



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



*“Fatores ambientais associados à presença do *Cryptosporidium* spp. em
animais domésticos de companhia numa população de idosos do
Município de Teresópolis, RJ – Estudo de Caso”*

por

Cassia Regina Alves Pereira

*Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências
na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.*

*Orientador principal: Prof. Dr. Aído Pacheco Ferreira
Segunda orientadora: Prof.ª Dr.ª Rosalina Jorge Koifman*

Rio de Janeiro, maio de 2011.



Esta tese, intitulada

*“Fatores ambientais associados à presença do *Cryptosporidium* spp. em
animais domésticos de companhia numa população de idosos do
Município de Teresópolis, RJ – Estudo de Caso”*

apresentada por

Cassia Regina Alves Pereira

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Valeria Saraceni

Prof.^a Dr.^a Maria da Glória Bonecini de Almeida

Prof. Dr. Salvatore Siciliano

Prof.^a Dr.^a Brani Rozemberg

Prof. Dr. Aldo Pacheco Ferreira – Orientador principal

Tese defendida e aprovada em 05 de maio de 2011.

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

P436 Pereira, Cassia Regina Alves
Fatores ambientais associados à presença do *Cryptosporidium*
spp. em animais domésticos de companhia numa população de
idosos do Município de Teresópolis, RJ – estudo de caso. / Cassia
Regina Alves Pereira. -- 2011.
v,141 f. : tab.

Orientador: Ferreira, Aldo Pacheco
Koifman, Rosalina Jorge

Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio
Arouca, Rio de Janeiro, 2011.

1. *Cryptosporidium*. 2. Meio Ambiente. 3. Animais
Domésticos. 4. Idoso. 5. Diarréia. 6. Fatores de Risco. I. Título.

CDD – 22.ed. – 362.6

*À Mariana, Juliana e Daniel, como prova
de que convém sonhar, porém há muita dedicação
para que um sonho se torne realidade.*

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Aldo Pacheco Ferreira por sua retidão de caráter, exemplo de educador, incentivando a caminhada, acreditando nos projetos e nos determinando para que o olhar não se desvie do objetivo maior.

Aos professores Doutores Examinadores: Valeria Saraceni, Maria da Gloria Bonecini de Almeida, Brani Rozemberg, Cynara de Lourdes Nóbrega da Cunha e Salvatore Siciliano pelas críticas e contribuições a esse trabalho.

Pela ajuda inestimável nas análises laboratoriais, agradeço à Fátima Christina da Silva Guerra, Jacira Cordeiro de Faria, Bianca Pinheiro de Macedo e Carla Monteiro.

A Prefeitura de Teresópolis pela figura do ex-Secretário de Saúde Dr. Paulo Camandaroba pela facilitação e apoio junto às campanhas de vacinação de idosos.

Ao colega Marco Aurélio Pereira Horta pelas contribuições estatísticas e nas discussões científicas.

Às colegas de turma: Leila Sicupira C. S. Leão, Maria Isabel do Nascimento, Eliana Napoleão Cozendey da Silva e Lúcia Gomes Rodrigues pelo carinho de sempre.

A Antônio Luzardo, Arnaldo Couto e Margarete Afonso, colegas de sala e de todas as horas, das horas de estudo, dos momentos de relax com camarões fritos na hora e cervejinha gelada ou mesmo que apenas por alguns minutos de convivência – valeu!

À Mariana, Juliana, Cleusa Maria, Célia Regina, Antônio Cláudio e Marcos Antônio pela compreensão das horas ausentes de convivência, pelos bilhetinhos de incentivos colocados sorrateiramente em minha agenda, pelas xícaras de café durante a tarde, as lágrimas e sorrisos de todas as horas, a ajuda logística e todo apoio que uma verdadeira família pode dar.

Ao meu padrinho e muito querido Sr. Manoel por acreditar no meu esforço e nunca me deixar sem uma palavra de Pai meu sincero agradecimento.

*“Muitas vezes basta ser:
colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta,
silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre,
olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove.
E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.”*

Cora Coralina

RESUMO

A criptosporidiose é uma importante zoonose responsável por manifestações clínicas de diarreias e gastroenterites, associado à dor abdominal, em seres humanos e animais domésticos causada por protozoários oportunistas do gênero *Cryptosporidium*. Trata-se de um patógeno de veiculação hídrica estando disponível para infecção oral-fecal a partir de diferentes formas ambientais, incluindo a ingestão de alimentos contaminados e água não tratada. É transmitida entre indivíduos por meio de oocistos que já são eliminados na forma infectante, sendo as principais vias de transmissão o contato direto (pessoa-a-pessoa), oral/fecal apresentando repercussão mundial a partir do surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida a qual desencadeou surtos diarreicos com óbitos em pacientes soropositivos. Estudos destacam o papel dos animais de estimação, em especial cães e gatos, aportando significantes benefícios para as pessoas e para a sociedade, contribuindo para o desenvolvimento físico, social e emocional das crianças e com o bem-estar de seus proprietários, em particular de idosos. No entanto, animais de companhia podem constituir importante fonte de infecção para o homem, determinando doenças genericamente denominadas zoonoses, como a criptosporidiose. Caso agravante quanto a essa infecção dá-se pelo fato que grande parte dos animais infectados serem portadores assintomáticos. Das pesquisas que tomam o idoso como objeto de interesse, há ainda, temáticas voltadas para a identificação dos fatores de risco dessa população a fim de contribuir na elaboração de condutas preventivas. A capacidade funcional, por exemplo, tem se mostrado um forte indicador de autonomia e qualidade de vida dos idosos. Todavia, a maioria dessas pesquisas aponta para a baixa capacidade funcional dos idosos no Brasil e a necessidade de se priorizá-la, através do monitoramento das condições de saúde, de ações preventivas e diferenciadas de saúde e de educação, e de cuidados qualificados e atenção multidimensional e integral. Dessa forma objetivou-se determinar a contribuição da zoonose causada pelo *Cryptosporidium* spp. através do estudo dos fatores ambientais associados à presença do protozoário em animais domésticos de companhia pertencentes a uma população de idosos do município de Teresópolis, RJ.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium* sp., meio ambiente, animais de companhia, idoso, diarreia.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is an important zoonosis responsible for clinical signs of diarrhea and gastroenteritis, associated with abdominal pain in humans and domestic animals caused by protozoa of the genus *Cryptosporidium* opportunistic. It is a waterborne pathogen and is available for fecal-oral infection from different environmental forms, including ingestion of contaminated food and untreated water. It is transmitted between individuals through oocysts that are already eliminated in the infectious form, the main transmission routes direct contact (person to person), oral / fecal featuring worldwide repercussions from the emergence of Acquired Immunodeficiency Syndrome which triggered outbreaks of diarrhea with deaths in seropositive patients. Studies highlight the role of pets, especially dogs and cats, bringing significant benefits to individuals and to society, contributing to the physical, social and emotional development of children and the welfare of its owners, particularly elderly. However, pets can be an important source of infection for humans, causing diseases generically known as zoonoses, such as cryptosporidiosis. If aggravating about this infection takes place by the fact that most of the infected animals are asymptomatic carriers. From the research that takes the elderly as an object of interest, there are still issues aimed at identifying risk factors for this population to help in drawing up preventive measures. Functional capacity, for example, has shown a strong indicator of autonomy and quality of life for seniors. However, their research shows the low functional capacity of elderly people in Brazil and the need to prioritize it, through the monitoring of health conditions, preventive measures and different health and education, and skilled care and attention multidimensional and integral. Thus the objective was to determine the contribution of infection caused by *Cryptosporidium* spp. through the study of environmental factors associated with the presence of protozoa in pet animals belonging to an elderly population in the Teresópolis City, RJ.

KEYWORDS: *Cryptosporidium* sp., environment, pets, elderly, diarrhea.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	11
2.1.1 História.....	11
2.1.2 Classificação.....	12
2.1.3 Ciclo de Vida.....	14
2.1.4 Aspectos Ambientais.....	14
2.2 CRYPTOSPORIDIOSE COMO ZOOSE.....	17
2.3 MORBIDADE NA POPULAÇÃO HUMANA.....	18
2.3.1 Em crianças e adultos.....	18
2.3.2 Em idosos - população susceptível de estudo.....	20
2.4 RELAÇÃO ENTRE O HOMEM E OS ANIMAIS DE COMPANHIA.....	21
3 JUSTIFICATIVA.....	24
4 OBJETIVOS.....	25
4.1 OBJETIVO GERAL.....	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5 METODOLOGIA.....	26
5.1 TIPO DE ESTUDO.....	26
5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	26
5.3 ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	27
5.4 FONTE DE INFORMAÇÃO.....	27
5.4.1 Instrumentos de Coleta de Dados.....	27
5.5 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	28
5.6 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	28
5.6.1 Amostras Fecais de Animais e Idosos.....	28
5.6.1.1. Diagnóstico por microscopia óptica.....	28

	2
5.6.1.2. Diagnóstico por ensaio imunoenzimático.....	29
5.6.1.3. Diagnóstico por extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR).....	30
5.7 TRABALHO DE CAMPO.....	31
5.8 ANÁLISE DOS DADOS.....	32
5.9 CARACTERIZAÇÃO DO SÍTIO DE ESTUDO.....	32
5.9.1 Localização.....	32
5.9.2 Dados Populacionais.....	32
5.9.3 Perfil sócio-econômico.....	32
5.9.4 Nível de escolaridade dos chefes de família com mais de 15 anos de idade.....	33
5.10 ASPECTOS ÉTICOS.....	34
6 RESULTADOS.....	35
6.1 Resultados que contemplam o objetivo 1.....	35
6.1.1 Artigo 1.....	35
6.1.2 Artigo 2.....	35
6.2 Resultados que contemplam os objetivos 2, 3, 4 e 5.....	36
6.2.1 Artigo 3.....	36
6.2.1 Artigo 4.....	36
7 DISCUSSÃO.....	38
8 CONCLUSÕES.....	44
9 RECOMENDAÇÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS.....	61
Anexo I.....	61
Anexo II.....	63
Anexo III.....	66
Artigo 1.....	69
Artigo 2.....	76

	3
Artigo 3.....	98
Artigo 4.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonômica da Família Cryptosporiidae.....	12
Tabela 2: Espécies de <i>Cryptosporidium</i>	13

LISTA DE SIGLAS

CDC	-	Centers for Disease Control and Prevention
CT	-	Coliformes totais
CTT	-	Coliformes termotolerantes
FDA	-	Food and Drug Administration
IFD	-	Imunofluorescência Direta
PCR	-	Reação em Cadeia de Polimerase
RAIS	-	Relação Anual de Informações Sociais
RR	-	Risco Relativo
RP	-	Razão de Prevalência
TAA	-	Terapia Animal Assistida
ZNM	-	Ziehl-Neelsen Modificada

1. INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma importante zoonose responsável por manifestações clínicas de diarreias e gastroenterites, associado à dor abdominal, em seres humanos e animais domésticos causada por protozoários oportunistas do gênero *Cryptosporidium* (CURRENT, 1983).

É transmitida entre indivíduos por meio de oocistos que são eliminados na forma infectante, sendo as principais vias de transmissão o contato direto (pessoa-a-pessoa), oral/fecal ou indiretamente pela ingestão de alimentos ou água contaminados (cistos e oocistos) (O'Donoghue, 1995).

Sua distribuição é cosmopolita apresentando vários hospedeiros onde o *C. muris* foi a primeira espécie descrita, em 1907 por Tyzzer, sendo seu desenvolvimento endógeno restrito às glândulas estomacais de roedores. O *C. parvum*, também descrito por Tyzzer (1912) ocorre principalmente no intestino delgado de vários mamíferos, incluindo o homem (Arrowood, 2002).

