, a análise da sua sequência nucleotídica revelou tratar-se do subtipo IID18G1. Dada a escassez de estudos de caracterização do gene GP60, em isolados de gado doméstico na Europa, desconhece-se se os casos de infecção de gado doméstico por parasitas com subtipos da família IID, registados em Portugal e em Itália, são pontuais ou, ao invés do que sucede noutras regiões do Mundo, são algo que ocorre, com frequência, no Velho Continente. Em Portugal, outra das famílias de subtipos encontradas em *C. parvum* foi a IIC; no entanto, ela foi identificada, apenas, em parasitas humanos e não nos de gado doméstico ou de animais silváticos. Esta situação verificou-se, também, no Peru, tendo a família IIC sido encontrada em isolados de crianças e

de doentes com SIDA, mas não de gado bovino, sugerindo que, neste País, a transmissão de *C. parvum* ao Homem possa ocorrer, exclusivamente, pela via antroponótica [Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. Esta família tem sido encontrada em isolados humanos de várias regiões, nomeadamente em crianças no Malawi, no Kuwait, na África do Sul e no Quênia e, em doentes com SIDA, na cidade de Nova Orleães, nos EUA [Leav *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003a; Sulaiman *et al.*, 2005; Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. Não se conhecem, até à data, infecções de hospedeiros não humanos por parasitas pertencentes a esta família [Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. A infecção humana por parasitas da espécie *C. parvum* de famílias/subtipos não encontrados em isolados responsáveis pela criptosporidiose em gado doméstico e animais silváticos, sugere a existência de parasitas, inicialmente considerados zoonóticos, cuja transmissão ao Homem ocorre, apenas, pela via antroponótica. Na Escócia, Mallon *et al.* (2003b), estudaram, em isolados de *C. parvum* de humanos, de bovinos e de ovinos, sete *loci* de microssatélites. Após combinação dos alelos encontrados, para cada isolado e cada *locus*, identificaram 48 haplotipos diferentes, distribuídos por três grupos: dois que compreendiam nove haplotipos e que foram encontrados, somente, em isolados humanos e um que compreendia os demais 39 haplotipos, que foram encontrados tanto em isolados humanos, como de bovinos e ovinos. Estes resultados sugerem a existência de dois grupos distintos de parasitas da espécie *C. parvum*, um transmitido ao Homem, exclusivamente, pela via antroponótica e, outro, associado à transmissão zoonótica ou a ambas as vias de transmissão. Estes resultados são idênticos aos observados nos isolados de *C. parvum* estudados no presente trabalho. Assim, o facto de, em Portugal, os isolados humanos se distribuírem tanto por subtipos não encontrados noutros animais (IIBa14, IIcA5G3, IIDa19G1 e IIDa22G1), como, por outros, presentes, também, em parasitas de gado bovino e ovino e de ruminantes silváticos (IIaA15G2R1, IIDa17G1 e IIDa21G1), sugere que, no nosso País, existem grupos distintos de parasitas pertencentes à espécie *C. parvum*: aqueles cuja transmissão ao Homem ocorre, unicamente, pela via antroponótica e os que se encontram envolvidos na transmissão zoonótica e, possivelmente, também na antroponótica. Todavia, é importante realçar que estas hipóteses assentam nos resultados actualmente existentes, alguns dos quais, em particular os obtidos no presente trabalho, baseados na caracterização de um número muito limitado de isolados. No futuro, a caracterização de um grupo de parasitas mais vasto, poderá originar resultados susceptíveis de interpretações diferentes. No caso português, a interpretação dos resultados obtidos é, ainda, limitada, pelo facto de, na sua maioria, isolados humanos e de

outros animais serem provenientes de regiões distintas do País, sendo desejável que, no futuro, para além de se aumentar o número de parasitas estudados, a origem geográfica dos parasitas de humanos e de outros animais seja, também, a mesma.

Em Portugal, apesar da grande variabilidade de subtipos encontrada em *C. hominis*, dois terços (10/15) pertencem a uma única família/subtipo (Ib/IbA10G2) (quadro XXVIII). Parasitas com subtipos pertencentes à família Ib foram, também, identificados em crianças no Peru, no Quênia, na Índia, no Malawi, na África do Sul e no Kuwait, em adultos na Austrália, em Itália e na China e, em doentes com SIDA, no Peru e na cidade de Nova Orleães, nos EUA; no Malawi e na China não foi encontrado o subtipo IbA10G2 [Peng *et al.*, 2001; Leav *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003a; Wu *et al.*, 2003; Chalmers *et al.*, 2005; Sulaiman *et al.*, 2005; Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. Isolados pertencentes à família Ib, foram, também, identificados, na Irlanda do Norte, em indivíduos infectados durante dois surtos hídricos [Glaberman *et al.*, 2002]. O subtipo IbA10G2, encontrado em Portugal, foi, ainda, identificado como causa de dois surtos, um hídrico na cidade de Gainesville e um alimentar em Washington, DC, ambos nos EUA [Sulaiman *et al.*, 2001]. Entre os isolados portugueses de *C. hominis*, somente um apresentava um subtipo da família If; este parasita pertencia a um doente regressado da Guiné-Bissau três meses antes (*vide* capítulo V, quadro XIX, isolado CH.73). A família If foi encontrada, apenas, na África do Sul, em isolados de cinco crianças com infecção por VIH; três das cinco crianças apresentavam o mesmo subtipo identificado em Portugal (IfA14G1), enquanto que as outras duas exibiam dois subtipos diferentes [Leav *et al.*, 2002]. A família a que pertenciam os parasitas destas crianças foi, inicialmente, denominada como Ie; contudo, essa denominação já havia sido atribuída a outra sequência diferente, pelo que, a identificada por Leav *et al.* (2002) foi renomeada de If [Alves *et al.*, 2003b]. Em Portugal, as famílias Ia e Id encontram-se, também, representadas por um único isolado. Ambos os parasitas pertenciam a doentes regressados, recentemente, do continente africano; o isolado com o subtipo IaA19R3 correspondia a um indivíduo residente em Angola (*vide* capítulo V, quadro XIX, isolado CH.113) e o que apresentava o subtipo IdA15 a um doente regressado, desse mesmo País, dois meses antes (*vide* capítulo V, quadro XIX, isolado CH.71). Criptosporídeos apresentando os diversos subtipos das famílias Ia e Id foram encontrados em indivíduos de vários países, nomeadamente do Peru, do Malawi, do Quênia, da Índia e da África do Sul [Peng *et al.*, 2001; Leav *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003a; Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. Infecções humanas por parasitas da família Id, foram, ainda, encontradas na China, na Austrália e no Kuwait [Peng *et*

al., 2001; Sulaiman *et al.*, 2001, 2005]. Sulaiman *et al.* (2001) e Wu *et al.* (2003) documentaram, também, casos de criptosporidiose humana devidos a parasitas com subtipos da família Ia no Japão, no Nepal e na cidade de Nova Orleães, nos EUA. No presente trabalho, foram, ainda, identificados dois isolados pertencentes à família Ie que foi, igualmente, encontrada no Peru, no Kuwait, no Malawi, na Índia, no Quênia, na Guatemala, no Japão, na China e na cidade de Nova Orleães, nos EUA. Os subtipos encontrados nestas duas últimas localizações foram diferentes do observado em Portugal – IeA11G3T3 [Peng *et al.*, 2001; Sulaiman *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2003a; Wu *et al.*, 2003; Sulaiman *et al.*, 2005; Xiao, L., 2005, comunicação pessoal]. No presente estudo, todos os isolados de *C. hominis* pertencentes às famílias Ib e Ie, correspondiam a doentes em que não era conhecida história de permanência no estrangeiro. Dos três doentes infectados com parasitas pertencentes às famílias Ia, Id e If, todos africanos, um era residente em Angola e os outros dois haviam regressado, recentemente, de Angola e da Guiné-Bissau. Estes resultados colocam a hipótese de as infecções, por parasitas com os subtipos das famílias Ia, Id e If, terem ocorrido fora de Portugal e de a transmissão de *C. hominis* no nosso País envolver, essencialmente, isolados pertencentes a outras famílias, em particular a Ib e, também, a Ie. Esta é uma questão que fica em aberto, em consequência do número de parasitas da espécie *C. hominis*, identificados no decorrer do presente trabalho, ter sido reduzido.

No que respeita à avaliação de eventual variação geográfica na distribuição dos subtipos identificados nos criptosporídeos de bovinos, o IIA15G2R1, o mais representado entre aqueles hospedeiros, foi encontrado em todos os Concelhos, excepto no de Odemira (figura 27). O Concelho de Montemor-o-Novo foi aquele em que se observou maior número de isolados com este subtipo; contudo, este resultado reflecte, também, a dimensão da amostra estudada que, neste Concelho, foi entre quatro a 10 vezes superior à dos restantes (*vide* Material e Métodos, quadro VI). Da observação da figura 27, sobressai, ainda, o facto de todos os isolados do subtipo IID17G1 pertencerem a animais de explorações do Concelho de Odemira, desconhecendo-se a razão de tal sucedido. Todavia, o número de parasitas, caracterizados em cada Concelho, foi, à excepção do de Montemor-o-Novo, muito reduzido; deste modo, desconhece-se se o isolamento dos parasitas com o subtipo IID17G1, em Odemira, se continuaria a verificar, caso o número de isolados estudados nos demais Concelhos tivesse sido superior. Relativamente à inexistência, também no Concelho de Odemira, de isolados com os subtipos IIA15G2R1 e IIA16G2R1, desconhece-se se a

situação seria alterada, caso tivessem sido caracterizados mais parasitas provenientes deste Concelho. Todas estas circunstâncias limitaram a avaliação da eventual variação geográfica na distribuição dos isolados de bovinos com os diversos subtipos do gene GP60. No que se refere à variação sazonal da infecção humana, os resultados obtidos não parecem evidenciar nenhuma variação deste teor na ocorrência de infecções por *C. hominis* e por *C. parvum* com os diferentes subtipos identificados (figuras 28 e 29). O facto de cada subtipo se encontrar representado por um número reduzido de isolados, confere à análise destes resultados um alcance muito restrito.

A comparação dos resultados da caracterização dos *loci* ML2 e GP60 foi, também, limitada, não só pela ausência de variabilidade no *locus* ML2, verificada em *C. hominis*, como pelas dificuldades de caracterização do mesmo, que se registaram, sobretudo, nos isolados de *C. parvum* de ruminantes domésticos e silváticos. A aparente associação do alelo ML2-176 com o subtipo IIcA5G3 e do ML2-191 com os subtipos IIdA21G1 e IIdA22G1 não pode ser fundamentada com tão baixo número de isolados (figura 30). Por outro lado, desconhece-se quais os alelos ML2 presentes no grupo de parasitas em que se observaram os múltiplos picos.

A elevada taxa de amplificação registada no gene GP60, aliada à grande variabilidade genética, existente neste *locus*, mostrou que a sua caracterização pode ser uma ferramenta de grande utilidade no estudo da epidemiologia molecular da criptosporidiose. Os resultados obtidos pela caracterização deste gene, em Portugal e noutras regiões do Mundo, evidenciam diferenças na distribuição de alguns subtipos e famílias de subtipos, em parasitas de várias regiões geográficas. Para além disso verifica-se, também, maior frequência de infecções devidas a determinadas famílias e subtipos. Estas observações podem reflectir diferenças na epidemiologia da criptosporidiose entre diferentes regiões. Em Portugal, os resultados obtidos, sugerem que alguns parasitas da espécie *C. parvum* são transmitidos ao Homem, somente, pela via antroponótica, enquanto que outros são veiculados pela via zoonótica ou por ambas as vias de transmissão. Todavia, dada a grande variabilidade de subtipos e respectivas famílias conhecidos, para a clarificação da dinâmica da transmissão da criptosporidiose, em cada região, será necessário caracterizar um número de isolados bastante mais vasto do que o até aqui estudado.

Capitula VIII



CONCLUSÃO

No período compreendido entre Junho de 2001 e Janeiro de 2005, a percentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp. encontrada na população de infectados por VIH, com sintomatologia gastrointestinal, estudada foi de 8,3%.

No que se refere aos animais de companhia, foram obtidas percentagens de infecção em gatos com dono de 1,8% e em cães com e sem dono de 0%. Quanto aos animais silváticos de vida livre (carnívoros e pequenos mamíferos), em nenhum dos animais estudados foi encontrada infecção por *Cryptosporidium* spp.. Relativamente aos animais silváticos em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa, foram observados oocistos em, apenas, três amostras fecais, duas pertencentes a dois mamíferos – um bisonte americano e um gnu de cauda branca – e, a outra, a um réptil – uma tartaruga estrela indiana.

Os resultados da caracterização molecular de isolados humanos de *Cryptosporidium* spp. mostraram que, na população portuguesa estudada, a espécie *C. parvum* foi a responsável por mais de metade dos casos de criptosporidiose, seguindo-se-lhe *C. hominis* e, com menor frequência, *C. felis* e *C. meleagridis*.

A caracterização molecular dos parasitas detectados nos gatos mostrou que *C. felis* foi a espécie causadora da infecção naqueles animais. A baixa percentagem de infecção por *C. felis* encontrada na população felina, leva a supor que o risco de transmissão zoonótica deste parasita ao Homem seja reduzido. Contudo, a identificação desta espécie em cinco doentes infectados por VIH, deixa em aberto a questão da importância destes animais enquanto reservatórios da infecção humana. No que se refere aos cães, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, estes não parecem ser reservatórios importantes da infecção para o Homem, não só por não terem sido encontrados animais parasitados, como, também, pelo facto de, em Portugal, não ser conhecido nenhum caso de criptosporidiose humana causado por parasitas da espécie *C. canis*.

A caracterização molecular de isolados de gado bovino jovem, de várias regiões de Portugal Continental e dos Açores, e de gado ovino revelou que a maioria das infecções nestes animais foi provocada por parasitas da espécie *C. parvum*. Apenas uma pequena fracção das infecções nos bovinos foi associada a parasitas pertencentes às espécies *C. bovis* e *C. andersoni* e ao genótipo semelhante ao do gamo; nenhuma destas duas espécies ou genótipo foi, até à data, encontrada em infecções humanas. Os resultados da identificação da espécie dos parasitas detectados em gamos da Tapada Nacional de Mafra e em Bovídeos do

Jardim Zoológico de Lisboa mostraram que a espécie *C. parvum* foi, também, a principal causadora da infecção nestes ruminantes silváticos. Para além desta espécie, no Jardim Zoológico de Lisboa, foram, ainda, encontrados três genótipos de *Cryptosporidium* spp.: o genótipo rato e um genótipo novo, respectivamente, num bisonte americano e num gnu de cauda branca, e o genótipo tartaruga, numa tartaruga estrela indiana; estes três genótipos não foram, até à data, associados a infecções humanas. O facto de gado doméstico (bovino e ovino) e ruminantes silváticos se encontrarem infectados por *C. parvum* que é, também, a espécie responsável pela maioria dos casos de criptosporidiose humana em Portugal, faz destes hospedeiros possíveis reservatórios da parasitose humana; deste modo, caso se verifiquem condições epidemiológicas favoráveis, a infecção nestes animais, poderá constituir fonte de contaminação para o Homem, quer por contacto directo com os animais infectados, quer indirecto, através da água ou de alimentos contaminados. Contudo, é importante salientar que a presença de *C. parvum*, tanto em gado doméstico e ruminantes silváticos, como em humanos, não constitui, por si só, evidência da ocorrência de transmissão zoonótica, na medida em que a hipótese da transmissão antroponótica desta espécie não pode, também, ser excluída.

A caracterização do gene GP60, permitiu identificar nove famílias de subtipos, cinco em *C. hominis* e quatro em *C. parvum*. Entre os parasitas desta última espécie, os de origem humana apresentavam maior variabilidade de subtipos do que a exibida pelos de gado doméstico e de ruminantes silváticos. A maioria dos parasitas pertencentes a estes dois últimos grupos de hospedeiros apresentava o mesmo subtipo (IIaA15G2R1), aquele que encontramos, também, em 36% dos casos de criptosporidiose humana por *C. parvum*. Os isolados deste subtipo parecem apresentar ampla distribuição geográfica, tendo sido encontrados em gado bovino de várias regiões do Centro e Centro-Sul de Portugal e, também, dos Açores. Os resultados da caracterização intra-específica de *C. parvum* permitiram distinguir dois grupos de parasitas: i) os que apresentam subtipos identificados em infecções no Homem, em gado doméstico e em ruminantes silváticos; ii) os que apresentam subtipos encontrados, somente, em infecções humanas. Estes resultados levam-nos a considerar que os parasitas pertencentes ao primeiro grupo possam ser transmitidos ao Homem, quer pela via zoonótica, quer pela antroponótica, enquanto que, os pertencentes ao segundo, parecem encontrar-se envolvidos, unicamente, na transmissão antroponótica. Assim, contrariamente ao que poderíamos inicialmente pensar, para além do gado doméstico e dos ruminantes

silváticos, o Homem pode, também, ser considerado como reservatório da infecção humana por parasitas da espécie *C. parvum*. Em suma, em Portugal, a transmissão da espécie *C. parvum* ao hospedeiro humano parece processar-se de modo complexo, envolvendo parasitas cuja transmissão ocorre através de ciclos zoonóticos e antroponóticos, que podem interagir entre si, e outros que são veiculados, unicamente, em ciclos antroponóticos.