O protozoário parasita *Cryptosporidium* emergiu como um importante contaminante da água, responsável por vários surtos de criptosporidiose, afetando até meados de 2001, aproximadamente, 427.000 pessoas em todo mundo (Teunis & Havelaar, 2002). Em recente levantamento mundial dos surtos de doenças hídricas por protozoários, o *Cryptosporidium* esteve relacionado com 50,6% dos 325 eventos reportados entre os anos de 1954 e 2002 (Karanis et al., 2007).

Várias espécies do gênero *Cryptosporidium* foram descritas, mas somente o *C. parvum* tem sido associado às doenças gastrintestinais (Teunis & Havelaar, 2002). A criptosporidiose pode ser fatal em imunocomprometidos e que pode debilitar severamente indivíduos imunocompetentes. Outro agravante dá-se pelo fato de oocistos de que o *Cryptosporidium* podem sobreviver por vários meses no ambiente aquático e são também resistentes à desinfecção por cloro utilizada no tratamento convencional de água (Muller, 2000).

A importância do estudo sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático é reforçada pelas citações da Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (Brasil, 2004), que recomenda a inclusão da pesquisa de *Cryptosporidium* spp. para se atingir o padrão de potabilidade da água. Atualmente, recomenda-se, mundialmente, o monitoramento de *Cryptosporidium* em sistema de água potável que abastecem cidades entre 10.000 e 100.000 habitantes (Franco et al., 2001). Entretanto, os métodos normalmente usados na determinação de oocistos na água

são ineficientes e extremamente variáveis, citando como exemplo a identificação de falso-positivos por interferências com algas e outras espécies de protozoários (Jakubowski et al., 1996).

A quantidade e a qualidade da água são fatores importantes para o estabelecimento dos benefícios à saúde relacionados à redução da incidência e prevalência de diversas doenças, entre elas a doença diarréica (Mota, 2003). O Brasil é um dos países que apresenta alta incidência de diarréia, o que repercute diretamente sobre as taxas de mortalidade infantil (Mascarini & Donalísio, 2006) e entre os idosos reflete-se numa mortalidade específica tendo a diarréia causa básica relacionada às outras desordens comuns à terceira idade (Trinh & Prabhakar, 2007).

O *C. parvum* tem sido reconhecido mundialmente como um dos maiores contaminantes das águas de consumo (Ferreira, 2003). A descrição da contaminação dos recursos hídricos pela presença de oocistos, provavelmente de origem humana e animal, estão freqüentemente associadas a surtos diarréicos e conseqüentemente a altos índices de morbidade e mortalidade, atingindo preferencialmente imunocomprometidos e crianças, mas também imunocompetentes e animais (Heller et al., 2004). Embora de características endêmicas, a diarréia pode apresentar casos relacionados entre si (clínica, distribuição espaço-temporal, fonte de infecção) que são capazes de caracterizar um surto.

Segundo Fayer (1997), a transmissão de *Cryptosporidium* através do meio ambiente vem ganhando reconhecimento, especialmente, após a ocorrência de numerosos surtos associados ao consumo ou contato com águas contaminadas. Alguns fatores biológicos e características próprias do *Cryptosporidium* facilitam a transmissão da doença através da água. A ausência de uma terapia específica para o seu tratamento e o alto número de oocistos excretados por indivíduos infectados, em torno de 10^9 a 10^{10} oocistos, assim como a ampla variedade de hospedeiros que atuam como reservatório da infecção ou favorecem a transmissão cruzada, aumentam o potencial de disseminação da criptosporidiose (Muller, 1999).

Os animais de estimação, em especial cães e gatos, representam significantes benefícios para as pessoas e para a sociedade. Eles contribuem com o desenvolvimento físico, social e emocional das crianças e com o bem-estar de seus proprietários, em particular de idosos. No entanto, animais de companhia podem constituir importante fonte de infecção para o homem, determinando doenças genericamente denominadas zoonoses, como a criptosporidiose, associada ao fato de que cães infectados podem ser portadores assintomáticos. Os quadros clínicos de gastroenterite em cães, apesar de

pouco frequentes, geralmente estão associados a condições de *stress* e imunossupressão (Robertson et al., 2000).

Estudo realizado por Lallo & Bondan (2006) no município de São Paulo, entre 2003 e 2004, analisou 450 amostras de fezes de cães assintomáticos provenientes de um hospital veterinário universitário público e de canis particulares da cidade e encontrou uma prevalência de 9,5% através da técnica de Reação em cadeia de polimerase (PCR). Observou-se uma proporção de 5,5% em animais jovens e 10,1% nos adultos, e não revelando diferença com significância estatística entre machos e fêmeas.

No Estado de Minas Gerais estudo realizado por Figueiredo e colaboradores (2004) mostrou baixa excreção (1, 85%) de oocistos de *C. parvum* em 269 amostras fecais de cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, enquanto que Lallo & Bondan (2006) demonstrou a potencial transmissão aos seres humanos e ao ambiente ao analisar 450 amostras fecais de cães na cidade de São Paulo entre 2003 e 2004 das quais 43 (9,5%) apresentaram-se positivas pela técnica de PCR.

Uma vez que a excreção dos oocistos pode ou não coincidir com o período sintomático da doença, pode haver imprecisões quanto a sua real ocorrência, pela carência de maiores informações da incidência em indivíduos assintomáticos. Heller e colaboradores (2004) verificaram uma média de 19 dias para adulto e 17 para crianças, transcorridos do início dos sintomas ao término da excreção de oocistos. Tzipori e colaboradores (1983), estudando amostras de bile em endoscopias de rotina de 169 pacientes assintomáticos, detectaram 12,7% de positividade para os oocistos de *Cryptosporidium*. Outros estudos realizados com crianças de creches afirmaram que a excreção dos oocistos não é incomum, sugerindo ser subestimado o número de portadores (Crawford et al., 1988; Tangermann et al., 1991).

Vários estudos generalizados têm identificado surtos de criptosporidiose em crianças e adultos (Tzipori et al., 1983; Blagburn & Current, 1983; Janoff et al., 1990; Tangermann et al., 1991; Mangini et al., 1992; Moore et al., 1993; Mackenzie et al., 1995; Katsumata et al., 2000; Gambhir et al., 2003; ribeiro et al., 2004; Carreño et al., 2005; Mascarini & Donalísio, 2006). Entre eles destaca-se o estudo realizado na Colômbia, de um grupo de 121 crianças com afecção oncológica, 51 (42%) apresentaram em suas fezes mais que 5 oocistos de *Cryptosporidium* spp. Os oocistos também se encontraram em 47 (40%) do grupo controle de 116 crianças sem câncer. A razão de prevalência foi de 1.05 (0.76-1.34) com um intervalo de confiança de 95% (Carreño et al., 2005) demonstrando mesma frequência independente da imunossupressão. Outro importante estudo avalia a criptosporidiose esporádica em

estudo caso-controle nos Estados Unidos, com 282 pessoas com criptosporidiose identificados em laboratório e 490 pareados geograficamente e por idade, demonstrando como fatores de risco: viagens internacionais (OR = 7,7, IC 95% = 2,7-22,0), contato com bovinos (OR = 3,5; IC 95% = 1,8-6,8), contato com pessoas de 2 a 11 anos de idade com diarreia (OR 3,0; CI 95% = 1,5-6,2), natação e de água doce (OR = 1,9; IC 95% = 1,049-3,5), ao passo que a ingestão de vegetais crus demonstrou fator de proteção (OR = 0,5; IC = 95% 0,3-,7) (ROY et al., 2004).

No Estado de São Paulo estudos relatam a ocorrência em crianças, como o descrito por Mangini e colaboradores (1992) em que 241 amostras de fezes de crianças de 1-48 meses de idade que apresentavam quadro de diarreia aguda sendo cerca de 20% destas com presença de *Cryptosporidium* spp. Em 2002 e 2003 estimou-se a prevalência de enteroparasitas em crianças de cinco creches municipais de Botucatu, SP obtendo 15,5% (2002) e 3,7% (2003) de resultados positivos para *Cryptosporidium* através de exames coproparasitológicos (Mascarini & Donalísio, 2006).

Assim como a população infantil, os idosos também apresentam alta susceptibilidade à criptosporidiose como descrito por Werner & Kuntche (2000) em estudo sobre a fragilidade da saúde do idoso na Alemanha, fato demonstrado por Meyers (1989) onde o número de casos fatais por patógenos entéricos específicos apresentam-se de 10 a 100 vezes maior em idosos que na população em geral, e por Gambhir et al. (2003) sobre a diarreia da terceira idade na Índia. Posteriormente, Mirzaei (2007) em diferentes grupos etários da população do Irã evidenciou uma prevalência do *C. parvum* em indivíduos acima de 51 anos dos quais 25% apresentavam diarreia enquanto que 3,5% dos positivos não apresentaram quadro diarreico.

Os idosos constituem o segmento que mais cresce da população brasileira. Entre 1991 e 2000 o número de habitantes com sessenta ou mais anos de idade aumentou duas e meia vezes mais (35%) do que o resto da população do País (14%). Constatou uma tendência de crescimento da população geriátrica de 7,9% para 9,1% da população total. Neste mesmo estudo, ficou comprovado que os idosos representam cerca 5,85% da população do Brasil (IBGE, 2002). Este crescimento não tem sido acompanhado na mesma proporção por estudos epidemiológicos sobre a população idosa. Até muito recentemente, os bons inquéritos de saúde brasileiros excluíaam esta população ou tratavam todos aqueles com ≥ 60 ou ≥ 65 anos de idade como se fosse um grupo homogêneo (Albrecht et al., 2003).

A partir da percepção do rápido crescimento da proporção de idosos no Brasil, que se tornaram mais comuns as pesquisas sobre o processo de envelhecimento no

nosso país. E, diante deste quadro ainda pouco explorado se insere esta tese que objetiva evidenciar o *Cryptosporidium* spp. como uma importante zoonose nos animais domésticos de companhia, expondo um grupo susceptível constituído pela população idosa.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Cryptosporidium* spp.

2.1.1 História

De acordo com o parasitologista americano E. E. Tizzer, a primeira descrição publicada de um parasita semelhante os *Cryptosporidium* em epitélio gástrico de ratos foi por Clark em 1895. Em 1907 o próprio Tizzer descreveu claramente um protozoário que freqüentemente era achado em glândulas gástricas de ratos de laboratório e não apenas nos selvagens. Foi nomeado por Tizzer como *Cryptosporidium muris*, porém as informações disponíveis naquele momento não foram suficientes para se estabelecer um novo gênero. Em 1910, com microscópio de resolução limitada Tizzer observou estágios de desenvolvimento assexuado e sexuado, além de esporogônias, todos por ele interpretados como sendo estágios extracelulares; e revelou que os oocistos eram excretados dos hospedeiros pelas fezes. Neste mesmo ano descreveu o *C. muris* em grande detalhe, em escala de hospedeiros, sugerindo que os esporozoítas eram liberados dos oocistos os quais haviam amadurecido nas glândulas gástricas, sugerindo um tipo de autoinfecção (Fayer & Ungar, 1986).

Uma segunda espécie denominada como *C. parvum* foi identificado e descrito por Tizzer em 1912. Era encontrada no intestino delgado (não no estômago) de ratos de laboratório e podia ser transmitido a outros ratos os quais também o albergavam no intestino delgado. Nesta ocasião Tizzer encontrou organismos similares em intestino delgado de coelhos, entretanto não o omitiu como um hospedeiro das espécies descritas (*Ibidem*).

Entre os anos de 1968 e 1981, outras espécies de *Cryptosporidium* em peixes, répteis, aves e mamíferos foram nomeados na suposição de que cada espécie de hospedeiro abrigava distintas espécies de *Cryptosporidium* (*Ibidem*).

O reconhecimento do *Cryptosporidium* associado à diarréia em bovinos por Panciera e colaboradores em 1971 desencadeou um interesse veterinário que resultou em numerosos casos reportados e investigados em uma variedade de animais domésticos (*Ibidem*).

Os primeiros casos de criptosporidiose em humanos foram descritos em 1976, mas relativamente poucos foram diagnosticados subsequente até que a criptosporidiose fosse relatada como sendo uma infecção com risco de vida em

pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e, desde então, o interesse clínico-epidemiológico sobre a criptosporidiose aumentou consideravelmente estimulando estudos experimentais que procurassem desenvolver um modelo animal da doença, buscando desenvolver sistemas do crescimento do protozoário *in vitro* assim como testar potenciais formas desinfetantes ambientais e terapêuticas (Fayer & Ungar, 1986).

2.1.2 Classificação

Todas as espécies de *Cryptosporidium* taxonomicamente classificadas atualmente estão descritos na **Tabela 1**, explicitada a seguir.

Tabela 1: Classificação taxonômica da Família Cryptosporiidae

Classificação	Nome	Características Biológicas
Filo	Apicomplexa	Complexo apical com anéis polares, micronemas, conóides e micro túbulos subpeliculares.
Classe	<i>Sporozoasida</i>	Locomoção de organismos maduros por flexão do corpo, deslizamento ou ondulação.
Subclasse	<i>Coccidiasina</i>	Ciclo de vida com merogônias, gametogônias e esporogônias.
Ordem	<i>Eucoccidiorida</i>	Merogônia presente; em invertebrados.
Subordem	<i>Eimeriorina</i>	Gametas masculinos e femininos desenvolvem-se independentemente.
Família	<i>Cryptosporiidae</i>	Homoxenos com desenvolvimento apenas sob a superfície da membrana da célula do hospedeiro; oocistos sem esporocistos e com esporozoítas; microgametas sem flagelos.

Fonte: Levine et al., 1985

O Filo *Apicomplexa* reúne organismos exclusivamente parasitas intracelulares obrigatórios que incluem muitos patógenos importantes de animais e humanos. O termo *Apicomplexa* deriva de uma estrutura especializada, o complexo apical – visualizada somente ao microscópio eletrônico – que esses protozoários utilizam para se aderirem ou penetrarem nas células do hospedeiro. Os membros deste grupo não apresentam sistemas de locomoção aparentes, são numerosos e de distribuição mundial (Levine et al., 1985).

Os protozoários exclusivamente parasitas tendem a ser estruturalmente menos complexos que os de vida livre, mas os apicomplexos apresentam ciclo de vida complexo com fases reprodutivas sexuadas e assexuadas alternadas, envolvendo dois

hospedeiros diferentes como artrópodes (mosquitos ou carrapatos) e vertebrados (animais ou humanos) (*Ibidem*).

O Filo *Apicomplexa* inclui importantes patógenos humanos, tais como as espécies de *Plasmodium*, causadores da malária, *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose e o *Cryptosporidium parvum*, importante causador de diarreia, patógenos oportunistas associados à AIDS e patógenos de animais silvestres e de importância econômica, tais como *Theileria*, *Eimeria* e *Babesia* (*Ibidem*).

Vinte espécies de *Cryptosporidium* foram nomeadas de acordo com o hospedeiro no qual o parasita fora encontrado como na **Tabela 2** a seguir.

Tabela 2: Espécies de *Cryptosporidium*

Espécies	Autor	Hospedeiro
<i>C. agni</i>	Barker e Carbonell, 1974	<i>Ovis áries</i> (ovelha doméstica)
<i>C. ameivae</i>	Arcay de Peraza e Bastardo de San Jose, 1969	<i>Ameiva ameiva</i> (lagarto)
<i>C. anserinum</i>	Proctor e Kemp, 1974	<i>Anser anser</i> (ganso doméstico)
<i>C. baileyi</i>	Current Upton e Haynes, 1986	<i>Gallus gallus</i> (galinha doméstica)
<i>C. crotali</i>	Triffit, 1925	<i>Crotalus confluentis</i> (cobra)
<i>C. ctenosauris</i>	Duszynski, 1969	Lagarto da Costa Rica
<i>C. cuniculus</i>	Inman e Takeuchi, 1979	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (coelho doméstico)
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979	<i>Felis catus</i> (gato doméstico)
<i>C. garnhami</i>	Bird, 1981	<i>Homo sapiens</i> (homem)
<i>C. lampropeltis</i>	Anderson, Dusynski e Marquardt, 1968	<i>Lampropeltis calligaster</i> (lagarto)
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	<i>Meleagris gallopavo</i> (peru)
<i>C. muris</i>	Tyzzler, 1907	<i>Mus musculus</i> (rato doméstico)
<i>C. nasorum</i>	Hoover, Hoerr, Carlton, Hinsman e Ferguson, 1981	<i>Naso literatus</i> (peixe)
<i>C. parvum</i>	Tyzzler, 1912	<i>Mus musculus</i> (rato doméstico)
<i>C. rhesi</i>	Levine, 1981	<i>Macaca mulatta</i> (macaco rhesus)
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1981	Colubrídeos, crotálicos e gibóias
<i>C. tyzzeri</i>	Levine, 1961	<i>Gallus gallus</i> (galinha doméstica)
<i>C. vulpis</i>	Wetzel, 1938	<i>Vulpes vulpes</i> (raposa européia comum)
<i>C. wrairi</i>	Vetterling, Jervis, Merril, Sprinz, 1971	<i>Cavi porcellus</i> (porco da índia)

Fonte: Fayer & Ungar, 1986

2.1.3 Ciclo de Vida

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* assemelha-se aos demais coccídeos. Os oocistos esporulados encontram-se nas fezes de um hospedeiro infectado. Através da contaminação do ambiente, alimento ou água, os oocistos são ingeridos por outros hospedeiros susceptíveis. Nos tratos gastrointestinais ou respiratórios desses hospedeiros, ocorre a liberação dos esporozoítas pelos oocistos e dessa forma o parasitismo das células epiteliais. Os esporozoítas e subseqüentes estágios de desenvolvimento são encontrados superfície do epitélio. Apesar dos organismos geralmente parecerem estar aclopados à superfície da célula, todos os estágios são intracelulares, estando envolvidos pela membrana da célula porém extracitoplasmaticamente (Current, 1985).

Segundo Fayer & Ungar (1986) os esporozoítas se diferem de um trofozoíta pelo núcleo único proeminente. A multiplicação assexuada (merogônias e esquizogônias) resulta a partir de uma divisão nuclear. Dois tipos de merontes (esquizontes) se desenvolvem assexuadamente. O meronte tipo I contém de seis a oito núcleos, os quais se tornarão seis a oito merozoítas (quando o meronte estiver adulto). Cada merozoítas pode invadir uma nova célula hospedeira na qual na qual se desenvolve em outro meronte tipo I ou em um meronte tipo II, no qual apresenta merozoítas (quando está maduro). Os merozoítas dos merontes tipo II invadem as células do hospedeiro na qual iniciam uma multiplicação sexuada (gametogônia) e podem se diferenciar em estágios masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogamontes). Na maturação, os mirogametócitos contêm microgametas semelhantes a espermatozóides os quais irão fertilizar os macrogamontes. O macrogamonte fertilizado irá desenvolver-se num oócito o qual sofrerá esporulação (esporogônia). Quando a esporogônia está completa, em seu interior haverá 4 esporozoítas potencialmente infectantes. Alguns oocistos serão expelidos do organismo através da matéria fecal ou, talvez, pelas secreções respiratórias, ou ainda, visto que outros liberam esporozoites dentro do corpo, podem repetir o ciclo da merogônia, da gamogônia, e da esporogônia.

2.1.4 Aspectos ambientais

Inúmeras são as fontes que levam ao meio ambiente formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. como descrito em estudo clássico por Fayer & Ungar (1986), inclusive pela ausência do critério de espécie específico apresentado pelos estudos de

Upton & Current (1985) em diversas espécies animais: domésticos ou não, mamíferos, roedores, répteis e aves.

Embora alguns autores considerem existir um número limitado de informações publicadas sobre a concentração e a entrada de carga parasitária patogênica em animais domésticos, estudos indicadores de contaminação fecal por populações animais selvagens (animais nativos e selvagens) demonstraram presença de uma distribuição mais ampla em roedores selvagens do que tem sido relatado previamente (Atwill et al., 2001). Como exemplo a prevalência de 22%, 21% e 13% para *C. parvum* em amostras fecais não diarréicas de *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* e *Clethrionomys glareolus*, respectivamente, obtidas em estudo de dois anos em um sítio agrícola de Warwickshire no Reino Unido. Nesse caso os roedores podem representar um importante reservatório de *Cryptosporidium* com elevado potencial para a infecção no homem e em animais devido à coabitação (Chalmers et al., 1997). Semelhante estudo demonstrou a ocorrência de espécies de *Cryptosporidium* na fauna natural de pequenos mamíferos silvestres da Mata Atlântica de três áreas serranas do Sudeste brasileiro onde de 240 animais capturados, 39 (16,25%) apresentaram fezes álcool-ácido resistentes pela coloração de Ziehl-Neelsen Modificada e confirmados com Imunofluorescência Direta. Embora tenha sido considerada subestimada, a presença dos oocistos de *C. muris* e *C. parvum* nas fezes dos pequenos mamíferos silvestres, sugeriu que estes pudessem atuar como reservatórios da criptosporidiose e concorrer para a contaminação dos cursos d'água e a infecção de outros animais, entre eles mamíferos invasores como *Mus musculus*; *Rattus rattus*, *R. norvegicus*, *Myocastor* sp. e destes, a transmissão para o homem (Dall'Olio & Franco 2004). No entanto, são estes animais que tem, frequentemente, maiores acessos às zonas ribeirinhas e arredores de reservatórios em bacias hidrográficas, uma vez que, por definição, seus movimentos são de difícil controle, tornando complicada a proteção das águas superficiais de contaminações fecais (Atwill et al., 2003).

Em comparação, dados sobre as concentrações potencialmente patogênica nas fezes de animais domésticos são mais abundantes, especialmente para a enumeração e prevalência de *Cryptosporidium* e *Giardia* (Graczyk et al., 2000).

Estudo sobre fatores geográficos e ambientais que contribuíram para a contaminação com oocistos de *Cryptosporidium parvum* de bacias hidrográficas passíveis de inundação sazonal na área de várzea no condado de Lancaster, Pensilvânia, EUA (Graczyk et al., 2000), a partir de fazendas selecionadas e caracterizadas de criação de gado, demonstrou contaminação naquelas em que os animais tiveram acesso

ilimitado ao riacho. Amostras de esterco, coletadas em baias de bezerro e vaca fechados para escoamento ao quintal além de caminhos de trânsito de gado através do riacho, foram testados para *C. parvum* e demonstraram que em 64% das análises (n = 50) pelo menos uma amostra foi positiva para *C. parvum* e 44% das propriedades tinham oocistos em todas as amostras de esterco. Concentrações variaram de 90-371 oocistos/g, sendo significativamente maior ($P < 0,02$) em amostras de bezerros que em estrume de vacas e novilhas em confinamento.

Importante verificação da distribuição de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. no ambiente foi realizada em estudo de 2 anos pela prevalência do parasita em afluente de esgoto humano, vida selvagem e fontes agrícolas associadas à Bacia do Rio de Saskatchewan do Norte, em Alberta, no Canadá (Heitman et al., 2007). Amostras de fezes foram coletadas de bezerros, de vacas leiteiras e de suínos manejados na área da bacia. Instalações de tratamento de esgoto foram amostradas bimestralmente durante o estudo, assim como dejetos de animais de vida selvagem encontrados em locais ao longo dos afluentes do rio Saskatchewan do Norte. Todas as amostras foram analisadas para a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium*, usando a separação de gradiente de sacarose seguida por microscopia de imunofluorescência. *Cryptosporidium* e *Giardia* foram detectados em todas as três fontes sendo a menor prevalência de *Giardia* (3,28%) e *Cryptosporidium* (0,94%) encontrada em animais selvagens, com 6 de 19 espécies com teste positivo. O afluente de esgoto apresentou a maior prevalência de *Giardia* (48,80%) e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (5,42%), porém, a concentração de ambos os parasitas era mínima comparada com a concentração detectada em fezes de bovinos onde amostras de fêmeas e bezerros continham a maior concentração de *Giardia* (média de 5,800/g de fezes, $P < 0,01$), e fontes de produtos lácteos continham a maior concentração de oocistos de *C. parvum* (média de 295/g de fezes, $P < 0,01$).