Os resultados que obtivemos demonstraram, também, que a identificação das diferentes espécies e genótipos dos parasitas do género *Cryptosporidium* só pode ser conseguida através da sua caracterização molecular. Esta identificação reveste-se de grande importância, na medida em que permite conhecer quais as espécies e genótipos infectantes para o Homem e avaliar o risco que a infecção em animais domésticos e silváticos e a contaminação dos recursos hídricos constitui para a saúde pública, contribuindo para a melhor compreensão dos diversos aspectos da epidemiologia da criptosporidiose e gerando informação essencial ao desenvolvimento de medidas que visem reduzir ou eliminar a transmissão de *Cryptosporidium* spp. ao Homem.

Capítulo IX



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, N.; SAWANO, Y.; YAMADA, K.; KIMATA, I. E ISEKI, M. (2002) – *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan – *Vet Parasitol*, **108**(3): 185-193
- ABE, N. E ISEKI, M. (2003) – Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan – *Parasitol Res*, **89**(5): 422-424
- ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J.E.; ZHU, G.; LANCTO, C.A.; DENG, M.; LIU, C.; WIDMER, G.; TZIPORI, S.; BUCK, G.A.; XU, P.; BANKIER, A.T.; DEAR, P.H.; KONFORTOV, B.A.; SPRIGGS, H.F.; IYER, L.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. E KAPUR, V. (2004) – Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum* – *Science*, **304**(5669): 441-445
- ADJEI, A.A.; ARMAH, H.; RODRIGUES, O.; RENNER, L.; BORKETEY, P.; AYEK-KUMI, P.; ADIKU, T.; SIFAH, E. E LARTEY, M. (2004) – *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea among children at the Korle-Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana – *Jpn J Infect Dis*, **57**(5): 216-229
- AGNEW, D.G.; LIMA, A.A.M.; NEWMAN, R.D.; WUHI, T.; MOORE, R.D.; GUERRANT, R.L. E SEARS, C.L. (1998) – Cryptosporidiosis in northeastern brazilian children: association with increased diarrhea morbidity – *J Infect Dis*, **177**(3): 754-760
- AIELLO, A.E.; XIAO, L.; LIMOR, J.R.; LIU, C.; ABRAHAMSEN, M.S. E LAL, A.A. (1999) – Microsatellite analysis of the human and bovine genotypes of *Cryptosporidium parvum* – *J Eukaryot Microbiol*, **46**(5): 46S-47S
- AL BRAIKEN, F.A.; AMIN, A.; BEECHING, N.J.; HOMMEL, M. E HART, C.A. (2003) – Detection of *Cryptosporidium* amongst diarrhoeic and asymptomatic children in Jeddah, Saudi Arabia – *Ann Trop Med Parasitol*, **97**(5): 505-510
- ALONSO, I.L.; RAMOS, P.; RUANO, F. E PEREIRA DA FONSECA, I.M. (2003) – Comparação de técnicas de diagnóstico para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e quistos de *Giardia* em bivalves destinados ao consumo público – *Acta Parasitol Port*, **10**(1): 32
- ALVAREZ-PELLITERO, P. E SITJÀ-BOBADILLA, A. (2002) – *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infected two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. – *Int J Parasitol*, **32**(8): 1007-1021
- ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M.I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M.J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁZQUEZ, S. E NIETO, J.M. (2004) – *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study – *Dis Aquat Org*, **62**(1-2): 133-145
- ALVES, M. (1999) – Contribuição para o estudo da heterogeneidade genética em isolados de *Cryptosporidium parvum* de doentes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH). Comparação de métodos de extracção de DNA genómico – Tese de dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 103 pp.

- ALVES, M.; MATOS, O.; SPANO, F. E ANTUNES, F. (2000) – PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected patients in Lisbon, Portugal – *Ann Trop Med Parasitol*, **94**(3): 291-297
- ALVES, M.; MATOS, O. E ANTUNES, F. (2001a) – Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal – *Ann Trop Med Parasitol*, **95**(6): 627-632
- ALVES, M.; MATOS, O.; FONSECA, I.P.; DELGADO, E.; LOURENÇO, A M. E ANTUNES, F. (2001b) – Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human HIV-infected and animal hosts – *J Eukaryot Microbiol*, Suppl: 17S-18S
- ALVES, M.; MATOS, O. E ANTUNES, F. (2003a) – Microsatellite analysis of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in Portugal: a preliminary study – *J Eukaryot Microbiol*, **50**(6): 529-530
- ALVES, M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A.A.; MATOS, O. E ANTUNES, F. (2003b) – Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal – *J Clin Microbiol*, **41**(6): 2744-2747
- ALVES, M.; XIAO, L.; LEMOS, V.; ZHOU, L.; CAMA, V.; BARÃO DA CUNHA, M.; MATOS, O. E ANTUNES, F. (2005) – Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo – *Parasitol Res*, **97**(2): 108-112
- AMADI, B.; KELLY, P.; MWIYA, M.; MULWAZI, E.; SIANONGO, S.; CHANGWE, F.; THOMSON, M.; HACHUNGULA, J.; WATUKA, A.; WALKER-SMITH, J. E CHINTU, C. (2001) – Intestinal and systemic infection HIV, and mortality in zambian children with persistent diarrhea and malnutrition – *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **32**(5): 550-554
- ANGULO, F.J.; GLASER, C.A.; JURANEK, D.D.; LAPPIN, M.R. E REGNERY, R.L. (1994) – Caring for pets of immunocompromised persons – *J Am Vet Med Assoc*, **205**(12): 1711-1718
- ANTUNES, F.; TOMÁS, A.M.; BACELLAR, F.; MATOS, O.; DOROANA, M.; BOTAS, J.; CARVALHO, C. E TAVARES, L. (1990) – Prevalence of *Cryptosporidium* in HIV-infected people – *Bull Soc Fr Parasitol*, **8**(S2): 744
- ANTUNES, F. E DOROANA, M. (2003) – Infecção VIH-SIDA – in *Manual Sobre Doenças Infecciosas*, F. Antunes ed., Lisboa, Permanyer Portugal, pp.179-234
- ARAI, H.; FUKUDA, Y.; HARA, T.; FUNAKOSHI, Y.; KANEKO, S.; YOSHIDA, T.; ASAHI, H.; KUMADA, M.; KATO, K. E KOYAMA, T. (1990) – Prevalence of *Cryptosporidium* infection among domestic cats in the Tokyo Metropolitan District, Japan – *Jpn J Med Sci Biol*, **43**(1): 7-14
- ARENAS-PINTO, A.; CERTAD, G.; FERRARA, G.; CASTRO, J.; BELLO, M.A. E NUÑEZ, L.T. (2003) – Association between parasitic intestinal infections and acute or chronic diarrhoea in HIV-infected patients in Caracas, Venezuela – *Int J STD AIDS*, **14**(7): 487-492

- ARMSON, A.; THOMPSON, R.C.A. E REYNOLDSON, J.A. (2003) – A review of chemotherapeutic approaches to the treatment of cryptosporidiosis – *Expert Rev Anti-infect Ther*, **1**(2): 297-305
- ATWILL, E.R.; SWEITZER, R.A.; PEREIRA, M.G.C.; GARDNER, I.A.; VUREN, D.V. E BOYCE, W.M (1997) – Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pigs populations in California – *Appl Environ Microbiol*, **63**(10): 3946-3649
- ATWILL, E.R.; CAMARGO, S.M.; PHILLIPS, R.; ALONSO, L.H.; TATE, K.W.; JENSEN, W.A.; BENNET, J.; LITTLE, S. E SALMON, T.P. (2001) – Quantitative shedding of two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*) – *Appl Environ Microbiol*, **67**(6): 2840-2843
- AWAD-EL-KARIEM, F.M.; ROBINSON, H.A.; DYSON, D.A.; EVANS, D.; WRIGHT, S.; FOX, M.T. E McDONALD, V. (1995) – Differentiation between human and animal strains of *Cryptosporidium parvum* using isoenzyme typing – *Parasitology*, **110**(Part 2): 129-132
- BABIKER, A.; DARBYSHIRE, J.; PEZZOTTI, P.; PORTER, K.; REZZA, G.; WALKER, S.A.; BERAL, V.; COUTINHO, R.; DEL AMO, J.; GILL, N.; LEE, C.; MEYER, L.; TYRER, F.; DABIS, F.; THIEBAUT, R.; LAWSON-AYE, S.; BOUFASSA, F.; HAMOUDA, O.; FISCHER, K.; PEZZOTTI, P.; REZZA, G.; TOULOUMI, G.; HATZAKIS, A.; KARAFOLIDOU, A.; KATSAROU, O.; BRETTE, R.; DEL ROMERO, J.; PRINS, M.; VAN BENTHEM, B.; KIRK, O.; PEDERSON, C.; HERNANDEZ AGUADO, I.; PEREZ-HOYOS, S.; ESKILD, A.; BRUUN, J.N.; SANNES, M.; SABIN, C.; LEE, C.; JOHNSON, A.M.; PHILLIPS, A.N.; FRANCIOLI, P.; VANHEMS, P.; EGGER, M.; RICKENBACH, M.; COOPER, D.; KALDOR, J.; ASHTON, L.; VIZZARD, J.; MUGA, R.; DAY, N.E. E DE ANGELIS, D. (CASCADE COLLABORATION) (2005) – Changes over calendar time in the risk of specific first AIDS-defining events following HIV seroconversion, adjusting for competing risks – *Int J Epidemiol*, **31**(5): 951-958
- BAJER, A.; BEDNARSKA, M.; PAWELCZYK, A.; BEHNKE, J.M.; GILBERT, F.S. E SINSKI, E. (2002) – Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland – *Parasitology*, **125**(Part 1): 21-34
- BAJER, A.; CACCIÒ, S.; BEDNARSKA, M., BEHNKE, J.M., PIENIAZEK, N.J. E SINSKI, E. (2003) – Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland – *J Parasitol*, **89**(5): 1053-1055
- BAUMGARTNER, A.; MARDER, H.-P.; MUNZINGER, J. E SIEGRIST, H.H. (2000) – Frequency of *Cryptosporidium* spp. as cause of human gastrointestinal disease in Switzerland and possible sources of infection – *Schweiz Med Wochenschr*, **130**(36): 1252-1258
- BENSON, C.A.; KAPLAN, J.E.; MASUR, H.; PAU, A. E HOLMES, K.K. (2004) – Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents. Recommendations from CDC, the National Institute of Health and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America – *MMWR Recomm Rep*, **53**(RR-15): 1-112

- BERN, C.; HERNANDEZ, B.; LOPEZ, M.B.; ARROWOOD, M.J.; DE MERIDA, A.M. E KLEIN, R.E. (2000) – The contrasting epidemiology of *Cyclospora* and *Cryptosporidium* among outpatients in Guatemala – *Am J Trop Med Hyg*, **63**(5,6): 231-235
- BLANSHARD, C.; JACKSON, A.M.; SHANSON, D.C.; FRANCIS, N. E GAZZARD, B.G. (1992) – Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients – *Q J Med*, **85**(307-308): 813-823
- BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; DONIA, D.; OTTAVIANI, M.; VESCHETTI, E. E DIVIZIA, M. (2004) – Aspetti igienico-sanitari delle acque del fiume Tevere: presenza di protozoi patogeni e rapporti di correlazione con parametric microbiologici e chimico-fisici – *Ann Ig*, **16**(1-2): 273-280
- BONNIN, A.; FOURMAUX, M.N.; DUBREMETZ, J.F.; NELSON, R.G.; GOBET, P.; HARLY, G.; BUISSON, M.; PUYGAUTHIER-TOUBAS, D.; GABRIEL-POSPISIL, F.; NACIRI, M. E CAMERLYNCK, P. (1996) – Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence – *FEMS Microbiol Lett*, **137**(2-3): 207-211
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN-DILLEN, P.M.E. E VAN DER NOORDAA (1990) – Rapid and simple method for purification of nucleic acids – *J Clin Microbiol*, **28**(3): 495-503
- BRANDONISIO, O.; MAGGI, P.; PANARO, M.A.; LISI, S.; ANDRIOLA, A.; ACQUAFREDDA, A. E ANGARANO, G. (1999) – Intestinal protozoa in HIV-infected patients in Apulia, South Italy – *Epidemiol Infect*, **123**(3): 457-462
- BUGG, R.J.; ROBERTSON, I.D.; ELLIOTT, A.D. E THOMPSON, R.C.A. (1999) – Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, western Australia – *Vet J*, **157**(3): 295-301
- BUKHARI, Z. E SMITH, H.V. (1995) – Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces – *J Clin Microbiol*, **33**(10): 2592-2595
- CACCIÒ, S.; HOMAN, W.; VAN DIJK, K. E POZIO, E. (1999) – Genetic polymorphism at the β -tubulin locus among human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* – *FEMS Microbiol Lett*, **170**(1): 173-179
- CACCIÒ, S.; HOMAN, W.; CAMILLI, R.; TRALDI, G.; KORTBEEK, T. E POZIO, E. (2000) – A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum* – *Parasitology*, **120**(Part 3): 237-244
- CACCIÒ, S.; SPANO, F. E POZIO, E. (2001) – Large sequence variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C) isolates of *Cryptosporidium parvum* – *Int J Parasitol*, **31**(10): 1082-1086
- CALL, S.A.; HEUDEBERT, G; SAAG, M. E WILCOX, C.M. (2000) – The changing etiology of chronic diarrhea in HIV-infected patients with CD4 cell counts less than 200 cells/mm³ – *Am J Gastroenterol*, **95**(11): 3142-3146

- CAMA, V.A.; BERN, C.; SULAIMAN, I.M.; GILMAN, R.H.; TICONA, E.; VIVAR, A.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; ZHOU, L. E XIAO, L. (2003) – *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru – *J Eukaryot Microbiol*, **50**(6): 531-533
- CAMPOS, M.; JOUZDANI, E.; SEMPOUX, C.; BUTS, J.P.; REDING, R.; OTTE, J.B. E SOKAL, E.M. (2000) – Sclerosing cholangitis associated to cryptosporidiosis in liver-transplanted children – *Eur J Pediatr*, **159**(1-2): 113-115
- CÁRCAMO, C.; HOOTON, T.; WENER, M.H.; WEISS, N.S.; GILMAN, R.; AREVALO, J.; CARRASCO, J.; SEAS, C.; CABALLERO, M. E HOLMES, K.K. (2005) – Etiologies and manifestations of persistent diarrhea in adults with HIV-1 infection: a case-control study in Lima, Peru – *J Infect Dis*, **191**(1): 11-19
- CAREY, C.M.; LEE, H. E TREVORS, J.T. (2004) – Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst – *Water Res*, **38**(4): 818-862
- CARRENO, R.A.; SCHNITZLER, B.E.; JEFFRIES, A.C.; TENTER, A.M.; JOHNSON, A.M. E BARTA, J.R. (1998) – Phylogenetic analysis of coccidia based on 188 rDNA sequence comparison indicates that *Isoospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora* – *J Eukaryot Microbiol*, **45**(2): 184-188
- CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S. E BARTA, J.R. (1999) – *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences – *Parasitol Res*, **85**(11): 899-904
- CASEMORE, D.P.; ARMSTRONG, M. E SANDS, R.L. (1985a) – Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis – *J Clin Pathol*, **38**(12): 1337-1341
- CASEMORE, D.P.; SANDS, R.L. E CURRY, A. (1985b) – *Cryptosporidium* species a “new” pathogen – *J Clin Pathol*, **38**(12): 1321-1336
- CASEMORE, D.P. (1991) – Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis – *J Clin Pathol*, **44**(6): 445-451
- CASEMORE, D.P.; GARDNER, C.A. E O’MAHONY, C. (1994) – Cryptosporidial infection, with special reference to nosocomial transmission of *Cryptosporidium parvum*: a review – *Folia Parasitol*, **41**(1): 17-21
- CASEMORE, D.P.; WRIGHT, S.E. E COOP, R.L. (1997) – Cryptosporidiosis - human and animal epidemiology – in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer ed., Boca Raton, CRC Press Inc., pp.65-92
- CASEMORE, D.P. (2000) – Human cryptosporidiosis: clinical aspects, epidemiology and control – *Proc R Coll Physicians Edinb*, **30**: 287-293