Estudo brasileiro (Heller et al., 2004) incluiu uma varredura da presença dos oocistos em diferentes mananciais de abastecimento, em amostras de esgotos sanitários, em fezes de animais e humanas, revelou elevadas concentrações de protozoários e, assim, expressivo risco à saúde humana sobretudo na perspectiva de validação das premissas adotadas pela Portaria No 518/2004 (Brasil, 2004).

As águas destinadas à irrigação são fontes originais de contaminação quando comportam grande quantidade de microrganismos, entretanto, alimentos que estão em contato direto com águas contaminadas e são consumidos crus constituem fontes factíveis de infecção em todas as faixas etárias e, especialmente nos mais debilitados e potencialmente sujeitos a enfermidades diarréicas (Pacheco et al., 2002).

Dessa forma ao avaliar variedades de hortaliças, importante alimento da culinária brasileira, observou-se elevados percentuais de contaminação bem como o risco à saúde que as hortaliças podem apresentar, quando contaminadas por protozoários intestinais (Oliveira & Germano, 1992; Mesquita et al., 1999; Pacheco et al., 2002; Falavigna et al., 2005).

2.2 Criptosporidiose como zoonose

Com base nos estudos desenvolvidos nos anos 90 ficou estabelecido que o *Cryptosporidium* não é espécie-específica e que linhagens de uma espécie animal podem infectar um amplo espectro de outras espécies. Linhagens isoladas do homem, de bezerros, cordeiros, cabritos e cervos foram transmitidas por via oral à cordeiros, bezerros e leitões, nos quais causou diarreia. No caso de potros, frangos e animais de laboratório contaminados produziram infecção assintomática (Tzipori, 1983). Esse resultado indica que os hospedeiros e reservatórios são múltiplos na natureza e que uma espécie animal pode contrair a infecção de outra (Acha & Szyfres, 1997).

Demonstrando a transmissão de animais à seres humanos, Anderson e colaboradores (1982) relatam um estudante de Veterinária que tratou de bezerros infectados e contraiu a criptosporidiose apresentando sintomatologia após 5 dias de contato. Em outro episódio, 12 de 18 pessoas que haviam tido contato direto com fezes de bezerros enfermos de *Cryptosporidium* durante espaço de 10 minutos a 6 dias, contraíram a infecção e 9 delas tiveram diarreia e dores abdominais num intervalo de 1-10 dias após o contato. Os protozoários isolados das pessoas e bezerros foram transmitidos em forma experimental à bezerros, ratos, gatos, cães e cabritos, com o que se demonstrou a possibilidade de proximidade do agente entre diferentes espécies, incluindo o homem (Current et al., 1983).

A enfermidade humana também ocorre sem contato direto com animais e existindo evidências de transmissão da enfermidade inter-humana. Na Austrália, se descreveu um caso de um pai que contraiu a infecção de sua filha enferma. Uma transmissão direta por contato anal se comprovou em um homossexual. A transmissão indireta pode ocorrer por ingestão de alimentos e águas contaminados com fezes de homens ou animais (Current et al., 1983). Através de acidente de laboratório ocorrido com um pesquisador demonstrou que um pequeno número de oocistos seria suficientes para contaminar um homem (Blagburn & Current, 1983).

Um estudo realizado na Costa Rica comprovou que a infecção é mais freqüente em crianças alimentadas com mamadeiras que entre os alimentados com leite materno (Mata et al., 1984).

Como em outras infecções intestinais, a via principal de infecção é a oro - fecal nos animais e no homem (Acha & Szyfres, 1997).

2.3 Morbidade na população humana

2.3.1 Em crianças e adultos

A infecção por *Cryptosporidium* foi descrita em humanos a partir de dois casos relatados 1979 e de uma série de casos (11) em 1980 (Ungar, 1990). A maioria desses pacientes eram imunocomprometidos e o parasita foi considerado oportunista. Em 1982, quando a criptosporidiose foi associada à mortalidade de pacientes de AIDS, um primeiro surto foi reportado em indivíduos imunocompetentes (O'Donoghue, 1995; MMWR, 1982). Desde então têm sido detectada em diferentes grupos populacionais em mais de 50 países em todos os continentes (O'Donoghue, 1995).

De 58 casos de criptosporidiose notificados ao CDC (Centers for Disease Control and Prevention), nos Estados Unidos, até 1983, 33 eram portadores da AIDS e sofriam de diarreia que era, geralmente, intensa e irreversível (Fayer & Ungar, 1986).

Estudos de Fayer & Ungar (1986) e Garcia & Current (1989) analisando amostras de fezes oriundas de exames coprológicos enviados ao diagnóstico laboratorial de pacientes com diarreia, excluindo aqueles de pacientes com AIDS ou de situações específicas de surto, observaram variações na prevalência de 0,1 a 27,1% em países industrializados, (Espanha, França, Finlândia, Dinamarca, Nova Zelândia e Austrália, com média de 56 exames = 4,9%) comparado com de 0,1 a 31,5% em países menos desenvolvidos (Libéria, Ruanda, Bangladesh, Índia e Tailândia, com média de 48 exames = 7,9).

Em estudo realizado por Miller e colaboradores (1986) a dose infectante requerida para produzir a infecção nos seres humanos não é presumida.

Ainda na década de 80, diversos estudos com base em exames imunossorológicos foram conduzidos em pequenos grupos de diferentes populações e os resultados da soroprevalência variaram de 8 a 91% (média de 7 exames = 54%) sendo 8% na Tailândia (JANOFF et al., 1990), 15,5% na Venezuela e 19,8% no Peru (Ungar et al., 1988), 17 a 31% nos Estados Unidos (Koch et al., 1985), 32% após exposição

voluntariada na África (Ungar, Mulligan & Nutman, 1989), acima de 80% na Escócia (Tzipori & Campbell, 1981) e 91% nas Filipinas (Laxer et al., 1990).

Ungar (1990) estudando amostras de indivíduos assintomáticos demonstrou a prevalência que variara de 0 a 2% em países desenvolvidos comparado com 0 a 9,8% em países subdesenvolvidos. Sugeriu-se que a prevalência mais elevada da infecção em países menos desenvolvidos poderia estar relacionada a questões relativas ao saneamento, às fontes de água contaminadas, a superpopulação ou a um contato maior com animais domésticos.

Em 1993, este protozoário foi responsável pelo maior surto de distúrbios gastrointestinais registrado num país desenvolvido. Cerca de 403.000 casos associados à ingestão de água contaminada foram registrados em Milwaukee, nos EUA, com os principais sintomas: diarreia aquosa (em 93% dos casos), cólicas abdominais (em 84%), febre entre 37,2 e 40°C (em 57%) e vômitos (em 48%) (Mackenzie et al., 1995).

De 1990 a 2000, ao menos 10 surtos do criptosporidiose associados com água potável contaminada foram relatados nos Estados Unidos (Moore et al., 1993; Barwick et al., 2000).

Em 1995 Khel e colaboradores e Alles e colaboradores demonstraram avanços no isolamento e identificação do *Cryptosporidium* através da comparação dos métodos imunoenzimático e imunofluorescência direta, além do tradicional método de identificação por coloração Ziehl-Neelsen modificada (ZNM), proporcionando, assim rapidez e exatidão no diagnóstico.

Tzypori e colaboradores (1995) sugeriram uso corrente de nitazoxanida em seres humanos após estudos pré-clínicos extensivos para determinar *in vitro* e *in vivo* a eficácia da nitazoxanida contra *C. parvum* em sistemas de culturas celulares e em infecções induzidas em animais. Em 1996, a nitazoxanida foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA para uso compassivo limitada à doentes. Ensaio clínicos adicionais controlados foram conduzidos para determinar a real eficácia e benefício do tratamento com nitazoxanida para criptosporidiose crônica.

No final dos anos 90, com a evolução da técnica de identificação molecular através de PCR, detectou-se a diversidade de espécies que acometia humanos (Xiao et al., 1999) através de estudos como o de Katsumata e colaboradores (2000) que descreveu a possível infecção pessoa-a-pessoa do *C. muris* através de fezes humanas, e como Spano e colaboradores (1998), que relatou a distribuição geográfica de diferentes espécies de *Cryptosporidium* em diferentes hospedeiros.

Em crianças, diversos estudos como Carreño e colaboradores (2005) evidenciam a presença do *Cryptosporidium* assintomaticamente levando a infecções oportunistas.

No período de agosto de 1987 a julho de 1990 foram examinadas 241 amostras de fezes de crianças com idade variável entre 1 e 48 meses com episódios agudos de diarreia no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo. Quarenta e duas amostras (17,43%) revelaram a presença do *Cryptosporidium* spp. sugerindo a associação do mesmo com a diarreia (Mangini et al., 1992).

Carvalho-Almeida e colaboradores (2006) descreveram estudo feito a partir do surto de criptosporidiose em uma escola de educação infantil, que atende crianças de classe média alta, de 0 a seis anos de idade. O surto foi detectado a partir de amostras fecais não diarreicas encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz – SP através da rede de saúde pública onde das 64, crianças 13 (20,3%) apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes, sendo 7 crianças com 1 de idade, 3 crianças com 2 anos de idade e 3, com 3 anos de idade.

Ainda em 2006, Mascarini & Donalísio demonstraram dois estudos transversais realizados em 2002 (N=379) e 2003 (N=397) onde estimou a prevalência de *Cryptosporidium* spp. com 15,5% (2002) e 3,7% (2003) através de exames coprológicos em crianças de cinco creches municipais de Botucatu, SP.

Recentemente, estudos conduzidos em pacientes imunocomprometidos demonstraram significativa melhora do quadro clínico diarreico. Sete ensaios clínicos envolvendo 169 participantes por diversas origens de imunossupressão foram incluídos. A nitazoxanida e a paramomicina foram associados com um risco relativo (RR) de redução da duração e frequência da diarreia de 0,83 (IC 95% de 0,36 - 1,94) e 0,74 (IC 95% de 0,42 – 1,31) embora não houvesse efeito significativo em pacientes HIV-soropositivos (Abubakar et al., 2007).

2.3.2 Em idosos - população susceptível de estudo

As doenças infecciosas são causas comuns do aumento de morbidades e mortalidades em pacientes idosos e expõe um problema frequente na prática diária da geriatria. As infecções em idosos são um pouco diferentes do que na população jovem; essas diferenças são atribuídas às alterações imunológicas ou mau funcionamento orgânico (que declinam com a idade) (Werner & Kuntsche, 2000). O número de casos fatais por patógenos entéricos específicos apresentam-se de 10 a 100 vezes maior em idosos que na população em geral (Meyers, 1989).

Em 2003, estudo realizado na Índia (Gambhir et al., 2003) o *Cryptosporidium* foi isolado em 22 (18.3%) pacientes idosos com diarreia apresentando alta significância ($P < 0.01$) comparados com grupos saudáveis de semelhante idade. Desses pacientes 66% mostraram histórico de contato estreito com animais e a maioria (68%) das infecções por *Cryptosporidium* ocorreram durante a estação chuvosa. Entre os idosos, 17% sofreram de dores abdominais e vômitos, 31% se apresentaram febris; porém nenhum desenvolveu desidratação severa. Ainda nesse estudo associou-se o isolamento do *Cryptosporidium* nos idosos com outras enfermidades como a diabetes mellitus (22.7%), a tuberculose (9.0%), câncer (4.5%) e doenças coronarianas (4.5%).

Ainda em 2003 Albrecht e colaboradores reportam que a população norte americana idosa, como maior grupo entre os viajantes, estão mais susceptíveis às diarreias “dos viajantes”, sugerindo que o *Cryptosporidium* seja um dos agentes de tal transtorno.

Através da técnica de modelagem de resposta à exposição temporal para a associação entre gastroenterites, relatados a partir das internações hospitalares no surto de criptosporidiose em Milwaukee (EUA) em 1993, observou-se um aumento significativo de diarreias em idosos ($p < 0.001$), sugerindo que este grupo apresenta maior risco à infecção. Fato se deu em função da interrupção do processo de filtração do tratamento da água na cidade que provavelmente permitiu que o *Cryptosporidium* e outros agentes patogênicos entrassem para o sistema de abastecimento público de água potável (sem que houvesse publicação de provas concretas para outros patógenos). Dessa forma suspeitou-se que a maioria, senão todos os casos relativos ao aumento da gastroenterite detectada nos idosos durante este período foram provavelmente devido a criptosporidiose já que após o evento a estimativa da magnitude do aumento de casos de criptosporidiose graves em idosos que resultaram em hospitalizações ou atendimentos de emergência subiu de 30 para 300 casos (Naumova et al., 2003).

Estudo realizado por Mirzaei (2007) em diferentes grupos etários da população do Irã mostra uma significativa prevalência (5,7%) do *C. parvum* em indivíduos acima de 51 anos. Nesse grupo etário, 25% dos idosos apresentaram diarreia enquanto que 3,5% não apresentaram quadro diarreico independente da infecção.

2.4 Relação entre idosos e animais de companhia

A domesticação de animais foi identificada quando importantes civilizações surgiram entre 4.000 e 3.000 a.C. às margens dos grandes rios como Nilo (Egito), Tigre

e Eufrates (Mesopotâmia), Amarelo (China), Jordão (Palestina), Indo e Ganges (Índia e Paquistão). Tais civilizações dominavam técnicas como a agricultura e a domesticação dos animais; sendo que estes animais representavam a fonte de alimento e a força de trabalho para as comunidades primitivas (Mannion, 1999).

Em Israel, por exemplo, foram encontrados, enterrados ao lado de humanos, esqueletos intactos de cães em sítios arqueológicos de mais de 12.500 anos. A origem e a história da sua domesticação ainda permanecem obscura, mas os pesquisadores são unânimes em afirmar que o cão é o animal melhor selecionado para o convívio com o homem (Pennisi, 2002).

A utilização de animais como terapia – Terapia Animal Assistida (TAA) foi utilizada intuitivamente por William Tuke, em 1792, no tratamento de doentes mentais. Já equoterapia, uma modalidade TAA, teve seus primeiros relatos como tratamento médico no século XVIII, com o objetivo de melhorar o controle postural, a coordenação e o equilíbrio de pacientes com distúrbios articulares (De Pauw, 1984).

Friedman (1990) foi um dos pioneiros no estudo dos efeitos da interação homem-animal sobre parâmetros fisiológicos e saúde cardiovascular humana, sendo que os resultados de diferentes estudos demonstraram que a TAA pode promover a saúde física através de três mecanismos básicos que incluem a diminuição da solidão e da depressão; diminuindo a ansiedade, os efeitos do sistema nervoso simpático e aumentando o estímulo para prática de exercícios. Conseqüentemente há um impacto positivo no controle das irritações diárias provocadas pelo “stress” e uma melhoria na qualidade de vida e saúde física dos indivíduos.

Atualmente espécies animais são adotadas como “pet” estreitando a convivência com seres humanos e modificando seu papel na relação homem-animal (Juliano et al., 2006).

Para Overall (1997) compreender o papel do animal no grupo social humano a que pertence é essencial para alcançar os objetivos desejáveis na prática veterinária. Da mesma forma Faraco & Seminotti (2004) destacam a importância da compreensão e do reconhecimento, por parte dos profissionais, dessa nova realidade nas organizações sociais resultantes de grupos “multiespécies”, onde animais de estimação são considerados como “membros da família”.

Segundo Irwin (2002) ultimamente houve muitas mudanças sobre as maneiras que a ciência clínica veterinária tem sido conduzida. Os veterinários que trabalham com cães e gatos de estimação estão enfrentando os novos desafios associados com as doenças parasitárias emergentes e re-emergentes.

Faraco & Seminotti (2004) conclui que a ação do médico veterinário, orientando e facilitando a comunicação no grupo “multiespécie”, pode contribuir para a construção de um clima estável entre as pessoas e os animais de companhia.

3. JUSTIFICATIVA

A população idosa, na maioria das vezes, depende psicologicamente da companhia de animais, inclusive por indicação médica. A relação afetiva de um idoso com animais de companhia sem o acompanhamento médico veterinário mostra risco potencial zoonótico para várias enfermidades. Além do mais, o idoso apresenta condição fisiológica e imunológica desfavorável a várias enfermidades, inclusive a criptosporidiose.

Das pesquisas que tomam o idoso como objeto de interesse, há ainda, temáticas voltadas para a identificação dos fatores de risco dessa população a fim de contribuir na elaboração de condutas preventivas. A capacidade funcional, por exemplo, tem se mostrado um forte indicador de autonomia e qualidade de vida dos idosos. Todavia, a maioria dessas pesquisas aponta para a baixa capacidade funcional dos idosos no Brasil e a necessidade de se priorizá-la, através do monitoramento das condições de saúde, de ações preventivas e diferenciadas de saúde e de educação, e de cuidados qualificados e atenção multidimensional e integral.

Cães domésticos são citados como fontes de infecção assintomáticos do *Cryptosporidium*, albergando-os em seu trato intestinal e veiculando oocistos viáveis ao ambiente através de suas fezes e estados clínicos manifestam-se com quadro diarréico nos casos de debilidade do animal secundária a outras enfermidades.

Trata-se de um patógeno de veiculação hídrica estando disponível para infecção oral-fecal a partir de difentes formas ambientais, incluindo a ingestão de alimentos contaminados e água não tratada.

Estudos exploram a relação da criptosporidiose na população humana com animais de companhia e, nesse universo busca-se avaliar o nível que tal relação se conforma pelo potencial ciclo de exposição aos idosos, justificando dessa maneira a tentativa de conhecimento do que está ocorrendo neste grupo específico da população.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Determinar a contribuição da zoonose causada pelo *Cryptosporidium* spp. através do estudo dos fatores ambientais associados à presença do protozoário em animais domésticos de companhia pertencentes a uma população de idosos do município de Teresópolis, RJ.

4.2 Objetivos Específicos

1. Analisar os dados de prevalência de *Cryptosporidium* spp. quanto ao aspecto ambiental no Município de Teresópolis;
2. Analisar as características da população do estudo (humana e animal) através de medidas de tendência central e dispersão e por distribuições de frequências e razão de prevalências;
3. Determinar a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em material fecal dos idosos e dos animais de companhia na população em estudo;
4. Determinar a associação entre diarreia em idosos e prevalência de *Cryptosporidium* spp. nos animais domésticos de companhia;
5. Determinar a prevalência por histórico de diarreia entre os idosos e seus animais examinados utilizando técnicas diferentes de detecção de *Cryptosporidium* spp. (Ziehl-Nielsen, Imunofluorescência e PCR).

5. METODOLOGIA

5.1 Tipo de Estudo

Estudo transversal de fatores ambientais, das populações de idosos e animais (cães e/ou gatos) de companhia com análise das razões de prevalência para positividade de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

5.2 População do Estudo

Estudo ambiental foi realizado na região localizada na rodovia estadual RJ-130 que liga os municípios de Teresópolis à Nova Friburgo, a leste sendo denominada Circuito “Terê-Fri” pelo clima favorável à exploração turística dos recursos naturais e pelo pólo agrícola de importante aporte no Estado do Rio de Janeiro. Segundo dados do Tribunal de Contas do Estado do Rio de Janeiro (2004) no setor primário, a horticultura (alface, couve-flor, tomate, repolho, salsa, entre outros) é responsável por 81% da produção agrícola do município, o qual é o principal produtor dessa cultura no Estado.

Para o primeiro estudo, elegeu-se 3 estabelecimentos produtores para coleta de alfaces (*Lactuca sativa*) dos quais se obteve 50 amostras para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (**Artigo 1**). Para o segundo estudo, elegeu-se 10 estabelecimentos agrícolas analisando-se *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. na água de irrigação (**Artigo 2**).

Foram elegíveis para o terceiro estudo os idosos (acima de 60 anos de idade) de ambos os sexos que tinham em domicílio cães e/ou gatos, residentes no Município de Teresópolis-RJ e que compareceram a um posto de vacinação do município no período das Campanhas Nacionais de Vacinação Contra Gripe de 2007 e 2008 (**Artigo 3**) e para o quarto estudo foram elegíveis, no período das Campanhas Nacionais de Vacinação Contra Gripe de 2009 a 2010, os idosos com mesmos critérios de inclusão do terceiro estudo, porém que apenas tivessem gatos como animais de companhia (**Artigo 4**).

A população participante da campanha que preencheu os critérios acima foi abordada no Posto de Vacinação e convidada a participar da pesquisa. Após os esclarecimentos dos objetivos do estudo aquelas que aceitaram participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e responderam a um primeiro questionário

estruturado com informações básicas, desenhado com a finalidade de cadastrar os idosos proprietários de animais.

5.3 Estimativa da população de estudo

Com base na Campanha Nacional de Vacinação Contra Gripe de 2006 quando foram vacinadas 8000 pessoas acima de 60 anos no município de Teresópolis-RJ e adotando uma relação de 1 animal doméstico para cada 10 habitantes baseado em dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1990) e do Instituto Pasteur de São Paulo, Brasil (Reichmann et al., 1999), estimou-se para toda pesquisa o comparecimento de cerca de 800 idosos proprietários de animais, em cada campanha de vacinação.

Considerando uma população estável humana/animal, o acerto da população de estudo se deu subsequentemente nos anos 2007 – 2010, realizando-se todo projeto.

5.4 Fonte de Informação

Cada proprietário foi visitado em seu domicílio, onde foram avaliados, através de instrumento específico, as condições de saúde do(os) animal(ais) e da(s) pessoa(as) idosa(as) informaram dados pessoais.

5.4.1 Instrumentos de Coleta de Dados

O primeiro instrumento foi utilizado durante as Campanhas Nacionais de Vacinação de Idosos de 2007, 2008, 2009 e 2010, para o cadastro e contemplou as variáveis demográficas e tipo de animal doméstico (**ANEXO 1**).

O segundo questionário foi preenchido após as Campanhas Nacionais de Vacinação de Idosos, através de entrevista com o (os) idoso (os) do domicílio no momento do 2º contato contemplando variáveis do idoso e seus animais de companhia, além de instruções para coleta de amostras fecais (**ANEXO 2**).

5.5 Variáveis do Estudo

Através de questionário estruturado, construído com base em instrumentos padronizados e validados já utilizados em outros estudos nacionais, foram obtidos dados para população idosa e de animais de companhia.

As variáveis para os idosos foram: sexo, faixa etária, estado civil, tabagismo e histórico de diarreia nos últimos 12 meses. Já as variáveis para cães e gatos foram: sexo, faixa etária, estimativa de peso, estado geral e histórico de diarreia nos últimos 12 meses. Consideraram-se também variáveis quanto ao ambiente de convívio com os animais de companhia tais como: fonte de água ingerida, habitat interno e/ou externo ao domicílio e acondicionamento e destino das fezes dos mesmos.

5.6 Coleta de Amostras Biológicas

As amostras foram coletadas em função de análises para identificação de oocistos em diferentes substratos. Dessa forma, procedeu-se de acordo com metodologias protocoladas em referências a seguir descritas.

5.6.1 Amostras fecais de animais e idosos

Amostras fecais foram coletadas de cada indivíduo (animal de companhia e idoso) em dois frascos com formalina a 10% e sem conservante. As amostras não formolizadas foram submetidas ao congelamento de -20°C.