- CASTRO-HERMIDA, J.A.; GONZÁLEZ-LOSADA, Y.A. E ARES-MAZÁS, E. (2002) – Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain) – *Vet Parasitol*, **106**(1): 1-10
- CAUSAPÉ, A.C.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. E DEL CACHO, E. (1996) – Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain – *Vet Parasitol*, **67**(3-4): 161-167
- CAUSAPÉ, A.C.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E. E LÓPEZ-BERNARD, F. (2002) – Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain) – *Vet Parasitol*, **104**(4): 287-298
- CEGIELSKI, J.P.; ORTEGA, Y.R.; MCKEE, S.; MADDEN, J.F.; GAIDO, L.; SCHWARTZ, D.A.; MANJI, K.; JORGENSEN, A.F.; MILLER, S.E.; PULIPAKA, U.P.; MSENIGI, A.E.; MWAKYUSA, D.H.; STERLING, C.R. E RELLER, L.B. (1999) – *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, and *Cyclospora* infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania – *Clin Infect Dis*, **28**(2): 314-321
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1982a) – Human cryptosporidiosis - Alabama – *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **31**(19): 252-254
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1982b) – Epidemiologic notes and reports cryptosporidiosis: Assessment of chemotherapy of males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) – *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **31**(44): 589-592
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1984) – Cryptosporidiosis among children attending day-care centers – Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico – *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **33**(42): 599-601
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1995) – Assessing the public health threat associated with waterborne cryptosporidiosis: report of a workshop – *MMWR Recomm Rep*, **44**(RR-6): 1-20
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1996) – Foodborne outbreak of diarrheal illness associated with *Cryptosporidium parvum* - Minnesota, 1995 – *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **45**(36): 783-784
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1998) – Outbreak of cryptosporidiosis associated with a water sprinkler fountain – Minnesota, 1997 – *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **47**(40): 856-860
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1999) – False-positive laboratory tests for *Cryptosporidium* involving an enzyme-linked immunosorbent assay - United States, November 1997-March 1998 – *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **48**(1): 4-8
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2004) – *Cryptosporidium* infection. Cryptosporidiosis – *Fact Sheet for the General Public*, http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/cryptosporidiosis/2004_PDF_Cryptosporidiosis.pdf, consultado a 20 de Dezembro de 2004

- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS (2005) – Infecção VIH/SIDA: a situação em Portugal a 31 de Dezembro de 2004 – Documento SIDA 133, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 59 pp., <http://www.insarj.pt/site/resources/images/Docs/sida2004.pdf>, consultado a 30 de Março de 2005
- CEVALLOS, A.M.; ZHANG, X.; WALDOR, M.K.; JAISON, S.; ZHOU, X.; TZIPORI, S.; NEUTRA, M.R. E WARD, H.D. (2000) – Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15 – *Infect Immun*, **68**(7): 4108-4116
- CHAI, J.-Y.; KIM, N.-Y.; GUK, S.-M.; PARK, W.-K.; SEO, M.; HAN, E.-T. E LEE, S.-H. (2001) – High prevalence and seasonality of cryptosporidiosis in a small rural village occupied predominantly by aged people in the Republic of Korea – *Am J Trop Med Hyg*, **65**(5): 518-522
- CHAKRABARTI, R. E SCHUTT, C.E. (2001) – The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones – *Gene*, **274**(1-2): 293-298
- CHALMERS, R.M.; STURDEE, A.P.; BULL, S.A.; MILLER, A. E WRIGHT, S.E. (1997) – The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system – *Parasitol Res*, **83**(5): 478-482
- CHALMERS, R.M.; ELWIN, K.; REILLY, W.J.; IRVINE, H.; THOMAS, A.L. E HUNTER, P.R. (2002) – *Cryptosporidium* in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep – *Int J Parasitol*, **32**(1): 21-26
- CHALMERS, R.M.; FERGUSON, C.; CACCIO, S.; GASSER, R.B.; EL-OSTA, Y.G.A.; HEIJNEN, L.; XIAO, L.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; SINCLAIR, M. E STEVENS, M. (2005) – Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species – *Int J Parasitol*, **35**(4): 397-410
- CHAPPELL, C.L.; OKHUYSEN, P.C.; STERLING, C.R. E DUPONT, H.L. (1996) – *Cryptosporidium parvum*: intensity and oocyst excretion patterns in healthy volunteers – *J Infect Dis*, **173**(1): 232-236
- CHECKLEY, W.; GILMAN, R.H.; EPSTEIN, L.D.; SUAREZ, M.; DIAZ, J.F.; CABRERA, L.; BLACK, R.E. E STERLING, C.R. (1997) – Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: their acute effect on weight gain in peruvian children – *Am J Epidemiol*, **145**(2): 156-163
- CHECKLEY, W.; EPSTEIN, L.D.; GILMAN, R.H.; BLACK, R.E.; CABRERA, L. E STERLING, C.R. (1998) – Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth – *Am J Epidemiol*, **148**(5): 497-506
- CHEN, X.-M.; KEITHLY, J.S.; PAYA, C.V. E LARUSSO, N.F. (2002) – Cryptosporidiosis – *N Engl J Med*, **346**(22): 1723-1731

- CHENG, S.; FOCKLER, C.; BARNES, W.M. E HIGUCHI, R. (1994) – Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA – *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**(12): 5695-5699
- CLARKE, L.A.; REBELO, C.S.; GONÇALVES, J.; BOAVIDA, M.G. E JORDAN, P. (2001) – PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences – *Mol Pathol*, **54**(5): 351-355
- COLFORD, J.M.; TAGER, I.B.; HIROZAWA, A.M.; LEMP, G.F.; ARAGON, T. E PETERSEN, C. (1996) – Cryptosporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. Factors related to symptomatic infection and survival – *Am J Epidemiol*, **144**(9): 807-816
- COMMUNICABLE DISEASE SURVEILLANCE CENTRE (NORTHERN IRELAND) (2005) – Laboratory reports of *Cryptosporidium* sp. (all specimen types), 1995-2004 Northern Ireland – in http://www.cdscni.org.uk/surveillance/Gastro/Cryptosporidium_sp.htm, consultado a 21 de Outubro de 2005
- CONIO, O.; PALUMBO, F.; BORELLI, E.; CARRARO, E. E PIGNATA, C. (1999) – *Cryptosporidium* and *Giardia* oo(cysts) occurrence in raw and drinking water in Italy – *Resumos da “20th Annual Meeting of the Italian Section Society of Protozoologists”*, Génova, Itália. *J Eukaryot Microbiol*, **47**(2): 15A
- CORBETT-FEENEY, G. (1987) – *Cryptosporidium* among children with acute diarrhoea in the west of Ireland – *J Infect*, **14**(1): 79-84
- CORDELL, R.L. E ADDISS, D.G. (1994) – Cryptosporidiosis in child care settings: a review of the literature and recommendations for prevention and control – *Pediatr Infect Dis J*, **13**(4): 310-317
- CRANENDONK, R.J.; KODDE, C.J.; CHIPETA, D.; ZIJLSTRA, E.E. E SLUITERS, J.F. (2003) – *Cryptosporidium parvum* and *Isospora belli* infections among patients with and without diarrhea – *East Afr Med J*, **80**(8): 398-401
- CURRENT, W.L.; UPTON, S.J. E HAYNES, T.B. (1986) – The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens – *J Protozool*, **33**(2): 289-296
- CURRENT, W.L. E GARCIA, L.S. (1991) – Cryptosporidiosis – *Clin Microbiol Rev*, **4**(3): 325-358
- DALL’OLIO, A.J. E FRANCO, R.M.B. (2004) – Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do Sudeste brasileiro – *Arq Bras Med Vet Zoo*, **56**(1): 25-31
- DALLE, F.; ROZ, P.; DAUTIN, G.; DI-PALMA, M.; KOHLI, E.; SIRE-BIDAULT, C.; FLEISCHMANN, M.G.; GALLAY, A.; CARBONEL, S.; BON, F.; TILLIER, C.; BEAUDEAU, P. E BONNIN, A. (2003) – Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium* spp. collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France – *J Clin Microbiol*, **41**(6): 2690-2693

- DANIEL, R.G.; STAAK, D.; ROBINSON, G.; THOMAS, A.L.; HADFIELD, S.J.; ELWIN, K. E CHALMERS, R.M. (2005) – Detection of *Cryptosporidium andersoni* in a dairy cow with diarrhoea in the UK – *Vet Rec*, **156**(13): 423
- DATTA, D.; GAZZARD, B. E STEBBING, J. (2003) – The diagnostic yield of stool analysis in 525 HIV-1-infected individuals – *AIDS*, **17**(11): 1711-3
- DE WIT, M.A.S.; KOOPMANS, M.P.G.; KORTBEEK, L.M.; VAN LEEUWEN, N.J.; BARTELD, A.I.M. E VAN DUYNHOVEN, Y.T.H.P. (2001) – Gastroenteritis in sentinel general practices, the Netherlands – *Emerg Infect Dis*, **7**(1): 82-91
- DELGADO, E. (2000) – Introdução ao estudo da criptosporidiose nos ruminantes silváticos do Jardim Zoológico de Lisboa – Tese de dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Medicina Veterinária e Zootecnia Tropicais, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 155 pp.
- DELGADO, E.; FONSECA, I.P.; FAZENDEIRO, I.; MATOS, O.; ANTUNES, F. E CUNHA, M.B. (2003) – *Cryptosporidium* spp. in ruminants at the Lisbon Zoo – *J Zoo Wildl Med*, **34**(4): 352-356
- DELIS, S.G.; TECTOR, J.; KATO, T.; MITTAL, N.; WEPPLER, D.; LEVI, D.; RUIZ, P.; NISHIDA, S.; NERY, J.R. E TZAKIS, A.G. (2002) – Diagnosis and treatment of *Cryptosporidium* infection in intestinal transplant recipients – *Transplant Proc*, **34**(3): 951-952
- DEMEKE, T. E ADAMS, R.P. (1992) – The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR – *Biotechniques*, **12**(3): 332-334
- DENG, M.Q. E CLIVER, D.O. (1999) – Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals – *Parasitol Res*, **85**(8-9): 733-736
- DENHOLM, K.M.; HAITJEMA, H.; GWYNNE, B.J.; MORGAN, U.M. E IRWIN, P.J. (2001) – Concurrent *Cryptosporidium* and parvovirus infections in a puppy – *Aust Vet J*, **79**(2): 98-101
- DIETZ, V.; VUGIA, D.; NELSON, R.; WICKLUND, J.; NADLE, N.; MCCOMBS, K.G.; REDDY, S. E FOODNET WORKING GROUP (2000) – Active, multisite, laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium parvum* – *Am J Trop Med Hyg*, **62**(3): 368-372
- DILLINGHAM, R.A.; LIMA, A.A. E GUERRANT, R.L. (2002) – Cryptosporidiosis: epidemiology and impact – *Microbes Infect*, **4**(10): 1059-1066
- DONSKOW, K.; BAJER, A.; BEDNARSKA, M. E SINSKI, E. (2005) – Experimental transmission of *Cryptosporidium parvum* isolates from wild rodents and calves to laboratory bred common voles (*Microtus arvalis*) – *Acta Parasitol*, **50**(1): 19-24
- DOUGLAS, M.P. E ROGERS, S.O. (1998) – DNA damage caused by common cytological fixatives – *Mutat Res*, **401**(1-2): 77-88

- DUFFY, G. E. MORIARTY, E.M. (2003) – *Cryptosporidium* and its potential as a food-borne pathogen – *Anim Health Res Rev*, **4**(2): 95-107
- DWORKIN, M.S.; GOLDMAN, D.P.; WELLS, T.G.; KOBAYASHI, J.M. E HERWALDT, B.L. (1996) – Cryptosporidiosis in Washington state: an outbreak associated with well water – *J Infect Dis*, **174**(6): 1372-1376
- EBERHARD, M.L. E ARROWOOD, M.J. (2002) – *Cyclospora* spp. – *Curr Opin Infect Dis*, **15**(5): 519-522
- EGOROV, A.; FROST, F.; MULLER, T.; NAUMOVA, E.; TERESCHENKO, A. E FORD, T. (2004) – Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in a Russian city and evaluation of risk factors for infections – *Ann Epidemiol*, **14**(2): 129-136
- EGYED, Z.; SRÉTER, T.; SZÉIL, Z.; BESZTERI, B.; DOBOS-KOVÁCS, M.; MÁRIALEGETI, K.; CORNELISSEN, A.W.C.A. E VARGA, I. (2002) – Polyphasic typing of *Cryptosporidium baileyi*: A suggested model for characterization of cryptosporidia – *J Parasitol*, **88**(2): 237-243
- EGYED, Z.; SRÉTER, T., SZÉLL, Z. E VARGA, I. (2003) – Characterization of *Cryptosporidium* spp. - recent developments and future needs – *Vet Parasitol*, **111**(2-3): 103-114
- EISENBERG, J.N.S.; SETO, E.Y.W.; COLFORD, J.M.; OLIVIERI, A. E SPEAR, R.C. (1998) – An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process – *Epidemiology*, **9**(3): 255-263
- EL-AHRAF, A.; TACAL JR., J.V.; SOBIH, M.; AMIN, M.; LAWRENCE, W. E WILCKE, B.W. (1991) – Prevalence of cryptosporidiosis in dogs and human beings in San Bernardino County, California – *J Am Vet Med Assoc*, **198**(4): 631-634
- EL-MAHALLAWY, H.A.; EL-DIN, N.H.A.; SALAH, F.; EL-AROUSY, M. E EL-NAGA, S.A. (2004) – Epidemiologic profile of symptomatic gastroenteritis in pediatric oncology patients receiving chemotherapy – *Pediatr Blood Cancer*, **42**(4): 338-342
- ELWIN, K.; CHALMERS, R.M.; ROBERTS, R.; GUY, E.C. E CASEMORE, D.P. (2001) – Modification of a rapid method for the identification of gene-specific polymorphisms in *Cryptosporidium parvum* and its application to clinical and epidemiological investigations – *Appl Environ Microbiol*, **67**(12): 5581-5584
- ENEMARK, H.L.; AHRENS, P.; JUEL, C.D.; PETERSEN, E.; PETERSEN, R.F.; AQNDERSEN, J.S.; LIND, P. E THAMSBORG, S.M. (2002a) – Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates – *Parasitology*, **125** (Part 4): 331-341
- ENEMARK, H.L.; AHRENS, P.; LOWERY, C.J.; THAMSBORG, S.M.; ENEMARK, J.M.D.; BILLE-HANSEN, V. E LIND, P. (2002b) – *Cryptosporidium andersoni* from a danish cattle herd: identification and preliminary characterisation – *Vet Parasitol*, **107**(1-2): 37-49