5.6.1.1. Diagnóstico por Microscopia Óptica - Ziehl-Neelsen Modificado

As amostras foram acondicionadas em formalina à 10%, diluídas em PBS pH 7.2, filtradas em tamis de plástico e gaze dobrada em quatro. Recolheu-se o filtrado em um tubo de centrífuga, colocando somente até sua metade e completando-se o tubo com solução saturada de açúcar, cobrindo-se em seguida o tubo com parafilme. Homogeneizou-se bem por agitação e centrifugou-se a 400 rpm por 5 minutos de acordo com a técnica de centrifugo flutuação de “Sheather” em solução saturada de açúcar (Anderson, 1981).

Utilizando o concentrado obtido, fizeram-se esfregaços em duplicata delgados e homogêneos em lâminas de microscopia. Após isso, é deixado secar ao ar e

posteriormente é fixado em metanol por 5 minutos. Deixar secar ao ar a temperatura ambiente. A seguir, corar com carbolfucsina por 5 minutos e processar as lavagens, utilizando primeiramente álcool etílico a 50% e a seguir água corrente. Descorar a lâmina mergulhando-a em álcool ácido a 1% (ácido clorídrico concentrado em álcool etílico 95%). Lavar novamente em água corrente e contra corar com azul de metileno por 1 a 5 minutos. Lavar em água corrente e deixar as lâminas secarem ao ar. Examinar ao microscópio óptico em objetiva de 10 vezes, confirmando em objetiva de 40 vezes de aumento e, se necessário, em objetiva de imersão em aumento de 1.000 vezes (Henriksen & Pohlenz, 1981).

5.6.1.2 Diagnóstico por ensaio imunoenzimático

Utilizou-se o teste imunoenzimático para detecção qualitativa do antígeno oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras fecais congeladas de animais de companhia e idodos. Nessa metodologia utilizaram-se anticorpos monoclonais e policlonais contra o antígeno de superfície do organismo. As cavidades da micro placa presente no kit RIDASCREEN® *Cryptosporidium* (2008) contêm anticorpos monoclonais imobilizados e o conjugado consiste de um anticorpo policlonal, ambos específicos para o antígeno celular de superfície. Dessa forma, após descongelamento obteve-se, a partir de 0,1ml da amostra de fezes diluídas, uma alíquota com diluição de 1:5 em diluente do kit. Esta foi transferida para a cavidade da micro placa e quando na presença do antígeno de *Cryptosporidium* este se ligou ao anticorpo monoclonal imobilizado. Quando adicionado o conjugado, ele ligou-se ao complexo antígeno-anticorpo, sendo que todo material não ligado foi removido nas etapas subseqüentes de lavagem. Na adição do substrato revelou-se cor amarela das amostras positivas em leitura por espectrofotometria em comprimento de onda duplo a $DO_{450/550} \geq 0,090nm$ (Fayer & Ungar, 1986). Para a determinação do valor cut-off, 0,15 unidades de absorbância foram adicionados à absorbância medida do controle negativo. Considerou-se como cut-off o valor de absorbância do controle negativo + 0,15. As amostras cujo valor de absorbância ficaram mais de 10% acima do cut-off calculado foram consideradas positivas. As amostras cujo valor de absorbância ficaram numa faixa entre $\pm 10\%$ do cut-off foram consideradas indeterminadas e foram repetidas. Ao se repetir e ainda assim permanecendo na área cinza, a amostra foi considerada negativa. E as amostras que ficaram mais de 10% abaixo do cut-off calculado foram consideradas negativas (RIDASCREEN® *Cryptosporidium*, 2008).

5.6.1.3 Diagnóstico por extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para isolamento do DNA genômico dos oocistos de *Cryptosporidium* não foram utilizados kits sendo a metodologia utilizada descrita a seguir.

Após descongelamento das amostras em banho Maria a 65°C por 10 minutos, retirou-se uma alíquota das fezes totais para microtubo de 1,5ml no qual se diluiu com 1000µl de PBS, homogeneizou-se e centrifugou-se a 10000 rpm por 5 minutos. Repetiu-se essa lavagem por mais duas vezes até que o sobrenadante estivesse claro. O Sedimento foi ressuspensão em 500µl da solução de lise contendo β-mercaptoetanol (15%) e incubado em banho Maria a 65°C por 2h e 30 minutos. Interrompeu-se a reação colocando o tubo em gelo (0°C) por 10 minutos e, em seguida, em temperatura ambiente por 15 minutos. Para a extração de DNA acrescentou-se 500µl de solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e acrescentado 500µl de loraformio-álcool isoamílico, e centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos. Cuidadosamente, com a pipeta automática, o sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo limpo e acrescentado 500µl de isopropanol gelado e centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 500µl de etanol gelado e centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos. Descartado o sobrenadante, o tudo foi secado a vácuo por 12 horas. O DNA foi eluído com 50µl do tampão TEII (Tris-EDTA) e armazenado a 4°C até o momento de ser utilizado na amplificação pela reação em cadeia de polimerase (Ausubel et al., 1995; McPherson & Moller, 2000).

Para realizar a detecção de *Cryptosporidium* spp. com uma etapa única de PCR, foi selecionado o par de iniciadores por Awad-El-Kariem e colaboradores (1994) referido como AWA e tem como alvo a região hipervariável do gene 18SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp. Esses primers gênero-específicos são: AWA995F (5'– TAG AGA TTG GAG GTT GTT CCT – 3') e AWA1206R (5'– CTC CAC CAA CTA AGA ACG GCC – 3') que amplificam a região conservada de aproximadamente 211 pares de base do 18 rRNA e não é usada para diferenciação de espécies. Para cada reação usou-se uma mistura de PCR (master mix) para um volume final de 25µl: 5µl de DNA; 2,5µl de tampão 10X; 2mM de cloreto de magnésio (Ampliqon® - cód: 250706); 200 µM de deoxinucleosídeo trifosfato (Promega®) (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,5µM década primer e 1,25U de polimerase termoestável (Taq-polimerase, Invitrogen®) diluídos em 14,05µl de água Milli-Q. Para amplificação do DNA alvo, a reação de PCR foi realizada num ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 7 minutos seguido de 40 ciclos de

desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, terminando com uma extensão final a 72°C por 7 minutos mantido a 4°C até ser retirada do termociclador (Mastercycler gradient – Eppendorf). Após a PCR foram adicionados 5µl de azul de bromo fenol em cada tubo contendo o produto amplificado. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,8%, corado com 50µl de solução de brometo de etídio, imerso em tampão TAE 1X, aplicando-se 10µl do produto de PCR em cada poço do gel. Em cada corrida de gel, de uma hora, a 153V, foram adicionados 5µl de marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder; 1µg/µl, Invitrogen, USA). O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta a 365nm e foto documentado (Higgins et al., 2001). A imagem foi obtida através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

5.7 Trabalho de Campo

Este estudo teve o apoio da Secretária de Saúde de Teresópolis e a autorização para a realização da primeira etapa dos trabalhos durante o período da realização das Campanhas Nacionais de Vacinação Contra Gripe.

Para realização do inquérito uma equipe de supervisores e entrevistadores foi selecionada a partir dos cursos de graduação de medicina veterinária UNIFESO e submetidos a treinamento específico pela equipe de coordenação do projeto.

A abordagem dos indivíduos idosos se deu durante a Campanha Nacional de Vacinação Contra Gripe, que é realizada tradicionalmente no fim do mês de abril e início do mês de maio. A estratégia esta escolhida por considerar que neste tipo de demanda grande parte da população idosa, independente da classe social, busca a rede de atenção básica para receber a vacina.

Para controlar a qualidade do trabalho de campo, as entrevistas foram submetidas por um processo de revisão dos questionários preenchidos, primeiro pelo próprio entrevistador, em seguida pelo supervisor e por último pelos responsáveis pela entrada de dados. Os erros de preenchimento, as inconsistências e as respostas em branco foram confirmados por contato posterior.

Foi realizado, para a verificação da consistência da digitação dos dados, um controle de conferência de variáveis-chave em 30% dos questionários. Além disso, relatórios de inconsistências foram emitidos para verificação junto aos questionários ou por re-entrevistas telefônicas.

5.8 Análise dos dados

As características da população do estudo (humana e animal) foram descritas através de medidas de tendência central e dispersão e de distribuições de frequências. Foram estimadas prevalências pontuais, com seus respectivos intervalos de confiança de 95% sendo realizada a modelização estatística multivariada de Poisson buscando identificar características associadas a prevalência de diarreia em idosos.

5.9 Caracterização do sítio de Estudo

5.9.1 Localização

O município de Teresópolis foi criado em 06 de julho de 1891 e faz parte da Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro estando distante da capital 90 km. Apresenta os seguintes municípios como limítrofes: Petrópolis, São José do Rio Preto, Sumidouro, Nova Friburgo, Cachoeiras de Macacu e Guapimirim. Ocupa uma área de 772,4 km² e tem altitude da sede de 871 m. Suas coordenadas variam de: 22° 06' 52" a 22° 28' 38" de latitude e 42° 42' 17" a 43° 03' 19" de longitude.

5.9.2 Dados populacionais

De acordo com o Censo Demográfico do IBGE (contagem de 1999), o município apresenta um total de 138.081 habitantes com 115.198 (83,5%) habitantes na zona urbana e 22.883 (16,5%) habitantes na zona rural, apresentando uma densidade demográfica de 158,7 hab/km² e taxa de urbanização de 83,9%. Do total de habitantes, 13.795 (10%) são idosos com idade acima de 60 anos caracterizando a população de estudo.

5.9.3 Perfil sócio-econômico

O município de Teresópolis tem sua economia basicamente constituída do turismo, da indústria, da agricultura e do comércio.

As atividades industriais desenvolvidas em Teresópolis são tipicamente atividades que atendem às necessidades locais da população e algumas delas estimulam

o turismo, como é o caso da indústria mobiliária e da indústria alimentícia. Este perfil ficou bem caracterizado nas informações obtidas no cadastro RAIS (Relação Anual de Informações Sociais), ano base 1995, que apontou em Teresópolis 288 Unidades Industriais Locais. O cadastro da RAIS mostrou a indústria como um todo no município de Teresópolis, sendo que as tipologias com maior frequência confirmam a característica de cidade com possibilidades de incentivo ao turismo. A atividade de Mobiliário está representada por 19,10% (55 indústrias) das indústrias do cadastro. Confirmando a importância desta atividade, constata-se no município a existência de sofisticadas lojas do ramo mobiliário espalhadas pela cidade. A indústria de Alimentos e Bebidas aparece em uma posição de destaque com 18,06% (52 indústrias) e quem visita Teresópolis encontra à sua disposição cerca de 20 padarias, o que representa 6,25% das indústrias do município. A indústria de Vestuário com 11,11% (32 indústrias) tem importância para o turismo, o que se traduz nas diversas lojas de roupas e na tradicional feira de Teresópolis. A atividade de fabricação de produtos de Madeira participa com 7,99% (23 indústrias) do total de indústrias.

No cadastro, 47,60% (137 indústrias) das indústrias são microempresas, que de acordo com o SEBRAE - Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, no âmbito municipal, são as empresas cuja receita bruta anual é igual ou inferior a 26.758,35 UFIR (R\$ 26.142,90 - valores de setembro de 1999), a serem convertidas em moeda corrente pelo valor dessa unidade em 10 de julho do corrente exercício.

Este percentual de microempresas no município indica que as pequenas indústrias estão contribuindo para a movimentação da economia do município, mas empregam um número menor de pessoas em relação às indústrias tradicionais.

A atividade industrial em Teresópolis soma um total de 3.102 funcionários e entre as atividades com maior número de funcionários estão: Fabricação de Móveis e Indústrias Diversas com 36,85% (1.143 funcionários), Fabricação de Produtos Têxteis com 19,60% (608 funcionários), Confecções de Artigos do Vestuário e Acessórios com 13,09% (406 funcionários) e Fabricação de Produtos Alimentícios e Bebidas com 9,28% (288 funcionários) (IBGE - Projeto Teresópolis 1999).

5.9.4 Nível de escolaridade dos chefes de família com mais de 15 anos de idade

A contagem da população realizada pelo IBGE em 1996 apresenta um índice de alfabetização dos chefes de família acima dos 15 anos de idade como de 98,2%. De acordo com o relatório de Sócio-Economia do Projeto Teresópolis, "os indicadores de

que 71,9 % dos chefes de família com mais de 15 anos de idade apresentavam níveis de escolaridade até sete anos de estudo, ou seja, com o 1º grau incompleto, constitui um dos fatores de baixa sustentação sócio-econômica do território. Segundo os dados da contagem da população realizada pelo IBGE em 1996, 14,86% desse percentual não apresentava nenhuma instrução escolar, outros 22,54% não tinha concluído a 4ª série do primeiro grau e os demais 34,5% não tinha concluído a oitava série, o que lhes garantiria a conclusão do primeiro grau na atualidade (IBGE - Contagem da população, 1996).

Enquanto nos setores urbanos do 1º distrito (Teresópolis) os chefes de família com mais de 15 anos de idade com até sete anos de escolaridade era de 67,69% em 1996, incluindo nesse percentual os 12,53% sem nenhuma instrução, nas áreas rurais do 2º e 3º distritos esse percentual era de 91,98 %, incluindo os 26,44% sem nenhuma instrução. Já nos setores considerados como de aglomerados de habitações subnormais (favelas), esse percentual era de 69,07%, incluindo os 19,4% sem nenhuma instrução (IBGE - Contagem da população, 1996)

Os baixos níveis de escolaridade da maioria da população teresopolitana, constituem um dos principais fatores que influenciam na construção do espaço geográfico no município, pois limita a inserção de boa parte da população no mercado de trabalho no nível das exigências atuais, diminuindo o potencial de rendimentos da população, aumentando a exclusão e os espaços de baixa sustentação econômica e social (IBGE, 1999).

5.10 Aspectos Éticos

Registre-se que o Comitê de Ética em Pesquisas da Ensp/Fiocruz, aprovou o presente estudo, estando os procedimentos de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Foi elaborado um consentimento informado que encontra-se em **ANEXO III**.

6. RESULTADOS

Os resultados foram compatibilizados em função dos objetivos definidos neste trabalho, os quais são apresentados a seguir. Destaca-se que a apresentação detalhada encontra-se nos anexos.

6.1 Resultado que contempla o objetivo 1

6.1.1 ARTIGO 1: “Detecção de *Cryptosporidium parvum* em alfaces frescas para consumo cru. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil”. Cassia R. A. Pereira, Aldo P. Ferreira, Rosalina J. Koifman. **Gaia Scientia** 2008, 2(2): p-31 - 36.

A criptosporidiose humana surgiu como importante infecção gastrintestinal como resultado da ingestão de vegetais *in natura* ou contato de pessoa a pessoa, ambos contaminados pelo *Cryptosporidium parvum*. Este patógeno tem especial significado clínico por causar um quadro diarréico profuso, em pessoas imunodeprimidas, incluindo pacientes com AIDS e pacientes com câncer que recebem quimioterápicos sob regimes tóxicos medicamentosos. O emprego de água contaminada, não potável, para a produção de hortaliças, especialmente alface, pode representar importante fonte potencial de sua presença. Este artigo analisou a incidência de *C. parvum* em alface frescas para consumo cru, através de estudo de caso em Teresópolis, RJ, Brasil. Conclui-se que a ingestão de hortaliças contaminadas por estruturas parasitárias é uma via importante de transmissão de enteroparasitoses, necessitando a adoção de medidas, por parte dos órgãos de vigilância sanitária, que resultem em uma melhoria da qualidade higiênica desses produtos.

6.1.2 ARTIGO 2: “Ocorrência de enteroprotzoários em águas de irrigação de estabelecimentos produtores de hortaliças. Estudo de caso: Teresópolis, RJ”. Cássia Regina Alves Pereira, Aldo Pacheco Ferreira, Marco Aurélio Pereira Horta. **Submetido - Revista de Patologia Tropical.**

Foi detectado *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. nas águas destinadas a irrigação utilizadas em 10 estabelecimentos produtores de hortaliças do município de Teresópolis, RJ. O período de pesquisa deu-se de maio a dezembro de 2010. Para o isolamento de *Cryptosporidium* spp. utilizou-se o método de concentração de oocistos

por centrifugação em membrana filtrante. Para determinação da presença/ausência de oocistos e cistos utilizou-se a imunofluorescência direta (IFD). Os coliformes totais (CT) e termotolerantes (CTT) foram avaliados de acordo com a Portaria nº 518. A IFD proporcionou confirmação de 23,82% de amostras positivas de *Cryptosporidium* spp. no período chuvoso e de 41,44% no de seca; e confirmação de 21,63% de amostras positivas de *Giardia* spp. no período chuvoso e 45,33% no de seca. No período chuvoso a média de CT foi de 37,6 NMP/100ml e de CTT 17,8 NMP/100ml. Para o período seco a média de CT foi de 45,5 NMP/100ml e de CTT 19,9 NMP/100ml. Urge a implementação de ações sanitárias nos estabelecimentos agrícolas produtores de hortaliças e do município de Teresópolis, para que tenha a garantia de que a água de irrigação não contamine os alimentos, nem ofereça riscos à saúde da população.

6.2 Resultados que contemplam os objetivos 2, 3, 4 e 5

6.2.1 ARTIGO 3: “Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in elderly domestic companion animals from Teresopolis municipality, RJ, Brazil”, Cassia R. A. Pereira, Aldo P. Ferreira, Rosalina J. Koifman, Sérgio Koifman. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**. Aceito para publicação em 16-9-2010.

This study aims to highlight the prevalence of cryptosporidiosis in domestic companion animals. Eligible for study were all elder (60 yr. or over) of both gender who have dogs and / or cats at home, living in the city of Teresópolis, RJ, Brazil attending a public vaccination center in the municipality during the national influenza vaccination campaigns in 2007 and 2008. The presence of one or more oocysts in fecal material (positive for *Cryptosporidium* spp.) was identified in 87 (29.0%) of these animals, and 28.7% showed about 2 or more oocysts per field. Among the 300 examined animals, the prevalence of diarrhea antecedents was 27%, reaching 29.5% in dogs and 24.7% in cats ($p > 0.05$). This observation is suggestive of the need of further investigation, since there are few studies that explore the cryptosporidiosis relationship in the human population with companion animals.

6.2.2 ARTIGO 4: “Análise da prevalência de *Cryptosporidium* spp. em felinos de companhia de idosos. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil”. Cassia Regina Alves Pereira, Aldo Pacheco Ferreira, Marco Aurélio. P. Horta, Rosalina Jorge Koifman. **Submetido - Revista Baiana de Saúde Pública**.

Foi pesquisada a prevalência de criptosporidiose em gatos domésticos de companhia em idosos (acima de 60 anos de idade) de ambos os sexos, residentes no Município de Teresópolis e que compareceram a um posto de vacinação do município no período da vacinação contra gripe de 2009 e 2010. A prevalência de diarreia nos idosos foi 29,4% e nos felinos 24,5%. Foi identificada presença de 1 ou mais oocistos em 16,7% dos idosos e 12,7% nos felinos. A análise da razão de prevalência de diarreia evidenciou uma forte associação em idosos (RP = 4,37, IC a 95%: 2,67 - 7,16), porém com menor força de associação, mas ainda com significância estatística para felinos (RP = 2,16, IC a 95%: 1,06 - 4,39). Pela imunofluorescência confirmado pelo PCR houve semelhante força de associação em idosos (RP = 4,43, IC a 95%: 3,04 - 6,45), porém observou-se um aumento na força de associação para felinos (RP = 4,67, IC a 95%: 3,9 - 6,81). É preocupante, mas importante para a saúde pública, os achados obtidos com esta pesquisa por demonstrar a relação zoonótica do *Cryptosporidium* spp. presente nas amostras fecais dos animais de companhia do grupo populacional de idosos estudados.

7. DISCUSSÃO

O estudo ambiental para presença de *Cryptosporidium* spp. em alfaces frescas cultivadas na região rural do município de Teresópolis “Circuito Terê-Fri” apresenta significância regional para a saúde coletiva uma vez que é importante pólo fornecedor para comercialização na maioria dos municípios do Estado do Rio de Janeiro. A alface lisa (*Lactuca sativa*) tem representação na cultura alimentar brasileira pelo valor nutritivo e baixo custo para aquisição.

Ao comprovar 100% de contaminação nas folhas da base dos pés de alface com oocistos de *Cryptosporidium* por contaminação direta do solo demonstrou-se a presença natural no ambiente como descrito por Fayer e Ungar, (1986), a relação da presença do animal de produção com a atividade humana de acordo com Acha & Szyfres (1997) e suas descargas fecais, quer seja pela presença de esterco fresco proveniente de criações próprias, concordando com estudo nos Estados Unidos por Graczyk e colaboradores (2000) ou ainda por dejetos utilizados como adubo para fontes agrícolas como Heitman e colaboradores (2007) descreve em fazendas canadenses. No Brasil utiliza-se culturalmente o estrume *in natura* como fertilizantes para hortaliças, o que, segundo Dias (2002) compromete a água que irriga essas plantações, muitas vezes oriundas de rios ou nascentes contaminadas, possibilitando a chegada à mesa do consumidor de alimentos contaminados embora Roy e colaboradores (2004) relate que comer vegetais crus seja fator de proteção (OR = 0,5; IC = 95% 0,3-7) para a infecção por *Cryptosporidium* sp..

Em consonância com Chalmers e colaboradores (1997) a presença de animais silvestres contribui para aspectos geográficos da distribuição do parasito, ocasionalmente pequenos mamíferos e roedores provenientes das áreas de reserva de Mata Atlântica serrana corroborando com o descrito por estudo de Dall’Olio & Franco (2004) nas redondezas do sítio de estudo.

Ao evidenciar presença de oocistos em 38% das folhas do meio do pé de alface demonstrou-se uma forma de contaminação relacionada à água contaminada, uma vez que em seu habitat natural, a *Lactuca sativa* apresenta uma formação folhosa densa e fechada ao miolo como descrito por Rolim & Torres (1992).

Porém a suposição de que a água de irrigação, sem controle prévio de potabilidade e proveniente de mananciais poderia ser potencial fonte de surto de doenças como descrito por Gostin e colaboradores (2000) e Pacheco e colaboradores (2002) comprovou-se ao se analisar as águas utilizadas na irrigação de 10

estabelecimentos agrícolas produtores de hortaliças pesquisados nos períodos de maio a dezembro de 2010 no “Circuito Terê-Fri” do município de Teresópolis, RJ, compreendendo períodos de seca e de chuvas. Este estudo possibilitou a confirmação de 23,82% de amostras positivas de *Cryptosporidium* spp. no período chuvoso e de 41,44% no período de seca, assim como as concentrações médias de coliformes totais descritas para o período chuvoso de 37,6 NMP/100ml (18 - 78) e 17,8 NMP/100ml (7 - 41) para os termotolerantes; e para o período seco as concentrações médias de coliformes totais de 45,5 NMP/100ml (15 - 71) e 19,9 NMP/100ml (6 - 33) para os termotolerantes denotaram importante indicador de contaminação de origem fecal como indicador de organismos resistentes de acordo com Gostin e colaboradores (2000) devido a movimentação animal, o que torna difícil o controle e a proteção dos corpos d'água e águas superficiais como descrito por Atwill et al. (2003) assim como águas subterrâneas descrito por Gamba e colaboradores (2000).

Em relação à presença de animais, observaram-se apenas presença animais domésticos de pequeno porte como aves, cães e gatos em todos os estabelecimentos agrícolas durante a obtenção de amostras. Além disso, todos os estabelecimentos agrícolas apresentavam edificações como casas de alvenaria e barracões abertos ou galpões para manipulação, armazenamento e distribuição da produção agrícola. Em 4 das instalações sanitárias observou-se rede de abastecimento e coleta de esgoto, e nas 6 restantes, sem abastecimento de água e o esgoto era destinado a fossa séptica.