- ENRIQUEZ, F.J.; AVILA, C.R.; SANTOS, J.I.; TANAKA-KIDO, J.; VALLEJO, O. E STERLING, C.R. (1997) – *Cryptosporidium* infections in mexican children: Clinical, nutritional, enteropathogenic, and diagnostic evaluations – *Am J Trop Med Hyg*, **56**(3): 254-257
- ESCALANTE, A.A. E AYALA, F.J. (1995) – Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes – *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**(13): 5793-5797
- ESCOBEDO, A.A. E NUÑEZ, F.A. (1999) – Prevalence of intestinal parasites in Cuban acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients – *Acta Trop*, **72**(1): 125-130
- ESSERS, B.; BURNENS, A.P.; LANFRANCHINI, F.M.; SOMARUGA, S.G.E.; VON VIGIER, R.O.; SCHAAD, U.B.; AEBI, C. E BIANCHETTI, M.G. (2000) – Accute community-acquired diarrhea requiring hospital admission in swiss children – *Clin Infect Dis*, **31**(1): 192-196
- ESTEBAN, J.-G.; AGUIRRE, C.; FLORES, A.; STRAUSS, W.; ANGLES, R. E MAS-COMA, S. (1998) – High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern Bolivian Altiplano – *Am J Trop Med Hyg*, **58**(1): 50-55
- EUN-KYEONG, J.; HYUNG-SEOK, K.; MIN, Y.L.; MOTOHIRO, I.; JAE-HO, L.; CHANG-HWA, S.; JEONG-KYU, P.; TAI JU, H. E HOON, K. (2002) – X-linked hyper-IgM syndrome associated with *Cryptosporidium parvum* and *Cryptococcus neoformans* infections: the first case with molecular diagnosis in Korea – *J Korean Med Sci*, **17**(1): 116-120
- FALL, A.; THOMPSON, R.C.A.; HOBBS, R.P. E MORGAN-RYAN, U. (2003) – Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium* – *J Parasitol*, **89**(2): 399-402
- FARTHING, M.J.G. (2000) – “Clinical aspects of human cryptosporidiosis” – in *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*. *Contributions Microbiology*, Petry F. ed., Basel, Karger, **6**: 50-74
- FAYER, R. E UNGAR, B.L.P. (1986) – *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis – *Microbiol Rev*, **50**(4): 458-483
- FAYER, R. E NERAD, T. (1996) – Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts – *Appl Environ Microbiol*, **62**(4): 1431-1433
- FAYER, R.; SPEER, C.A. E DUBEY, J.P. (1997) – The general biology of *Cryptosporidium* – in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer ed., Boca Raton, CRC Press Inc., pp.1-41
- FAYER, R.; LEWIS, E.J.; TROUT, J.M.; GRACZYK, T.K.; JENKINS, M.C.; HIGGINS, J.; XIAO, L. E LAL, A.A. (1999) – *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay – *Emerg Infect Dis*, **5**(5): 706-710
- FAYER, R.; MORGAN, U. E UPTON, S.J. (2000) – Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification – *Int J Parasitol*, **30**(12-13): 1305-1322
- FAYER, R.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LAL, A.A. E DUBEY, J.P. (2001) – *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs – *J Parasitol*, **87**(6): 1415-1422

- FAYER, R.; TROUT, J.M.; LEWIS, E.J., SANTIN, M.; ZHOU L.; LAL, A.A. E XIAO, L. (2003) – Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium* – *Parasitol Res*, **89**(2): 141-145
- FAYER, R. (2004) – *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite – *Vet Parasitol*, **126**(1-2): 37-56
- FAYER, R.; DUBEY, J.P. E LINDSAY, D.S. (2004) – Zoonotic protozoa: from land to sea – *Trends Parasitol*, **20**(11): 531-536
- FAYER, R.; SANTÍN, M. E XIAO, L. (2005) – *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*) – *J Parasitol*, **91**(3): 624-629
- FEDERAL STATISTICAL OFFICE / STATISTISCHES BUNDESAMT (2005) – Notifiable Diseases absolute and per 100,000 inhabitants (Year, Regions, Age, Sex, notifiable disease) – in http://www.gbe-bund.de/cgi-express/oowaro/ExpSrv634/dbxwdevkit/xwd_init?isgbetol/xs_start/313097781/39148626, consultado a 21 de Outubro de 2005
- FENG, X.; RICH, S. M.; AKIYOSHI, D.; TUMWINE, J.K.; KEKITIINWA, A.; NABUKEERA, N.; TZIPORI, S. E WIDMER, G. (2000) – Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis – *Appl Environ Microbiol*, **66**(8): 3344-3349
- FERREIRA, M.L.; LOPES, A.; LOBO, O.; LITO, L.M.; SALGADO, M.J. E ANTUNES, F. (1995) – Criptosporidiose disseminada num doente com SIDA – *Rev Port Doenç Infecc*, **18**(3-4): 235-238
- FLANIGAN, T.; WHALEN, C.; TURNER, J.; SOAVE, R.; TOERNER, J.; HAVLIR, D. E KOTLER, D. (1992) – *Cryptosporidium* infection and CD4 counts – *Ann Intern Med*, **116**(10): 840-842
- FLÓREZ, A.C.; GARCIA, D.A.; MONCADA, L. E BELTRÁN, M. (2003) – Prevalencia de microsporidios y otros parásitos intestinales en pacientes con infección por VIH, Bogotá, 2001 – *Biomedica (Bogota)*, **23**(3): 274-282
- FOOT, A.B.M.; OAKHILL, A. E MOTT, M.J. (1990) – Cryptosporidiosis and acute leukaemia – *Arch Dis Child*, **65**(2): 236-237
- FRETZ, R.; SVOBODA, P.; RYAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A.; TANNER, M. E BAUMGARTNER, A. (2003) – Genotyping of *Cryptosporidium* spp. in isolated from human stool samples in Switzerland – *Epidemiol Infect*, **131**(1): 663-667
- FRICKER, C.R. E CRABB, J.H. (1998) – Water-borne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options – *Adv Parasitol*, **40**: 241-278
- FROST, F.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R. E HUBBS, S.A. (1997) – So many oocysts, so few outbreaks – *JAWWA*, **89**(12): 8-10

- FROST, F.J.; FEA, E.; GILLI, G.; BIORCI, F.; MULLER, T.M.; CRAUN, G.F. E CALDERON, R.L. (2000a) – Serological evidence of *Cryptosporidium* infection in southern Europe – *Eur J Epidemiol*, **16**(4): 385-390
- FROST, F.J.; MULLER, T.; CRAUN, G.F.; FRASER, D.; THOMPSON, D.; NOTENBOOM, R. E CALDERON, R.L. (2000b) – Serological analysis of a cryptosporidiosis epidemic – *Int J Epidemiol*, **29**(2): 376-379
- FROST, F.J.; MULLER, T.B.; FAIRLEY, C.K.; HURLEY, J.S.; CRAUN, G.F. E CALDERON, R.L. (2000c) – Serological evaluation of *Cryptosporidium* oocyst findings in the water supply for Sydney, Australia – *Int J Environ Health Res*, **10**(1): 35-40
- FROST, F.J.; MULLER, T.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L. E ROEFER, P.A. (2001) – Paired city *Cryptosporidium* serosurvey in the southwest USA – *Epidemiol Infect*, **126**(2): 301-307
- FROST, F.J.; MULLER, T.; CRAUN, G.F.; LOCKWOOD, W.B. E CALDERON, R.L. (2002) – Serological evidence of endemic waterborne *Cryptosporidium* infections – *Ann Epidemiol*, **12**(4): 222-227
- FROST, F.J.; MULLER, T.B.; CALDERON, R.L. E CRAUN, G.F. (2004) – Analysis of serological responses to *Cryptosporidium* antigen among NHANES III participants – *Ann Epidemiol*, **14**(7): 473-478
- GALMES, A.; NICOLAU, A.; ARBONA, G.; GOMIS, E.; GUMA, M.; SMITH-PALMER, A.; HERNANDEZ-PEZZI, G. E SOLER, P. (2003) – Cryptosporidiosis outbreak in British tourists who stayed at a hotel in Majorca, Spain – *Eurosurveillance Weekly*, **7**(33), <http://www.eurosurveillance.org/ew/2003/030814.asp#3>, consultado a 6 de Janeiro de 2005
- GASSAMA, A.; SALIF, P.; FALL, F.; CAMARA, P.; PHILIPPE, H.; GUÈYE-N'DIAYE, A.; SENG, R.; SAMB, B.; M'BOUP, S.; GERMANI, Y. E AÏDARA-KANE, A. (2001) – Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus – *Int J Infect Dis*, **5**(4): 192-198
- GATEI, W.; ASHFORD, R.W.; BEECHING, N.J.; KAMWATI, S.K.; GREENSILL, J. E HART, C.A. (2002a) – *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya – *Emerg Infect Dis*, **8**(2): 204-206
- GATEI, W.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; WAYWA, D.; ASHFORD, R.W.; BAILEY, J.W.; GREENSILL, J.; BEECHING, N.J. E HART, C.A. (2002b) – Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand – *Ann Trop Med Parasitol*, **96**(8): 797-802
- GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R.W.; CUEVAS, L.E.; PARRY, C.M.; CUNLIFFE, N.A.; BEECHING, N.J. E HART, C.A. (2003) – Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam – *J Clin Microbiol*, **41**(4): 1458-1462

- GELLETLIE, R.; STUART, J.; SOLTANPOOR, N.; ARMSTRONG, R. E NICHOLS, G. (1997) – Cryptosporidiosis associated with school milk – *Lancet*, **350**(9083): 1005-1006
- GERBER, D.A.; GREEN, M.; JAFFE, R.; GREENBERG, D.; MAZARIEGOS, G. E REYES, J. (2000) – Cryptosporidial infections after solid organ transplantation in children – *Pediatr Transplant*, **4**(1): 50-55
- GIBBONS, C.L.; GAZZARD, B.G.; IBRAHIM, M.A.A.; MORRIS-JONES, S.; ONG, C.S.L. E AWAD-EL-KARIEM, F.M. (1998) – Correlation between markers of strain variation in *Cryptosporidium parvum*: evidence of clonality – *Parasitol Int*, **47**(2): 139-147
- GILLESPIE, J.W.; BEST, C.J.; BICHSEL, V.E.; COLE, K.A.; GREENHUT, S.F.; HEWITT, S.M.; AHAM, M.; GATHRIGHT, Y.B.; MERINO, M.J.; STRAUSBERG, R.L.; EPSTEIN, J.I.; HAMILTON, S.R.; GANNOT, G.; BAIBAKOVA, G.V.; CALVERT, V.S.; FLAIG, M.J.; CHUAQUI, R.F.; HERRING, J.C.; PFEIFER, J.; PETRICOIN, E.F.; LINEHAN, W.M.; DURAY, P.H.; BOVA, G.S. E EMMERT-BUCK, M.R. (2002) – Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies – *Am J Pathol*, **160**(2): 449-457
- GLABERMAN, S.; MOORE, J.E.; LOWERY, C.J.; CHALMERS, R.M.; SULAIMAN, I.; ELWIN, K.; ROONEY, P.J.; MILLAR, B.C.; DOOLEY, J.S.G.; LAL, A.A. E XIAO, L. (2002) – Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland – *Emerg Infect Dis*, **8**(6): 631-633
- GLAESER, C.; GRIMM, F.; MATHIS, A.; WEBER, R.; NADAL, D. E DEPLAZES, P. (2004) – Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from diarrheic children in Switzerland – *Pediatr Infect Dis J*, **23**(4): 359-361
- GLASER, C.A.; ANGULO, F.J. E ROONEY, J.A. (1994) – Animal-associated opportunistic infections among persons infected with the human immunodeficiency virus – *Clin Infect Dis*, **18**(1): 14-24
- GLASER, C.A.; SAFRIN, S.; REINGOLD, A. E NEWMAN, T.B. (1998) – Association between *Cryptosporidium* infection and animal exposure in HIV-infected individuals – *J Acquir Immune Defic Syndr*, **17**(1): 79-82
- GOH, S.; REACHER, M.; CASEMORE, D.P.; VERLANDER, N.Q.; CHALMERS, R.; KNOWLES, M.; WILLIAMS, J.; OSBORN, K. E RICHARDS, S. (2004) – Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000 – *Emerg Infect Dis*, **10**(6): 1007-1015
- GÓMEZ, M.S.; VILA, T.; FELIU, C.; MONTOLIU, I.; GRACENEA, M. E FERNANDEZ, F. (1996) – A survey for *Cryptosporidium* spp. in mammals at the Barcelona Zoo – *Int J Parasitol*, **26**(11): 1331-1333
- GÓMEZ, M.S.; TORRES, J.; GRACENEA, M.; FERNANDEZ-MORÁN, J. E GONZALEZ-MORENO, O. (2000) – Further report on *Cryptosporidium* in Barcelona Zoo – *Parasitol Res*, **86**(4): 318-323

- GÓMEZ-COUSO, H.; FREIRE-SANTOS, F.M MAETRINEZ-URTASA, J.; GARCIA-MARTÍN, O. E ARES-MAZÁS, M.E. (2003) – Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards – *Int J Food Microbiol*, **87**(1-2): 97-105
- GONZÁLEZ-MORENO, O.; GRACENEA, M.; ESPUÑA, M.; CRESPO, N.; RODRÍGUEZ, J. E OLIVA, J.A.G. (2004) – Prevalence data of cryptosporidiosis in out-patients from Cataluña (Spain) – *Programa e Resumos do “IX European Multicollloquium of Parasitology”*, Valência, Espanha, p. 486
- GOODGAME, R. (2003) – Emerging causes of traveler’s diarrhea: *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, and *Microsporidia* – *Curr Infect Dis Rep*, **5**(1): 66-73
- GRAAF, D.C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L.M.; ABBASSI, H. E PEETERS, J.E. (1999) – A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals – *Int J Parasitol*, **29**(8): 1269-1287
- GRACENEA, M.; GÓMEZ, M.S.; TORRES, J.; CARNÉ, E. E FERNÁNDEZ-MORÁN, J. (2002) – Transmission dynamics of *Cryptosporidium* in primates and herbivores at the Barcelona Zoo: a long-term study – *Vet Parasitol*, **104**(1): 19-26
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R.; TROUT, J. E GOODALE, H.J. (1997) – Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts is retained upon intestinal passage through a migratory water-fowl species (Canada goose, *Branta canadensis*) – *Trop Med Int Health*, **2**(4): 341-347
- GRACZYK, T.K. E CRANFIELD, M.R. (2000) – *Cryptosporidium serpentis* oocysts and microsporidian spores in feces of captive snakes – *J Parasitol*, **86**(2): 413-414
- GRACZYK, T.K.; DASILVA, A.J.; CRANFIELD, M.R.; NIZEYI, J.B.; KALEMA, G.R.N.N. E PIENIAZEK, N.J. (2001) – *Cryptosporidium parvum* genotype 2 infections in free-ranging mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda – *Parasitol Res*, **87**(5): 368-370
- GRACZYK, T.K.; CONN, D.B.; LUCY, F.; MINCHIN, D.; TAMANG, L.; MOURA, L.N.S. E DASILVA, A.J. (2004) – Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland – *Parasitol Res*, **93**(5): 385-391
- GRAFSTROM, R.C.; FORNACE, A.J. JR.; AUTRUP, H.; LECHNER, J.F. E HARRIS, C.C. (1983) – Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells – *Science*, **220**(4593): 216-218
- GRIFFITHS, J.K. (1998) – Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis – *Adv Parasitol*, **40**: 37-85
- GUERRANT, D.I.; MOORE, S.R.; LIMA, A.A.M.; PATRICK, P.D.; SCHORLING, J.B. E GUERRANT, R.L. (1999) – Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil – *Am J Trop Med Hyg*, **61**(5): 707-713

- GUERRANT, R.L.; KOSEK, M.; MOORE, S.; LORNTZ, B.; BRANTLEY, R. E LIMA, A.A.M. (2002) – Magnitude and impact of diarrheal diseases – *Arch Med Res*, **33**(4): 351-355
- GUMBO, T.; SARBAH, S.; GANGAIDZO, I.T.; ORTEGA, Y.; STERLING, C.R.; CARVILLE, A.; TZIPORI, S. E WIEST, P.M. (1999) – Intestinal parasites in patients with diarrhea and human immunodeficiency virus infection in Zimbabwe – *AIDS*, **13**(7): 819-821
- GUYOT, K.; FOLLET-DUMOULIN, A.; LELIÈVRE, E.; SARFATI, C.; RABODONIRINA, M.; NEVEZ, G.; CAILLIEZ, J.C.; CAMUS, D. E DEI-CAS, E. (2001) – Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France – *J Clin Microbiol*, **39**(10): 3472-3480
- HACKETT, T. E LAPPIN, M.R. (2003) – Prevalence of enteric pathogens in dogs of north-central Colorado – *J Am Anim Hosp Assoc*, **39**(1): 52-56
- HAJDUŠEK, O.; DITRICH, O. E ŠLAPETA, J. (2004) – Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic – *Vet Parasit*, **122**(3): 183-192
- HARDIE, R.M.; WALL, P.G.; GOTT, P.; BARDHAN, M. E BARTLETT, C.L.R. (1999) – Infectious diarrhea in tourists staying in a resort hotel – *Emerg Infect Dis*, **5**(1): 168-171
- HARPER, C.M.; COWELL, N.A.; ADAMS, B.C.; LANGLEY, A.J. E WOHLSEN, T.D. (2002) – Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk – *Commun Dis Intell*, **26**(3): 449-450
- HASSL, A.; BENYR, G. E SOMMER, R. (2001) – Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal and water samples in Austria – *Acta Trop*, **80**(2): 145-149
- HAUGE, X.Y. E LITT, M. (1993) – A study of the origin of shadow bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR – *Hum Mol Genet*, **2**(4): 411-415
- HEITMAN, T.L.; FREDERICK, L.M.; VISTE, J.R.; GUSELLE, N.J.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. E OLSON, M.E. (2002) – Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human and agricultural source in North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada – *Can J Microbiol*, **48**(6): 530-541
- HELLARD, M.; HOCKING, J.; WILLIS, J., DORE, G. E FAIRLEY, C. (2003) – Risk factors leading to *Cryptosporidium* infection in men who have sex with men – *Sex Transm Infect*, **79**(5): 412-414
- HEALTH PROTECTION AGENCY (2005a) – *Cryptosporidium*: Laboratory reports of all identifications in United Kingdom, 2004 – in http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/crypto/data_uk_geog_age.htm, consultado a 21 de Outubro de 2005

- HEALTH PROTECTION AGENCY (2005b) – Laboratory reports of all identifications in England & Wales, 1992-2004 – in http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/crypto/data_uk_geog2.htm, consultado a 21 de Outubro de 2005
- HENRIKSEN, S.A. E POHLENZA, J.F.L. (1981) – Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique – *Acta Vet Scand*, **22**(3-4): 594-596
- HEUSCHELE, W.P.; OOSTERHUIS, J.; JANSSEN, D.; ROBINSON, P.T.; ENSLEY, P.K.; MEIER, J.E.; OLSON, T.; ANDERSON, M.P. E BENIRSCHKE, K. (1986) – Criptosporidial infections in captive wild animals – *J Wildl Dis*, **22**(4): 493-496
- HIJAWI, N.S.; MELONI, B.P.; RYAN, U.M.; OLSON, M.E. E THOMPSON, R.C. (2002) – Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium* – *Int J Parasitol*, **32**(14): 1719-1726
- HILL, S.L.; CHENEY, J.M.; TATON-ALLEN, G.F.; REIF, J.S.; BRUNS, C. E LAPPIN, M.R. (2000) – Prevalence of enteric zoonotic organisms in cats – *J Am Vet Med Assoc*, **216**(5): 687-692
- HITE, J.M.; ECKERT, K.A. E CHENG, K.C. (1996) – Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)_n and d(G-T)_n microsatellite repeats – *Nucleic Acids Res*, **24**(12): 2429-2434
- HLAVSA, M.C.; WATSON, J.C. E BEACH, M.J. (2005) – Cryptosporidiosis surveillance - United States 1999-2002 – *MMWR Surveill Summ*, **54**(SS-1): 1-8
- HÖRMAN, A.; KORPELA, H.; SUTINEN, J.; WEDEL, H. E HÄNNINEN, M.-L. (2004) – Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. infections in humans in the Nordic countries – *Int J Parasitol*, **34**(12): 1337-1346
- HOXIE, N.J.; DAVIS, J.P.; VERGERONT, J.M.; NASHOLD, R.D. E BLAIR, K.A. (1997) – Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin – *Am J Public Health*, **87**(12): 2032-2035
- HUBER, F.; BOMFIM, T.C.B. E GOMES, R.S. (2005) – Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro – *Vet Parasitol*, **130**(1-2): 69-72
- HUETINK, R.E.C.; VAN DER GIESSEN, J.W.B.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M. E PLOEGER, H.W. (2001) – Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm – *Vet Parasitol*, **102**(1): 53-67
- HUNTER, P.R. E NICHOLS, G. (2002) – Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients – *Clin Microbiol Rev*, **15**(1): 145-154
- HUNTER, P.R.; HUGHES, S.; WOODHOUSE, S.; SYED, Q.; VERLANDER, N.Q.; CHALMERS, R.M.; MORGAN, K.; NICHOLS, G.; BEECHING, N. E OSBORN, K. (2004) – Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping – *Emerg Infect Dis*, **10**(7): 1241-1249

- INSULANDER, M.; LEBBAD, M.; STENSTRÖM, T.H. E SVENUNGSSON, B. (2005) – An outbreak of cryptosporidiosis associated with exposure to swimming pool water – *Scand J Infect Dis*, **37**(5): 354-360
- IQBAL, J.; MUNIR, M.A. E KAHN, M.A. (1999) – *Cryptosporidium* infection in young children with diarrhea in Rawalpindi, Pakistan – *Am J Trop Med Hyg*, **60**(5): 868-870
- ISEKI, M. (1979) – *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat – *Jpn J Parasitol*, **28**(5): 285-307
- IVES, N.J.; GAZZARD, B.G. E EASTERBROOK, P.J. (2001) – The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in a London clinic – *J Infect*, **42**(2): 134-139
- IZUMIYAMA, S.; FURUKAWA, I.; KUROKI, T.; YAMAI, S.; SUGIYAMA, H.; YAGITA, K. E ENDO, T. (2001) – Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture, Japan – *Jpn J Infect Dis*, **54**(1): 23-26
- JENNINGS, P. E RHATIGAN, A. (2002) – Cryptosporidiosis outbreak in Ireland linked to public water supply – *Eurosurveillance Weekly*, **6**(22), <http://www.eurosurveillance.org/ew/2002/020530.asp#1>, consultado a 3 de Janeiro de 2005
- JIANG, J. E XIAO, L. (2003) – An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. – *J Eukaryot Microbiol*, **50**(6): 542-547
- JIANG, J.; ALDERISIO, K.A. E XIAO, L. (2005) – Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York – *Appl Environ Microbiol*, **71**(8): 4446-4454
- JOACHIM, A. (2004) – Human cryptosporidiosis: An update with special emphasis on the situation in Europe – *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **51**(6): 251-259
- JOHNSTON, S.P.; BALLARD, M.M.; BEACH, M.J.; CAUSER, L. E WILKINS, P.P. (2003) – Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens – *J Clin Microbiol*, **41**(2): 623-626
- JURANEK, D.D. (1995) – Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention – *Clin Infect Dis*, **21**(Suppl.1): 557-561
- KALISHMAN, J.; PAUL-MURPHY, J.; SCHEFFLER, J. E THOMSON, J.A. (1996) – Survey of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in a captive population of common marmosets – *Lab Anim Sci*, **46**(1): 116-119
- KARASUDANI, T.; AOKI, S.; TAKEUCHI, J.; OKUYAMA, M.; OSETO, M.; MATSUURA, S.; ASAI, T. E INOUE, H. (2001) – Sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in environmental water samples by reverse transcription-PCR – *Jpn J Infect Dis*, **54**(3): 122-124

- KATO, S.; JENKINS, M.B.; FOGARTY, E.A. E BOWMAN, D.D. (2002) – Effects of freeze-thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil – *J Parasitol*, **88**(4): 718-722
- KEUSCH, G.T.; HAMER, D.; JOE, A.; KELLEY, M.; GRIFFITHS, J. E WARD, H. (1995) – Cryptosporidia - who is at risk? – *Schweiz Med Wochenschr*, **5**(18): 899-908
- KOCH, K.L.; PHILLIPS, D.J.; ABER, R.C. E CURRENT, W.L. (1985) – Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission – *Ann Intern Med*, **102**(5): 593-596
- KOSEK, M.; ALCANTARA, C.; LIMA, A. A. M. E GUERRANT, R.L. (2001) – Cryptosporidiosis: an update – *Lancet Infect Dis*, **1**(4): 262-269
- KOUDELA, B. E MODRÝ, D. (1998) – New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizards – *Folia Parasitol*, **45**(2): 93-100
- KOUDELA, B.; MODRÝ, D. E VÍTOVEC, J. (1998) – Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle – *Vet Parasitol*, **76**(3): 181-188
- KRAMER, M.H.; SORHAGE, F.E.; GOLDSTEIN, S.T.; DALLEY, E.; WAHLQUIST, S.P. E HERWALDT, B.L. (1998) – First report outbreak in the United States of cryptosporidiosis associated with a recreational lake – *Clin Infect Dis*, **26**(1): 27-33
- KUTUKCULER, N.; MORATTO, D.; AYDINOK, Y.; LOUGARIS, V.; AKSOYLAR, S.; PLEBANI, A.; GENEL, F. E NOTARANGELO, L.D. (2003) – Disseminated *Cryptosporidium* infection in an infant with hyper-IgM syndrome caused by CD40 deficiency – *J Pediatr*, **142**(2): 194-196
- KVÁČ, M. E VÍTOVEC, J. (2003) – Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle – *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **50**(8): 451-457
- LAUBACH, H.E.; BENTLEY, C.Z.; GINTER, E.L.; SPALTER, J.S. E JENSEN, L.A. (2004) – A study of risk factors associated with the prevalence of *Cryptosporidium* in villages around Lake Atitlan, Guatemala – *Braz J Infect Dis*, **8**(4): 319-323
- LE BLANCQ, S.M.; KHRAMTSOV, N.V.; ZAMANI, F.; UPTON, S.J. E WU, T.W. (1997) – Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum* – *Mol Biochem Parasitol*, **90**(2): 463-478
- LEACH, C.T.; KOO, F.C.; KUHL, T.H.; HILSENBECK, S.G. E JENSON, H.B. (2000) – Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in children along the Texas-Mexico border and associated risk factors – *Am J Trop Med Hyg*, **62**(5): 656-661
- LEANDER, B.S.; CLOPTON, R.E. E KEELING, P.J. (2003) – Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and β -tubulin – *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**(Part 1): 345-354
- LEARMONTH, J.L.; IONAS, G.; EBBETT, K.A. E KWAN, E.S. (2004) – Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand – *Appl Environ Microbiol*, **70**(7): 3973-3978

- LEAV, B.A.; MACKAY, M.R.; ANYANWU, A.; O'CONNOR, R.M.; CEVALLOS, A.M.; KINDRA, G.; ROLLINS, N.C.; BENNISH, M.L.; NELSON, R.G. E WARD, H.D. (2002) – Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa – *Infect Immun*, **70**(7): 3881-3890
- LEBBAD, M.; NORRGREN, H.; NAUCLÉR, A.; DIAS, F.; ANDERSSON, S. E LINDER, E. (2001) – Intestinal parasites in HIV-2 associated AIDS cases with chronic diarrhoea in Guinea-Bissau – *Acta Trop*, **80**(1): 45-49
- LEELAYOOVA, S.; VUTHAYASAI, N.; WATANAVEERADEJ, V.; CHOTPITAYASUNONDH, T.; THERAPONG, V.; NAAGLOR, T. E MUNGTHIN, M. (2001) – Intestinal microsporidiosis in HIV-infected children with acute and chronic diarrhea – *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **32**(1): 33-37
- LEGESSE, M. E ERKO, B. (2004) – Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia – *Acta Trop*, **90**(3): 231-236
- LEMONS, V.O.G. (2002) – Caracterização genética de isolados de *Cryptosporidium* spp. provenientes de fezes de animais domésticos e silváticos – Relatório de estágio para obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia Biotecnológica, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 113 pp.
- LENGERICH, E.J.; ADDISS, D.G.; MARX, J.J.; UNGAR, B.L.P. E JURANEK, D.D. (1993) – Increased exposure to cryptosporidia among dairy farmers in Wisconsin – *J Infect Dis*, **167**(5): 1252-1255
- LEVINE, N.D. (1980) – Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature – *J Parasitol*, **66**(5): 830-834
- LEVINE, N.D. (1984) – Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa) – *J Protozool*, **31**(1): 94-98
- LIMA, A.A.M.; MOORE, S.R.; BARBOZA, JR.; M.S.; SOARES, A.M.; SCHLEUPNER, M.A.; NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; NATARO, J.P.; FEDORKO, D.P.; WUHIH, T.; SCHORLING, J.B. E GUERRANT, R.L. (2000) – Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil – *J Infect Dis*, **181**(5): 1643-1651
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; HOERR, F.J. E SMITH, P.C. (1991) – Cryptosporidiosis in zoo and pet birds – *J Protozool*, **38**(6): 180S-181S
- LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, U.M.; MEAD, J.R. E BLAGBURN, B.L. (2000) – *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiae) from cattle, *Bos taurus* – *J Eukaryot Microbiol*, **47**(1): 91-95

- LIU, C.; VIGDOROVICH, V.; KAPUR, V. E ABRAHAMSEN, M.S. (1999) – A random survey of the *Cryptosporidium parvum* genome – *Infect Immun*, **67**(8): 3960-3969
- LOGAR, J.; POLJSAK-PRIJATELJ, M. E ANDLOVIC, A (1996) – Incidence of *Cryptosporidium parvum* in patients with diarrhea – *J Eukaryot Microbiol*, **43**(5): 67S
- LÓPEZ-VÉLEZ, R.; TARAZONA, R.; CAMACHO, A.G.; GOMEZ-MAMPASO, E.; GUERRERO, A.; MOREIRA, V. E VILLANUEVA, R. (1995) – Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients – *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **14**(8): 677-681
- LOURENÇO, A.M. (2000) – Diagnóstico de *Cryptosporidium parvum* em fezes de vitelos e gamos – Relatório de estágio para obtenção do grau de Licenciatura em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 30 pp.
- LOURENÇO, A.M.; BRUNO DE SOUSA, C.; MATOS, O.; ALVES, M.; PEREIRA DA FONSECA, I. E ANTUNES, F. (2000) – Estudo preliminar da criptosporidiose em gamos (*Dama dama* L.) da Tapada Nacional de Mafra (Portugal) – *Acta Parasitol Port*, **7**(1/2): 29-31
- LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; MILLAR, B.C.; MCCORRY, K.A.J.; XU, J.; ROONEY, P.J. E DOOLEY, J.S.G. (2001) – Occurrence and molecular genotyping of *Cryptosporidium* spp. in surface waters in Northern Ireland – *J Appl Microbiol*, **91**(5): 774-779
- LOWERY, C.J.; MILLAR, B.C.; MOORE, J.E.; XU, J.; XIAO, L.; ROONEY, P.J.; CROTHERS, L. E DOOLEY, J.S.G. (2002) – Molecular genotyping of human cryptosporidiosis in Northern Ireland: epidemiological aspects and review – *Ir J Med Sci*, **170**(4): 246-250
- MA, P.; KAUFMAN, D.L.; HELMICK, C.G.; D'SOUZA, A.J. E NAVIN, T.R. (1985) – Cryptosporidiosis in tourists returning from the caribbean – *N Engl J Med*, **312**(10): 647-648
- MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B. E DAVIS, J.P. (1994) – A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply – *N Engl J Med*, **331**(3): 161-167
- MACKENZIE, W.R.; SCHELL, W.L.; BLAIR, K.A.; ADDISS, D.G.; PETERSON, D.E.; HOXIE, N.J.; KAZMIERCZAK, J.J. E DAVIS, J.P. (1995) – Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission – *Clin Infect Dis*, **21**(1): 57-62
- MAGGI, P.; LAROCCA, A.M.V.; LADISA, N.; CARBONARA, S.; BRANDONISIO, O.; ANGARANO, G. E PASTORE, G. (2005) – Opportunistic parasitic infections of the intestinal tract in the era of highly antiretroviral therapy: is the CD4⁺ count so important? – *Clin Infect Dis*, **33**(9): 1609-1611
- MAJEWSKA, A.C.; KASPRZAK, W. E WERNER, A. (1997) – Prevalence of *Cryptosporidium* in mammals housed in Poznań Zoological Garden, Poland – *Acta Parasitol*, **42**(4): 195-198

- MALLON, M.; MACLEOD, A.; WASTLING, J.; SMITH, H.; REILLY, B. E TAIT, A. (2003a) – Population structures and the role of genetic exchange in zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum* – *J Mol Evol*, **56**(4): 407-417
- MALLON, M.E.; MACLEOD, A.; WASTLING, J.M.; SMITH, H. E TAIT, A. (2003b) – Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* type 2: population genetics and sub-structuring – *Infect Genet Evol*, **3**(3): 207-218
- MATOS, O.; TOMÁS, A.; AGUIAR, P.; CASEMORE, D. E ANTUNES, F. (1998) – Prevalence of cryptosporidiosis in AIDS patients with diarrhoea in Santa Maria Hospital, Lisbon – *Folia Parasitol*, **45**(2): 162-165
- MATOS, O.; ALVES, M.; LOBO, M.L. E ANTUNES, F. (2002) – Protozooses intestinais em indivíduos com infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) na era pós-HAART – *Livro de Resumos do 4º Congresso Nacional sobre SIDA*, Lisboa, Portugal, p. 11
- MATOS, O.; ALVES, M.; XIAO, L.; CAMA, V. E ANTUNES, F. (2004) – *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal – *Emerg Infect Dis*, **10**(12): 2255-2256
- MCLAUHLIN, J.; PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR-HOETZENEDER, C E NICHOLS, G.L. (1999) – Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis – *J Clin Microbiol*, **37**(10): 3153-3158
- MCLAUHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DÍAZ, S. E NICHOLS, G.L. (2000) – Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1.705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals – *J Clin Microbiol*, **38**(11): 3984-3990
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BREESE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M. E TAUXE, R.V. (1999) – Food-related illness and death in the United States – *Emerg Infect Dis*, **5**(5): 607-625
- MEINHARDT, P.L.; CASEMORE, D.P. E MILLER, K.B. (1996) – Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission – *Epidemiol Rev*, **18**(2): 118-136
- MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, C. E RUBIN, C.E. (1976) – Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient – *Gastroenterology*, **70**(6): 1156-1160
- MELO CRISTINO, J.A.G.; CARVALHO, M.I.P. E SALGADO, M.J. (1988) – An outbreak of cryptosporidiosis in a day-care centre – *Epidemiol Infect*, **101**(2): 355-359
- MIAO, Y.M.; AWAD-EL--KARIEM, F.M.; FRANZEN, C.; ELLIS, D.S.; MULLER, A.; COUNIHAN, H.M.; HAYES, P.J. E GAZZARD, B.G. (2000) – Eradication of cryptosporidia and microsporidia following successful antiretroviral therapy – *J Acquir Immune Defic Syndr*, **25**(2): 124-129

- MILLAR, B.C.; FINN, M.; XIAO, L.; LOWERY, C.J.; DOOLEY, J.S.G. E MOORE, J.E. (2002) – *Cryptosporidium* in foodstuffs - an emerging aetiological route of human foodborne illness – *Trends Food Sci Technol*, **13**(5): 168-187
- MILLARD, P.S.; GENSHEIMER, K.F.; ADDISS, D.G.; SOSIN, D.M.; BECKETT, G.A.; HOUCK-JANKOSKI, A. E HUDSON, A. (1994) – An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider – *JAMA*, **272**(20): 1592-1596
- MILSTEIN, T.C. E GOLDSMID, J.M. (1995) – The presence of *Giardia* and other zoonotic parasites of urban dogs in Hobart, Tasmania – *Aust Vet J*, **72**(4): 154-155
- MIRON, D.; KENES, J. E DAGAN, R. (1991) – Calves as a source of an outbreak of cryptosporidiosis among young children in an agricultural closed community – *Pediatr Infect Dis J*, **10**(6): 438-441
- MØLBAK, K.; ANDERSEN, M.; AABY, P.; HØJLYNG, N.; JAKOBSEN, M.; SODEMANN, M. E SILVA, A.P.J. (1997) – *Cryptosporidium* infection in infancy as a cause of malnutrition: a community study from Guinea-Bissau, West Africa – *Am J Clin Nutr*, **65**(1): 149-152
- MOLES, B.; TORRES, L.; MILAGRO, A.; GORRICO, J.; SEOANE, A. E NAVASCUES, J. (1998) – Incidencia de *Cryptosporidium* en Zaragoza: estudio de 8 años (1989-1996) – *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **16**(8): 12-14
- MONGE, R. E CHINCHILLA, M. (1996) – Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables – *J Food Prot*, **59**(2): 202-203
- MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D.; VEKRIS, A.; PETRY, K.G.; BONNET, J.; VIDAL, R.; CABRITA, J. E MÉGRAUD, F. (1997) – Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model – *J Clin Microbiol*, **35**(4): 995-998
- MOORE, J.E.; MILLAR, B.C.; LOWERY, C.J.; DOOLEY, J.S.G. E XIAO, L. (2003) – Research & *Cryptosporidium*: future challenges – “*Cryptosporidium parvum* in Food and Water” Conference Proceedings, Dublin, pp. 100-107, <http://www.teagasc.ie/publications/2003/conferences/cryptosporidiumparvum/>, consultado a 13 de Dezembro de 2004
- MORGAN, U.M.; CONSTANTINE, C.C.; O'DONOGHUE, P.; MELONI, B.P.; O'BRIEN, P.A. E THOMPSON, R.C.A. (1995) – Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis – *Am J Trop Med Hyg*, **52**(6): 559-564
- MORGAN, U.M.; SARGENT, K.D.; DEPLAZES, P.; FORBES, D.A.; SPANO, F.; HERTZBERG, H.; ELLIOT, A. E THOMPSON, R.C.A. (1998a) – Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts – *Parasitology*, **117**(Part 1): 31-37
- MORGAN, U.M.; SARGENT, K.D.; ELLIOT, A. E THOMPSON, R.C.A. (1998b) – *Cryptosporidium* in cats - additional evidence for *C. felis* – *Vet J*, **156**(2): 159-161

- MORGAN, U.; BUDDLE, J.R.; ARMSON, A.; ELLIOT, A. E THOMPSON, R.C.A. (1999a) – Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs – *Aust Vet J*, **77**(1): 44-47
- MORGAN, U.M.; DEPLAZES, P.; FORBES, D.A.; SPANO, F.; HERTZBERG, H.; SARGENT, K.D.; ELLIOT, A. E THOMPSON, R.C.A. (1999b) – Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts – *Parasitology*, **118**(Part 1): 49-58
- MORGAN, U.M.; STRUDEE, A.P.; SINGLETON, G.; GOMEZ, M.S.; GRACENEA, M.; TORRES, J.; HAMILTON, S.G., WOODSIDE, D.P. E THOMPSON, R.C.A. (1999c) – The *Cryptosporidium* “mouse” genotype is conserved across geographic areas – *J Clin Microbiol*, **37**(5): 1302-1305
- MORGAN, U.M.; XIAO, L.; FAYER, R.; GRACZYK, T.K.; LAL, A.A.; DEPLAZES, P. E THOMPSON, R.C.A. (1999d) – Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive reptiles using 18S rDNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis – *J Parasitol*, **85**(3): 525-530
- MORGAN, U.M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A.A. E THOMPSON, R.C.A. (1999e) – Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus – *Int J Parasitol*, **29**(11): 1733-1751
- MORGAN, U.; WEBER, R. XIAO, L.; SULAIMAN, I.; THOMPSON, R.C.A.; NDIRITU, W.; LAL, A.; MOORE, A. E DEPLAZES, P. (2000a) – Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya and the United States – *J Clin Microbiol*, **38**(3): 1180-1183
- MORGAN, U.M.; XIAO, L.; MONIS, P.; FALL, A.; IRWIN, P.J.; FAYER, R.; DENHOLM, K.M.; LIMOR, J.; LAL, A. E THOMPSON, R.C.A. (2000b) – *Cryptosporidium* spp. in domestic dogs: the “dog” genotype – *Appl Environ Microbiol*, **66**(5): 2220-2223
- MORGAN, U.M.; XIAO, L.; MONIS, P.; SULAIMAN, I.; PAVLASEK, I.; BLAGBURN, B.; OLSON, M.; UPTON, S.J.; KHRAMTSOV, N.V.; LAL, A.; ELLIOT, A. E THOMPSON, R.C.A. (2000c) – Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts – *Parasitology*, **120**(Part 5): 457-464
- MORGAN, U.M.; MONIS, P.T.; XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.; O'DONOGHUE, P.; GASSER, R.; MURRAY, A.; FAYER, R.; BLAGBURN, B.L.; LAL, A.A. E THOMPSON, R.C.A. (2001) – Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds – *Int J Parasitol*, **31**(3): 289-296
- MORGAN-RYAN, U.M.; FALL, A.; WARD, L.A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.; LAL, A. E XIAO, L. (2002) – *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens* – *J Eukaryot Microbiol*, **49**(6): 433-440

- MORIARTY, E.M.; MCEVOY, J.M.; LOWERY, C.J.; THOMPSON, H.P.; FINN, M.; SHERIDAN J.J.; BLAIR, I.S.; MCDOWELL D.A. E DUFFY, G. (2005) – Prevalence and characterisation of *Cryptosporidium* species in cattle faeces and on beef carcasses at slaughter – *Vet Rec*, **156**(6): 165-168
- MORRISON, D.A. E ELLIS, J.T. (1997) – Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of apicomplexa – *Mol Biol Evol*, **14**(4): 428-441
- MOULTON-HANCOCK, C.; ROSE, J.B.; VASCONCELOS, G.J.; HARRIS, S.I.; KLONICKI, P.T. E STURBAUM, G.D. (2000) – *Giardia* and *Cryptosporidium* occurrence in groundwater – *J AWWA*, **92**(9): 117-123
- MTAMBO, M.M.A.; NASH, A.S.; BLEWETT, D.A.; SMITH, H.V. E WRIGHT, S. (1991) – *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area – *Vet Rec*, **129**(23): 502-504
- MTAMBO, M.M.A.; SEBATWALE, J.B.; KAMBARAGE, D.M.; MUHAIRWA, A.P.; MAEDA, G.E.; KUSILUKA, L.J.M. E KAZWALA, R.R. (1997) – Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in cattle and wildlife in Morogoro region, Tanzania – *Prev Vet Med*, **31**(3-4): 185-190
- MWACHARI, C.; BATCHELOR, B.I.F.; PAUL, J.; WAIYAKI, P.G. E GILKS, C.F. (1998) – Chronic diarrhoea among HIV-infected adult patients in Nairobi, Kenya – *J Infect*, **37**(1): 48-53
- NAUMOVA, E.N.; EGOROV, A.I.; MORRIS, R.D. E GRIFFITHS, J.K. (2003) – The elderly and waterborne *Cryptosporidium* infection gastroenteritis hospitalisations before and during the 1993 Milwaukee outbreak – *Emerg Infect Dis*, **9**(4): 418-425
- NAUMOVA, E.N.; CHRISTODOULEAS, J.; HUNTER, P.R. E SYED, Q. (2005) – Effect of precipitation on seasonal variability in cryptosporidiosis recorded by North West England surveillance system in 1990-1999 – *J Water Health*, **3**(2): 185-196
- NAVARRETE, S.; STETLER, H.C.; AVILA, C.; ARANDA, J.A.G. E SANTOS-PRECIADO, J.I. (1991) – An outbreak of *Cryptosporidium* diarrhea in a pediatric hospital – *Pediatr Infect Dis J*, **10**(3): 248-250
- NEILL, M.A.; RICE, S.K.; AHMAD, N.V. E FLANIGAN, T.P. (1996) – Cryptosporidiosis: an unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients – *Clin Infect Dis*, **22**(1): 168-170
- NEWMAN, R.D.; ZU, S.; WUHI, T.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. E SEARS, C.L. (1994) – Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil – *Ann Inter Med*, **120**(6): 500-505
- NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; MOORE, S.R.; NATARO, J.P.; WUHI, T.; AGNEW, D.A.; GUERRANT, R.L. E LIMA, A.A.M. (1999) – Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil – *J Infect Dis*, **180**(1): 167-175

- NICHOLS, G. (1999) – Cryptosporidiosis associated with swimming pools in England – *Eurosurveillance Weekly*, **3**(48), <http://www.eurosurveillance.org/ew/1999/991125.asp#2>, consultado a 18 de Novembro de 2004
- NICHOLS, G.L.; MCCLAUCHLIN, J. E SAMUEL, D. (1991) – A technique for typing *Cryptosporidium* isolates – *J Protozool*, **38**(6): 237S-239S
- NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.L.; HOLSCHER, M.A. E YARDLEY, J.H. (1976) – Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium* – *Gastroenterology*, **70**(4): 592-598
- NINA, J.M.S.; McDONALD, V.; DEER, R.M.A.; WRIGHT, S.E.; DYSON, D.A.; CHIODINI, P.L. E MCADAM, K.P.W.J. (1992) – Comparative study of the antigenic composition of oocyst isolates of *Cryptosporidium parvum* from different hosts – *Parasite Immunol*, **14**(2): 227-232
- NIZEYI, J.B.; MWEBE, R.; NANTEZA, A.; CRANFIELD, M.R.; KALEMA, G.R.N.N. E GRACZYK, T.K. (1999) – *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. infections in mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda – *J Parasitol*, **85**(6): 1084-1088
- NÚÑEZ, F.A.; GONZÁLEZ, O.M.; GONZÁLEZ, I.; ESCOBEDO, A.A. E CORDOVÍ, R.A. (2003) – Intestinal coccidia in cuban pediatric patients with diarrhea – *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **98**(4): 539-542
- NWABUISI, C. (2001) – Childhood cryptosporidiosis and intestinal parasitosis in association with diarrhoea in Kwara State, Nigeria – *West Afr J Med*, **20**(2): 165-168
- O'DONOGHUE, P.J. (1995) – *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals – *Int J Parasitol*, **25**(2): 139-195
- OGUNKOLADE, B.W.; ROBINSON, H.A.; McDONALD, V; WEBSTER, K. E EVANS, D.A. (1993) – Isoenzyme variation within the genus *Cryptosporidium* – *Parasitol Res*, **79**(5): 385-388
- OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L.; CRABB, J.H.; STERLING, C.R. E DUPONT, H.L. (1999) – Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults – *J Infect Dis*, **180**(4): 1275-1281
- OKHUYSEN, P.C.; RICH, S.M.; CHAPPELL, C.L.; GRIMES, K.A.; WIDMER, G.; FENG, X. E TZIPORI, S. (2002) – Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of cervine origin for healthy adults and interferon- γ knockout mice – *J Infect Dis*, **185**(9): 1320-1325
- OLESEN, B.; NEIMANN, J.; BOTTIGER, B.; ETHELBERG, S.; SCHIELLERUP, P.; JENSEN, C.; HELMS, M.; SCHEUTZ, F.; OLSEN, K.E.; KROGFELT, K.; PETERSEN, E.; MOLBAK, K. E GERNER-SMIDT, P. (2005) – Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study – *J Clin Microbiol*, **43**(8): 3636-3641

- OLSON, M.E.; GUSELLE, N.J.; O'HANDLEY, R.M.; SWIFT, M.L.; MCALLISTER, T.A.; JELINSKI, M.D. E MORCK, D.W. (1997a) – *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia – *Can Vet J*, **38**(11): 703-706
- OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W. E MCALLISTER, T.A. (1997b) – *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals – *Vet Parasitol*, **68**(4): 375-381
- OLSON, M.E.; O'HANDLEY, R.M.; RALSTON, B.J.; MCALLISTER, T.A. E THOMPSON, R.C.A. (2004) – Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle – *Trends Parasitol*, **20**(4): 185-191
- ONG, C.S.L.; EISLER, D.L.; GOH, S.H.; TOMBLIN, J.; AWAD-EL-KARIEM, F.M.; BEARD, C.B.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A.; FYFE, M.; KING, A.; BOWIE, W.R. E ISAAC-RENTON, J.L. (1999) – Molecular epidemiology of cryptosporidiosis outbreaks and transmission in British Columbia, Canada – *Am J Trop Med Hyg*, **61**(1): 63-69
- ONG, C.S.L.; EISLER, D.L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V. W.K.; TOMBLIN, J.; BOWIE, W.R. E ISAAC-RENTON, J.L. (2002) – Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype – *Emerg Infect Dis*, **8**(3): 263-268
- ONO, K.; TSUJI, H.; RAI, S.K.; YAMAMOTO, A.; MASUDA, K.; ENDO, T.; HOTTA, H.; KAWAMURA, T. E UGA, S. (2001) – Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in Western Japan – *Appl Environ Microbiol*, **67**(9): 3832-3836
- ORTEGA, Y.R.; ROXAS, C.R.; GILMAN, R.H.; MILLER, N.J.; CABRERA, L.; TAQUIRI, C. E STERLING, C.R. (1997) – Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayatanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru – *Am J Trop Med Hyg*, **57**(6): 683-686
- PALIT, A.; SUR, D.; MITRADHAR, K. E SAHA, M.R. (2005) – Asymptomatic cryptosporidiosis in a periurban slum setting in Kolkata, India – a pilot study – *Jpn J Infect Dis*, **58**(2): 110-111
- PALMER, C.J.; XIAO, L.; TERASHIMA, A.; GUERRA, H.; GOTUZZO, E.; SALDÍAS, G.; BONILLA, J.A.; ZHOU, L.; LINDQUIST, A. E UPTON, S.J. (2003) – *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Perú – *Emerg Infect Dis*, **9**(9): 1174-1176
- PATEL, S.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; MCCLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D.P.; OUTBREAK CONTROL TEAM SOUTH AND WEST DEVON 1995 E INCIDENT MANAGEMENTTEAM AND FURTHER EPIDEMIOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL STUDIES SUBGROUP NORTH THAMES 1997 (1998) – Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks – *Commun Dis Public Health*, **1**(4): 231-233
- PAZ, V.C.; BRÍNGUEZ, M.B; VIAMONTE, B.V.; SUÁREZ, C.L.; RODRÍGUEZ, A.M. E MARTÍNEZ, Z.A. (2003) – Diagnóstico de coccidias y microsporas en muestras de heces diarreicas de pacientes cubanos seropositivos al VIH: primer reporte de microsporas en Cuba – *Rev Cubana Med Trop*, **55**(1): 14-18

- PEDERSEN, C.; DANNER, S.; LAZZARIN, A.; GLAUSER, M.P.; WEBER, R.; KATLAMA, C.; BARTON, S.E. E LUNDGREN, J.D. (1996) – Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients – *Genitourinary Med*, **72**(2): 128-131
- PEDRAZA-DÍAZ, S.; AMAR, C. E MCLAUHLIN, J. (2000) – The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis* – *FEMS Microbiol Lett*, **189**(2): 189-194
- PEDRAZA-DÍAZ, S.; AMAR, C.; IVERSEN, A.M.; STANLEY, P.J. E MCLAUHLIN, J. (2001a) – Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* “dog type” from patients in England – *J Med Microbiol*, **50**(1): 1-4
- PEDRAZA-DÍAZ, S.; AMAR, C.; NICHOLS, G.L. E MCLAUHLIN, J. (2001b) – Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene – *Emerg Infect Dis*, **7**(1): 49-56
- PENG, M.M.; XIAO, L.; FREEMAN, A.R.; ARROWOOD, M.J.; ESCALANTE, A.A.; WELTMAN, A.C.; ONG, C.S.L.; MACKENZIE, W.R.; LAL, A.A. E BEARD, C.B. (1997) – Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles – *Emerg Infect Dis*, **3**(4): 567-573
- PENG, M.M.; MATOS, O.; GATEI, W.; DAS, P.; STANTIC-PAVLINIC, M.; BERN, C.; SULAIMAN, I.M.; GLABERMAN, S.; LAL, A.L. E XIAO, L. (2001) – A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions – *J Eukaryot Microbiol*, Suppl: 28S-31S
- PENG, M.M.; MESHNICK, S.R.; CUNLIFFE, N.A.; THINDWA, B.D.M.; HART, C.A.; BROADHEAD, R.L. E XIAO, L. (2003a) – Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi – *J Eukaryot Microbiol*, **50**(6): 557-559
- PENG, M.M.; WILSON, M.L.; HOLLAND, R.E.; MESHNICK, S.R.; LAL, A.A. E XIAO, L. (2003b) – Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics – *Parasitol Res*, **90**(3): 175-180
- PERCH, M.; SODEMANN, M.; JAKOBSEN, M.S.; VALENTINER-BRANTH, P.; STEINSLAND, H.; FISCHER, T.K.; LOPES, D.D.; AABY, P. E MØLBAK, K. (2001) – Seven years’ experience with *Cryptosporidium parvum* in Guinea-Bissau, West Africa – *Ann Trop Paediatr*, **21**(4): 313-318
- PEREIRA, M.G.C.; ATWILL, E.R.; BARBOSA, A.P.; SILVA, S.A. E GARCÍA-ZAPATA, M.T.A. (2002) – Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil – *Am J Trop Med Hyg*, **66**(6): 787-793
- PEREIRA, S.J.; RAMIREZ, N.E.; XIAO, L. E WARD, L.A. (2002) – Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs – *J Infect Dis*, **186**(5): 715-718

- PEREIRA DA FONSECA, I.M.S. (2000) – Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: caracterização genética de isolados de *Cryptosporidium parvum* de origem bovina – Tese de dissertação de candidatura ao grau de Doutor, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 274 pp.
- PEREIRA DA FONSECA, I.; FAZENDEIRO, I. E ANTUNES, F. (2001) – Genetic characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from cattle in Portugal: animal and human implications – *J Eukaryot Microbiol*, Suppl: 32S
- PERZ, J.F. E LE BLANCQ, S.M. (2001) – *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State – *Appl Environ Microbiol*, **67**(3): 1154-1162
- PETRY, F. (2000) – “Laboratory diagnosis of *Cryptosporidium parvum* infection” – in *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. Contributions Microbiology*, Petry F. ed., Basel, Karger, **6**: 33-49
- PETRY, F. (2004) – Structural analysis of *Cryptosporidium parvum* – *Microsc Microanal*, **10**(5): 586-601
- PHLS - PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE STUDY GROUP (1990) – Cryptosporidiosis in England and Wales: prevalence and clinical and epidemiological features – *BMJ*, **300**(6727): 774-777
- PIENIAZEK, N.J.; BORNAY-LLINARES, F.J.; SLEMENDA, S.B.; DA SILVA, A.J.; MOURA, I.N.S.; ARROWOOD, M.J.; DITRICH, O. E ADDISS, D.G. (1999) – New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons – *Emerg Infect Dis*, **5**(3): 444-449
- PIRES, V.C.; SILVA, A. E MOITA, S. (2004) – Caracterização climática 2003 – Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Instituto de Meteorologia, 26 pp., http://web.meteo.pt/resources/im/pdfs/clim_ap_00_03.pdf, consultado a 9 de Julho de 2005
- PLAAMI, S. (1997) – Myoinositol phosphates: analysis, content in foods and effects in nutrition – *LWT-Food Sci Technol*, **30**(7): 633-647
- POWER, M.L.; SLADE, M.B.; SANGSTER, N.C. E VEAL, D.SA. (2004) – Genetic characterisation of *Cryptosporidium* from a wild population of eastern grey kangaroos *Macropus giganteus* inhabiting a water catchment – *Infect Genet Evol*, **4**(1): 59-67
- POZIO, E.; REZZA, G.; BOSCHINI, A.; PEZZOTTI, P.; TAMBURRINI, A.; ROSSI, P.; DI FINE, M.; SMACCHIA, C.; SCHIESARI, A.; GATTEI, E.; ZUCCONI, R. E BALLARINI, P. (1997) – Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)-induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIV-positive and HIV-negative former injection drug users – *J Infect Dis*, **176**(4): 969-975
- POZIO, E.; RIVASI, F. E CACCIÒ, S.M. (2004) – Infection with *Cryptosporidium hominis* and reinfection with *Cryptosporidium parvum* in a transplanted ileum – *APMIS*, **112**(4-5): 309-313

- POZIO, E. E MORALES, M.A.G. (2005) – The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites – *Trends Parasitol*, **21**(2): 58-63
- PRASAD, K.N.; NAG, V.L.; DHOLE, T.N. E AYYAGARI, A. (2002) – Identification of enteric pathogens in HIV-positive patients with diarrhoea in Northern India – *J Health Popul Nutr*, **18**(1): 23-26
- PREISER, G.; PREISER, L. E MADEO, L. (2003) – An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves – *J Am Coll Health*, **51**(5): 213-215
- PRITCHARD, G.C. E FLEETWOOD, A.J. (1995) – Cryptosporidiosis and farm visits – *Vet Rec*, **136**(7): 179
- PUECH, M.C.; MCANULTY, J.M.; LESJAK, M.; SHAW, N.; HERON, L. E WATSON, J.M. (2001) – A statewide outbreak of cryptosporidiosis in New South Wales associated with swimming at public pools – *Epidemiol Infect*, **126**(3): 389-396
- QUILEZ, J.; VERGARA-CASTIBLANCO, C.; SANCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E. E LOPEZ-BERNAD, F. (2001) – Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en ganado caprino en la Provincia de Zaragoza. Estudio preliminar – *Acta Parasitol Port*, **8**(2): 167
- QUIROZ, E.S.; BERN, C.; MACARTHUR, J.R.; XIAO, L.; FLETCHER, M.; ARROWOOD, M.J.; SHAY, D.K.; LEVY, M.E.; GLASS, R.I. E LAL, A. (2000) – An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler – *J Infect Dis*, **181**(2): 695-700
- QUY, R.J.; COWAN, D.P.; HAYNES, P.J.; STURDEE, A.P.; CHALMERS, R.M.; BODLEY-TICKELL, A.T. E BULL, S.A. (1999) – The norway rat as a reservoir host of *Cryptosporidium parvum* – *J Wildl Dis*, **35**(4): 660-670
- RAMIREZ, N.E.; WARD, LUCY A. E SREEVATSAN, S. (2004) – A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals – *Microbes Infect*, **6**(8): 773-785
- RAPHAEL, B.L.; CALLE, P.P.; GOTTDENKER, N.; JAMES, S.; KARESH, W.R.; LINN, M.J.; MCNAMARA, T. E COOK, R.A. (1997) – Clinical significance of *Cryptosporidia* in captive and free-ranging chelonians – *Proc Am Assoc Zoo Vet*, pp. 19-20
- REDLINGER, T.; CORELLA-BARUD, V.; GRAHAM, J.; GALINDO, A.; AVITIA, R. E CARDENAS, V. (2002) – Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States-Mexico border – *Am J Trop Med Hyg*, **66**(6): 794-798
- REESE, N.C.; CURRENT, W.L.; ERNST, J.V. E BAILEY, W.S. (1982) – Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats – *Am J Trop Med Hyg*, **31**(2): 226-229
- RIBEIRO, C.D. E PALMER, S.R. (1986) – Family outbreak of cryptosporidiosis – *BMJ*, **292**(6517): 377

- RIBEIRO, P.C.; PILE, E.; QUEIROZ, M.M.C.; NORBERG, A.N. E TENÓRIO, J.R.O. (2004) – Cryptosporidiosis occurrence in HIV+ patients attended in a hospital, Brazil – *Rev Saúde Pública*, **38**(3): 469-470
- RIBES, J.A.; SEABOLT, J.P. E OVERMAN, S.B. (2004) – Point prevalence of *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, and *Isospora* infections in patients being evaluated for diarrhea – *Am J Clin Pathol*, **122**(1): 28-32
- RICKARD, L.G.; SIEFKER, C.; BOYLE, C.R. E GENTZ, E.J. (1999) – The prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in fecal samples from free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the southeastern United States – *J Vet Diagn Invest*, **11**(1): 65-72
- ROBERTSON, B.; SINCLAIR, M.I.; FORBES, A.B.; VEITCH, M.; KIRK, M.; CUNLIFFE, D.; WILLIS, J. E FAIRLEY, C.K. (2002) – Case-control studies of sporadic cryptosporidiosis in Melbourne and Adelaide, Australia – *Epidemiol Infect*, **128**(3): 419-431
- ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J.; LYMBERY, A.J. E THOMPSON, R.C.A. (2000) – The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses – *Int J Parasitol*, **30**(12-13): 1369-1377
- ROBERTSON, L.J.; CAMPBELL, A.T. E SMITH, H.V. (1992) – Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures – *Appl Environ Microbiol*, **58**(11): 3494-3500
- ROBERTSON, L.J. E GJERDE, B. (2001a) – Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway – *Scand J Public Health*, **29**(3): 200-207
- ROBERTSON, L.J. E GJERDE, B. (2001b) – Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway – *J Food Prot*, **64**(11): 1793-1798
- ROCHELLE, P.A.; UPTON, S.J.; MONTELONE, B.A. E WOODS, K. (2005) – The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light – *Trends Parasitol*, **21**(2): 81-87
- ROSALES, M.J.; CORDÓN, G.P.; MORENO, M.S.; SÁNCHEZ, C.M. E MASCARÓ, C. (2005) – Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum* – *Acta Trop*, **95**(1): 74-78
- ROSE, J.B.; HUFFMAN, D.E. E GENNACCARO, A. (2002) – Risk and control of waterborne cryptosporidiosis – *FEMS Microbiol Rev*, **26**(2): 113-123
- ROSSI, P.; RIVASI, F.; CODELUPPI, M.; CATANIA, A.; TAMBURRINI, A.; RIGHI, E. E POZIO, E. (1998) – Gastric involvement in AIDS associated cryptosporidiosis – *Gut*, **43**(4): 476-477
- ROSSIGNOL, J.-F.; HIDALGO, H.; FEREGRINO, M.; HIGUERA, F.; GOMEZ, W.H.; ROMERO, J.L.; PADIARNA, J.; GEYNE, A. E AYERS, M.S. (1998) – A double ‘blind’ placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients in Mexico – *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **92**(6): 663-666

- ROY, S.L.; DELONG, S.M.; STENZEL, S.A.; SHIFERAW, B.; ROBERTS, J.M.; KHALAKDINA, A.; MARCUS, R.; SEGLER, S.D.; SHAH, D.D.; THOMAS, S.; VUGIA, D.J.; ZANSKY, S.M.; DIETZ, V.; BEACH, M.J. E EMERGING INFECTIONS PROGRAM FOODNET WORKING GROUP (2004) – Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001 – *J Clin Microbiol*, **42**(7): 2944-2951
- RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I.M.; MONIS, P.; LAL, A.A.; FAYER, R. E PAVLASEK, I. (2003a) – A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds – *J Parasitol*, **89**(4): 809-813
- RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A.A. E PAVLASEK, I. (2003b) – Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic – *Appl Environ Microbiol*, **69**(7): 4302-4307
- RYAN, U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H.L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, R.; ROBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R.C. E XIAO, L. (2004) – *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*) – *J Parasitol*, **90**(4): 769-773
- RYAN, U.M.; BATH, C.; ROBERTSON, I.; READ, C.; ELLIOT, A.; MCINNES, L.; TRAUB, R. E BESIER, B. (2005) – Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites – *Appl Environ Microbiol*, **71**(9): 4992-4997
- SAKAI, H.; TSUSHIMA, Y.; NAGASAWA, H.; DUCUSIN, R.J.T.; TANABE, S.; UZUKA, Y. E SARASHINA, T. (2003) – *Cryptosporidium* infection of cattle in the Tokachi District, Hokkaido – *J Vet Med Sci*, **65**(1): 125-127
- SAKSIRISAMPANT, W.; EAMPOKALAP, B.; RATTANASRITHONG, M.; LIKANONSAKUL, S.; WIWANITKIT, V.; NASINGKARN, A. E DENMASAE, N. (2002) – A prevalence of *Cryptosporidium* infections among Thai HIV-infected patients – *J Med Assoc Thai*, **85**(Supl.1): S424-S428
- SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E. E FAYER, R. (2004) – Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves – *Vet Parasitol*, **122**(2): 103-117
- SARGENT, K.D.; MORGAN, U.M.; ELLIOT, A. E THOMPSON, R.C.A. (1998) – Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats – *Vet Parasitol*, **77**(4): 221-227
- SAYERS, G.M.; DILLON, M.C.; CONNOLLY, R.; THORNTON, L.; HYLAND, E.; LOUGHMAN, E.; O'MAHONY, M.A. E BUTLER, K.M. (1996) – Cryptosporidiosis in children who visited an open farm – *Commun Dis Rep CDR Rev*, **6**(10): R140-R144
- SHIODA, M. E MURAKAMI-MUROFUSHI, K. (1987) – Selective inhibition of DNA polimerase □ by a polysaccharide purified from slime of *Physarum polycephalum* – *Biochem Biophys Res Commun*, **146**(1): 61-66

- SIEFKER, G.; RICKARD, L.G.; PHARR, G.T.; SIMMONS, J.S. E O'HARA, T.M. (2002) – Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. isolated from northern alaskan caribou (*Rangifer tarandus*) – *J Parasitol*, **88**(1): 213-216
- SILVA, A.; CACCIÒ, S.; WILLIAMS, C.; WON, K.Y.; NACE, E.K.; WHITTIER, C.; PIENIAZEK, N.J. E EBERHARD, M.L. (2003) – Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs – *Vet Parasitol*, **111**(4): 297-307
- SILVA, C.V.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. E COSTA-CRUZ, J.M. (2005) – Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil – *Scand J Infect Dis*, **37**(3): 211-215
- SINSKI, E.; HLEBOWICZ, E. E BEDNARSKA, M. (1993) – Occurrence of *Cryptosporidium parvum* infection in wild small mammals in District of Mazury Lake (Poland) – *Acta Parasitol*, **38**(2): 59-61
- SLOPER, K.S.; DOURMASHKIN, R.R.; BIRD, R.B.; SLAVIN, G. E WEBSTER, A.D.B. (1982) – Chronic malabsorption due to cryptosporidiosis in a child with immunoglobulin deficiency – *Gut*, **23**(1): 80-82
- SMERDON, W.J.; NICHOLS, T.; CHALMERS, R.M.; HEINE, H. E REACHER, M. (2003) – Foot and mouth disease in livestock and reduced cryptosporidiosis in humans, England and Wales – *Emerg Infect Dis*, **9**(1): 22-28
- SMITH, H.V. E ROSE, J.B. (1998) – Waterborne cryptosporidiosis: current status – *Parasitol Today*, **14**(1): 14-22
- SORVILLO, F.; BEALL, G.; TURNER, P.A.; BEER, V.L.; KOVACS, A.A.; KRAUS, P.; MASTERS, D. E KERNDT, P.R. (1998) – Seasonality and factors associated with cryptosporidiosis among individuals with HIV infection – *Epidemiol Infect*, **121**(1): 197-204
- SPAIN, C.V.; SCARLETT, J.M.; WADE, S.E. E MCDONOUGH, P. (2001) – Prevalence of enteric zoonotic agents in cats less than 1 year old in Central New York State – *J Vet Intern Med*, **15**(1): 33-38
- SPANO, F.; PURI, C.; RANUCCI, L.; PUTIGNANI, L. E CRISANTI, A. (1997a) – Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development – *Parasitology*, **114**(Part 5): 427-437
- SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; MCCLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D. E CRISANTI, A. (1997b) – PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin – *FEMS Microbiol Lett*, **150**(2): 209-217
- SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; CRISANTI, A.; SALLICANDRO, P.; MORGAN, U.M.; LE BLANCQ, S.M.; TCHACK, L.; TZIPORI, S. E WIDMER, G. (1998a) – Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins – *J Clin Microbiol*, **36**(11): 3255-3259

- SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; GUIDA, S. E CRISANTI, A. (1998b) – *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium-1*) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin – *Exp Parasitol*, **90**(2): 195-198
- SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; NAITZA, S.; PURI, C.; WRIGHT, S. E CRISANTI, A. (1998c) – Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family – *Mol Biochem Parasitol*, **92**(1): 147-162
- SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D. E JEWELL, S. (2002) – Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids – *Am J Pathol*, **161**(6): 1961-1971
- STEINBERG, E.B.; MENDOZA, C.E.; GLASS, R.; ARANA, B.; LOPEZ, M.B.; MEJIA, M.; GOLD, B.D.; PRIEST, J.Y.; BIBB, W.; MONROE, S.S.; BERN, C.; BELL, B.P.; HOEKSTRA, R.M.; KLEIN, R.; MINTZ, E.D. E LUBY, S. (2004) – Prevalence of infection with waterborne pathogens: A seroepidemiologic study in children 6-36 months old in San Juan Sacatepequez, Guatemala – *Am J Trop Med Hyg*, **70**(1): 83-88
- STRONG, W.B.; GUT, J. E NELSON, R.G. (2000) – Cloning and sequence analysis of a high polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products – *Infect Immun*, **68**(7): 4117-4134
- STURDEE, A.P.; CHALMERS, R.M. E BULL, S.A. (1999) – Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain – *Vet Parasitol*, **80**(4): 273-280
- STURDEE, A.P.; BODLEY-TICKELL, A.T.; ARCHER, A. E CHALMERS, R.M. (2003) – Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom – *Vet Parasitol*, **116**(2): 97-113
- SULAIMAN, I.M.; XIAO, L.; YANG, C.; ESCALANTE, L.; MOORE, A.; BEARD, C.B.; ARROWOOD, M.J. E LAL, A.A. (1998) – Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum* – *Emerg Infect Dis*, **4**(4): 681-685
- SULAIMAN, I.M.; XIAO, L. E LAL, A.A. (1999) – Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques – *Appl Environ Microbiol*, **65**(10): 4431-4435
- SULAIMAN, I.M.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A.; LAL, A.A. E XIAO, L. (2000) – Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene – *Appl Environ Microbiol*, **66**(6): 2385-2391
- SULAIMAN, I.M.; LAL, A.L. E XIAO, L. (2001) – A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites – *J Eukaryot Microbiol*, Suppl: 24S-27S
- SULAIMAN, I.M.; LAL, A.A. E XIAO, L. (2002) – Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus – *J Parasitol*, **88**(2): 388-394

- SULAIMAN, I.M.; HIRA, P.R.; ZHOU, L.; AL-ALI, F.M.; AL-SHELAHI, F.A.; SHWEIKI, H.M.; IQBAL, J.; KHALID, N. E XIAO, L. (2005) – Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait – *J Clin Microbiol*, **43**(6): 2805-2809
- SVENUNGSSON, B.; LAGERGREN, A.; EKWALL, E.; EVENGÅRD, B.; HEDLUND, K.O.; KÄRNELL, A.; LÖFDAHL, S.; SVENSSON, L. E WEINTRAUB, A. (2000) – Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a swedish clinic for infectious diseases – *Clin Infect Dis*, **30**(5): 770-778
- TAMBURRINI, A. E POZIO, E. (1999) – Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*) – *Int J Parasitol*, **29**(5): 711-715
- TANYÜKSEL, M.; GÜN, H. E DOGANCI, L. (1995) – Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea – *Scand J Infect Dis*, **27**(1): 69-70
- TENTER, A.M. E JOHNSON, A.M. (1997) – Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia – *Adv Parasitol*, **39**: 69-139
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. E HIGGINS, D.G. (1997) – The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools – *Nucleic Acids Res*, **25**(24): 4876-4882
- THOMPSON, R.C.A.; CONSTANTINE, C.C. E MORGAN, U.M. (1998) – Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology? – *Parasitology*, **117**(Suppl): S161-S175
- THOMPSON, R.C.A. (2003) – Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections – *J Protozool*, **89**(Suppl): S134-S140
- THORNTON, C.G. E PASSEN, S. (2004) – Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition – *J Microbiol Methods*, **59**(1): 43-52
- THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; WATT, P.; DOWD, S.E.; ENRIQUEZ, R.; PEPPER, I.L. E GERBA, C.P. (2002) – Detection of protozoan parasites and Microsporidia in irrigation waters used for crop production – *J Food Prot*, **65**(2): 378-382
- TIANGTIP, R. E JONGWUTIWES, S. (2002) – Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand – *Trop Med Int Health*, **7**(4): 357-364
- TOMÁS, A.M.; MATOS, O.M.G.; BELO, S.; GRÁCIO, M.A. E ANTUNES, F. (1992) – Parasitas intestinais em indivíduos com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana – *I^{as} Jornadas de Doenças Infecciosas e de Medicina Tropical*, Lisboa, Portugal (poster)
- TORRES, J.; GRACENEA, M.; GÓMEZ, M.S.; ARRIZABALAGA, A. E GONZÁLEZ-MORENO, O. (2000) – The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain – *Vet Parasitol*, **92**(4): 253-260

- TRAVERSA, D.; GIANGASPERO, A.; MOLINI, U.; IORIO, R.; PAOLETTI, B.; OTRANTO, D. E GIANSANTE, C. (2004a) – Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from *Chamelea gallina* clams in Italy – *Appl Environ Microbiol*, **70**(7): 4367-4370
- TRAVERSA, D.; KASSA, H.; TISCHLER, M.L. E XIAO, L. (2004b) – Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*) – *Appl Environ Microbiol*, **70**(7): 4211-4215
- TUMWINE, J.K.; KEKITHIINWA, A.; NABUKEERA, N.; AKIYOSHI, D.E.; RICH, S.M.; WIDMER, G.; FENG, X. E TZIPORI, S. (2003) – *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda – *Am J Trop Med Hyg*, **68**(6): 710-715
- TURNWALD, G.H.; BARTA, O.; TAYLOR, H.W.; KREEGER, J.; COLEMAN, S.U. E POURCIAU, S.S. (1988) – Cryptosporidiosis associated with immunosuppression attributable to distemper in a pup – *J Am Vet Med Assoc*, **192**(1): 79-81
- TYZZER, E.E. (1907) – A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse – *Proc Soc Exp Biol Med*, **5**: 12-13
- TYZZER, E.E. (1910) – An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse – *J Med Res*, **23**(18): 487-509
- TYZZER, E.E. (1912) – *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse – *Arch Protist*, **26**: 394-418
- TZIPORI, S. (1983) – Cryptosporidiosis in animals and humans – *Microbiol Rev*, **47**(1): 84-96
- TZIPORI, S. (2002) – Introduction. Cryptosporidiosis: current trends and challenges – *Microbes Infect*, **4**(10): 1045
- TZIPORI, S. E WARD, H. (2002) – Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease – *Microbes Infect*, **4**(10): 1047-1058
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2002) – FDA approves new treatment for parasitic infections in pediatric patients – *FDA Talk Paper*, <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2002/ANS01178.html>, consultado a 7 de Dezembro de 2004
- VAKIL, N.B.; SCHWARTZ, S.M.; BUGGY, B.P.; BRUMMITT, C.F.; KHERELLAH, M.; LETZER, D.M.; GILSON, U.H. E JONES, P.G. (1996) – Biliary cryptosporidiosis in HIV-infected people after the waterborne outbreak of cryptosporidiosis in Milwaukee – *N Engl J Med*, **334**(1): 19-23
- VAN ASPEREN, I.A.; MARK, T.; MEDERNA, G.J.; STIJNEN, C.; DE BOER, A.S.; GROOT, J.F.; TEN HAM, P.; SLUITERS, J.F. E BORGdorFF, M.W. (1996) – Une épidémie de cryptosporidiose aux Pays-Bas – *Euro Surveill*, **1**(2): 11-12
- VAN DE PEER, Y. E DE WACHTER, R. (1994) – TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment – *Comput Appl Biosci*, **10**(5): 569-570

- VÁSQUEZ, J.R.; GOOZÉ, L.; KIM, K.; GUT, J.; PETERSEN, C. E NELSON, R.G. (1996) – Potential antifolate resistance determinants and genotypic variation in the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* – *Mol Biochem Parasitol*, **79**(2): 153-165
- VEVERKA, F.; SAPHIRO, N.; PARISH, M.K.; BECKER, W.; SMITH, F.; ALLENSWORTH, C.; BAKER, T.; IWEN, P. E SAFRANEK, T. (2001) – Protracted outbreaks of cryptosporidiosis associated with swimming pool use – Ohio and Nebraska, 2000 – *JAMA*, **285**(23): 2967-2969
- WADE, S.E.; MOHAMMED, H.O. E SCHAAF, S.L. (2000) – Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York – *Vet Parasitol*, **93**(1): 1-11
- WALSH, P.S.; FILDES, N.J. E REYNOLDS, R. (1996) – Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA – *Nucleic Acids Res*, **24**(14): 2807-2812
- WARD, H. E CEVALLOS, A.M. (1998) – *Cryptosporidium*: molecular basis of host-parasite interaction – *Adv Parasitol*, **40**: 151-185
- WARD, P.I.; DEPLAZES, P.; REGLI, W.; RINDER, H. E MATHIS, A. (2002) – Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe – *Parasitology*, **124**(Part 4): 359-368
- WEBER, J.L. E MAY, P.E. (1989) – Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction – *Am J Hum Genet*, **44**(3): 388-396
- WEBER, R.; BRYAN, R.T. E JURANEK, D.D. (1992) – Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens – *J Clin Microbiol*, **30**(11): 2869-2873
- WEBSTER, J.P. E MACDONALD, D.W. (1995) – Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms – *Parasitology*, **111**(Part 3): 247-255
- WHEELER, J.G.; SETHI, D.; COWDEN, J.M.; WALL, P.G.; RODRIGUES, L.C.; TOMPKINS, D.S.; HUDSON, M.J. E RODERICK, P.J. (1999) – Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance – *BMJ*, **318**(7190): 1046-1050
- WIDJOATMODJO, M.N.; FLUIT, A.D.C.; TORENSMA, R.; VERDONK, G.P.H.T. E VERHOEF, J. (1992) – The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of *Salmonellae* in fecal samples – *J Clin Microbiol*, **30**(12): 3195-3199
- WIDMER, G. (1998) – Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum* – *Adv Parasitol*, **40**: 223-239

- WILLOCKS, L.; CRAMPIN, A.; MILNE, L.; SENG, C.; SUSMAN, M.; GAIR, R.; MOULSDALE, M.; SHAFI, S.; WALL, R.; WIGGINS, R. E LIGHTFOOT, N. (1998) – A large outbreak of cryptosporidiosis associated with a public water supply from a deep chalk borehole – *Commun Dis Public Health*, **1**(4): 239-243
- WILSON, I.G. (1997) – Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification – *Appl Environ Microbiol*, **63**(10): 3741-3751
- WILSON, R.B.; HOLSCHER, M.A. E LYLE, S.J. (1983) – Cryptosporidiosis in a pup – *J Am Vet Med Assoc*, **183**(9): 1005-1006
- WU, Z.; NAGANO, I.; BOONMARS, T.; NAKADA, T. E TAKAHASHI, Y. (2003) – Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (FRLP) and RFLP-single strand conformational polymorphism analyses – *Appl Environ Microbiol*, **69**(8): 4720-4726
- XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J.; FAYER, R. E LAL, A.A. (1999a) – Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus – *Appl Environ Microbiol*, **65**(4): 1578-1583
- XIAO, L.; LIMOR, J.R.; LI, L.; MORGAN, U.; THOMPSON, R.C.A. E LAL, A.A. (1999b) – Presence of heterogeneous copies of the small subunit rRNA gene in *Cryptosporidium parvum* human and marsupial genotypes and *Cryptosporidium felis* – *J Eukaryot Microbiol*, **46**(5): 44S-45S
- XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R.C.A.; FAYER, R. E LAL, A.A. (1999c) – Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species – *Appl Environ Microbiol*, **65**(8): 3386-3391
- XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M. E LAL, A.A. (2000a) – Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool – *Appl Environ Microbiol*, **66**(12): 5492-5498
- XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U.M.; SULAIMAN, I.M.; THOMPSON, R.C.A. E LAL, A.A. (2000b) – Sequence differences in the diagnostic target region of the oocysts wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites – *Appl Environ Microbiol*, **66**(12): 5499-5502
- XIAO, L.; MORGAN, U.M.; FAYER, R.; THOMPSON, R.C.A. E LAL, A.A. (2000c) – *Cryptosporidium* systematics and implications for public health – *Parasitol Today*, **16**(7): 287-292
- XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R.H. E LAL, A.A. (2001a) – Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru – *J Infect Dis*, **183**(3): 492-497
- XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T.K.; GRADUS, S. E LAL, A. (2001b) – Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater – *Appl Environ Microbiol*, **67**(3): 1097-1101

- XIAO, L.; BERN, C.; ARROWOOD, M.; SULAIMAN, I.; ZHOU, L.; KAWAI, V.; VIVAR, A.; LAL, A.A. E GILMAN, R.H. (2002a) – Identification of *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient – *J Infect Dis*, **185**(12): 1846-1848
- XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M.L.; ZHANG, X.; FAYER, R. E LAL, A.A. (2002b) – Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health – *Int J Parasitol*, **32**(14): 1773-1785
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U. E UPTON, S.J. (2004a) – *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health – *Clin Microbiol Rev*, **17**(1): 72-97
- XIAO, L. E RYAN, U.M. (2004) – Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology – *Curr Opin Infect Dis*, **17**(5): 483-490
- XIAO, L.; RYAN, U.M.; GRACZYK, T.K.; LIMOR, J.; LI, L.; KOMBERT, M.; JUNGE, R.; SULAIMAN, I.M.; ZHOU, L.; ARROWOOD, M.J.; KOUDELA, B.; MODRÝ, D. E LAL, A.A. (2004b) – Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles – *Appl Environ Microbiol*, **70**(2): 891-899
- YAGITA, K.; IZUMIYAMA, S.; TACHIBANA, H.; MASUDA, G.; ISEKI, M.; FURUYA, K.; KAMEOKA, Y.; KUROKI, T.; ITAGAKI, T. E ENDO, T. (2001) – Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan – *Parasitol Res*, **87**(11): 950-955
- YU, J.-R. E SEO, M. (2004) – Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum* – *Korean J Parasitol*, **42**(1): 45-47
- ZHOU, L.; SINGH, A.; JIANG, J. E XIAO, L. (2003) – Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics – *J Clin Microbiol*, **41**(11): 5254-5257
- ZHOU, L.; FAYER, R.; TROUT, J.M.; RYAN, U.M.; SCHAEFER III, F.W. E XIAO, L. (2004) – Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans – *Appl Environ Microbiol*, **70**(12): 7574-7577
- ZHU, G.; KEITHLY, J.S. E PHILIPPE, H. (2000a) – What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? – *Int J Syst Evol Microbiol*, **50**(Part 4): 1673-1681
- ZHU, G.; MARCHEWKA, M.J. E KEITHLY, J. (2000b) – *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastic genome – *Microbiology*, **146**(Part 2): 315-321