Ainda neste segundo estudo, observou-se que a média da densidade de oocistos de *Cryptosporidium* de $1,46 \times 10^4$ /L no período chuvoso aumentou para $6,09 \times 10^5$ /L no período seco demonstrando provável permanência e resistência ambiental do oocisto e fazendo desse local constante fonte de infecção aos animais silvestres e domésticos que transitam ao longo dos corpos hídricos corroborando estudos de Heller e colaboradores (2004). Demonstrou-se então que foi ultrapassado o grau de risco aceitável pela USEPA nos Estados Unidos para uma infecção anual em 10.000 habitantes (Macler & Regli, 1993; USEPA, 1998) onde a concentração de *Cryptosporidium* não deve ser superior a 3×10^5 oocistos/L.

Na pesquisa com os indicadores de qualidade de água (Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes), sua detecção também se deu, denotando condições sanitárias precárias locais, fato identificado nas observações em conversas informais realizadas na pesquisa de campo. Deixa claro de que a falta de saneamento básico juntamente com má conservação ambiental são fatores determinantes na contaminação dos recursos hídricos (Ludwig et al., 1999; Gostin et al., 2000) e assim justifica a

presença microbiológica na águas de irrigação dos estabelecimentos agrícolas da região estudada; fato também já sinalizado por outros autores de outras áreas agrícolas investigadas (Oliveira & Germano, 1992; Ferreira et al., 2000).

Embora ambas as pesquisas – *Cryptosporidium* na alface lisa e água de irrigação - tenham utilizado pequena amostragem, apresentam problema na implantação de políticas sanitárias aliadas ao tratamento das pessoas infectadas, bem como o fomento a programas educacionais junto às populações do meio rural para conscientização desse problema de caráter coletivo já que muitos casos são assintomáticos, não existe tratamento efetivo e pode ser fatal em indivíduos imunocomprometidos. Logo, estamos de acordo com Silva e colaboradores (2005) ao sugerir que ingestão de hortaliças contaminadas por estruturas parasitárias é uma via importante de transmissão de enteroparasitoses, necessitando a adoção de medidas, por parte dos órgãos de vigilância sanitária, que resultem em uma melhoria da qualidade higiênica desses produtos.

A preocupação com as fontes e a incidência da infecção humana por parasitas patogênicos envolvidos na veiculação hídrica e alimentar, deveriam proporcionar um monitoramento e tratamento sanitário nos diferentes usos da água e, para tal, emerge a aplicação de tecnologias para a prevenção, detecção e inativação da carga parasitária, rotineiramente presente em mananciais brasileiros como descrito por Heller e colaboradores (2004).

No terceiro estudo os 300 indivíduos idosos residentes no município de Teresópolis, RJ que demandaram a campanha de vacinação contra a gripe nos anos de 2007 e 2008 eram proprietários de pelo menos um animal doméstico, predominantemente do sexo feminino, apresentavam uma clara preferência por cães como o animal de escolha para companhia, e na sua maioria, mantinham os animais domiciliados dentro das residências.

A pesquisa de oocistos na população de cães e gatos (300) sob a guarda dos 300 idosos evidenciou uma elevada prevalência global (29,0%) de positividade para *Cryptosporidium* spp. pela coloração de ZNM, superior às populações caninas relatadas em outros estudos na literatura, tais como os 7,4% relatados na Califórnia, EUA por El-Ahraf e colaboradores (1991), os 7,4% em São Paulo, Brasil por Gennari e colaboradores (1999), os 8,85% também em em São Paulo, Brasil pelas autoras Lallo & Bondan (2006), os 10,2% no nordeste do Brasil por Newman e colaboradores (1993) e ainda muito superior à prevalência de 1,85% em cães saudáveis de Lavras e Viçosa, MG descritos por Figueiredo e colaboradores (2004). Pesquisas realizadas em países do desenvolvidos como Finlândia (Fayer, 1997), Alemanha (Augustin-Bichi et al., 1984) e

Suíssa (Simpson et al, 1988) não revelaram excreção de oocistos nas fezes dos cães adultos.

A elevada prevalência *Cryptosporidium* em animais na região de Teresópolis pode ser compatível com os achados de Pereira e colaboradores (2008), quando detectaram elevada contaminação (38%) deste protozoário no interior de alfaces lisas embora não se possa estabelecer uma relação direta já que esses animais não consumiram água nas mesmas fontes utilizadas na irrigação das verduras.

A positividade para *Cryptosporidium* nos animais de conviviam com idosos nas faixas etárias de 70-74 anos e com 75 anos ou mais (43,9%) foi muito elevada configurando uma maior probabilidade de exposição desta parasitose em grupos populacionais considerados mais suscetíveis, diferente do descrito por Mirzaei (2007) que afirma a não relação dos animais de companhia com quadro clínico oportunista para diarreia ao encontrar 25% de positividade para o *Cryptosporidium* spp. no grupo etário acima de 51 anos.

Outro aspecto do terceiro estudo apresentado (terceiro artigo em anexo) foi a população canina de um animal por domicílio que apresentou menor prevalência de diarreia em relação aos casos de superpopulação (mais que 5 animais), provavelmente como resultado do menor contato com outros animais (via oral/fecal) evitando uma contaminação cruzada de acordo com Tzannes e colaboradores (2008) e aspectos de super população como descrito por Fayer e colaboradores (2000), Figueiredo e colaboradores (2004) e Barr & Bowmann (2006). Observou-se também que os animais que eram domiciliados dentro das residências apresentaram um razão de prevalência protetora, com redução da probabilidade de apresentar diarreia, provavelmente pelo fato do ambiente interno estar em condições de menor exposição a infecção do *Cryptosporidium*.

O quarto artigo apresentado avalia 102 indivíduos idosos residentes em Teresópolis-RJ que compuseram a amostra da população estudada que demandaram a campanha de vacinação contra a gripe nos anos de 2009 e 2010, sendo predominantemente do sexo feminino, proprietários de pelo menos um felino doméstico, animal de escolha para companhia e na sua maioria permitem que os animais domiciliados transitem dentro e fora das residências.

A população de 102 gatos avaliada através da identificação de oocistos pela presença de *Cryptosporidium* spp. pela coloração de ZNM evidenciou uma moderada prevalência (12,7%), compatível com a variação global de resultados em diferentes países como 3,8% no Japão (Arai et al., 1990), 8,1% no Reino Unido (Mtambo et al,

1991), 12,3% na Escócia (Nash et al, 1993) e os 24,5% de 200 felinos de Turin na Itália (Rambozzi et al, 2007) sendo que semelhante estudo realizado por Coelho e colaboradores (2009) em 51 felinos obteve uma prevalência de 3,9% pela coloração verde de malaquita no município de Andradina-SP.

A análise da razão de prevalência de diarreia segundo a presença de oocistos pelo método de coloração Ziehl-Neelsen modificada evidenciou uma forte associação em idosos (RP = 4,37, IC a 95%: 2,67 - 7,16) de acordo com estudo apresentado por Mirzaei (2007), porém com menor força de associação, mas ainda com significância estatística para felinos (RP = 2,16, IC a 95%: 1,06 - 4,39) embora Tzannes e colaboradores (2008) relate ter cautela em associar a frequência de sinais clínicos associados ao parasitismo.

Já pelo método de imunofluorescência confirmado pelo PCR houve semelhante força de associação em idosos (RP = 4,43, IC a 95%: 3,04 - 6,45), porém observou-se um aumento na força de associação para felinos (RP = 4,67, IC a 95%: 3,9 - 6,81). Esses resultados quando estratificados por número de oocistos por campo demonstrou efeito dose resposta para idosos com aumento das medidas de efeito, estabilizando-se para 2 ou mais oocistos numa RP de 5,31 (IC 95%: 1,08 - 9,54). Diferente comportamento observou-se na dose resposta para felinos com aumento das medidas de efeito a medida que aumenta o número de oocistos por campo embora seus respectivos IC a 95% não sejam estatisticamente significativos.

Para os fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. nos proprietários dos animais, a regressão logística não apresentou associações significativas ao nível de $p < 0.05$, com exceção da variável diarreia. Da mesma forma, alguns resultados podem ser destacados. Observou-se uma maior chance de infecção para as mulheres em relação aos homens (OR=2,78, IC=0.59-13.12), e um aparente efeito protetor pela infecção com o aumento da idade das pessoas (OR=0.37, 0.57). A ocorrência de diarreia apresentou uma forte associação com a infecção por *Cryptosporidium* spp. (OR=20.12, IC=5.16-78.44)

A percepção do risco zoonótico da criptosporidiose por parte do Médico Veterinário é determinante para o sucesso do controle dessa enfermidade de caráter oportunista, uma vez que a população idosa representa um grupo de particular vulnerabilidade pela sua natural debilidade orgânica em função da senilidade.

Altas prevalências de endoparasitas em animais de companhia demandam significativo risco à saúde pública e se faz necessária aplicação de apropriado protocolo de desparasitação no acompanhamento clínico veterinário (Stull et al., 2007).

Embora alguns estudos tenham demonstrado protocolos de desparasitação de pequenos animais, prevalência de parasitas percebida pelo médico veterinário, e percepção de risco zoonótico (Grant & Olsen, 1999; Gauthier & Richardson, 2002; Stull et al., 2007) não é inteiramente entendido porque persistem pobres os cumprimentos desses protocolos bem como corrigi-los com produtos variados e eficazes.

8. CONCLUSÕES

- Dados de prevalência de *Cryptosporidium* spp. em alimentos (alface lisa) e água de abastecimento demonstram risco ambiental no Município de Teresópolis e municípios afins;
- As populações de estudo animais de companhia e idosos proprietários apresentam compatíveis pelos resultados parasitológicos para oocistos de *Cryptosporidium* spp. para risco para a infecção cruzada e quadro diarréico oportunista, agravado se houver imunocomprometimento;
- A associação entre quadros relatados de diarréia entre proprietários idosos e prevalência de *Cryptosporidium* sp. nos animais domésticos de companhia sugerem transmissão zoonótica pelo estreito convívio e risco da criptosporidiose no grupo populacional idoso;
- Esforços devem ser implementados na rotina clínica veterinária para correto diagnóstico, com competentes protocolos de desparasitação bem como ações educativas intercambiadas às ações médicas preventivas para população idosa;
- Medidas de controle parasitárias aos animais de companhia de idosos devem ser estimuladas e urgentemente preconizadas na melhoria de assistência ao idoso.
- A população idosa, em seu estado clínico fisiológico natural pertinente à terceira idade apresenta-se susceptível a quadros diarréicos e a desenvolver a criptosporidiose a partir da exposição ao *Cryptosporidium* spp. pelo ambiente (água, alimento) além do estreito convívio com cães e gatos de companhia sintomáticos ou não à doença.

9. RECOMENDAÇÕES

A exposição ambiental de *Cryptosporidium* spp. demanda recomendações em todos os níveis de atenção à saúde coletiva, com medidas de saneamento, incremento da infraestrutura e acesso à água de qualidade, ações com medidas educativas para o cuidado e segurança alimentar, fomento da prevenção através de rastreamento parasitológico de caráter rotineiro em pacientes que buscam a atenção básica de saúde e, pela percepção por parte do médico veterinário para o risco zoonótico quando se tratar de um animal de companhia de um idoso.

A partir dos aspectos de potabilidade da água de consumo determinados pela Portaria 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) devemos tomar algumas medidas de vital importância e de grandes resultados tais como implantar sistema de abastecimento e tratamento da água, com fornecimento em quantidade e qualidade para consumo, uso doméstico e coletivo. É primário fazer a proteção de contaminação dos mananciais e fontes de água como também a implantação de sistema adequado de esgotamento sanitário. As casas devem ter abastecimento de água preferencialmente com encanamento no domicílio com instalação de reservatório de água adequado com limpeza sistemática. Outro aspecto de vital importância para o controle das doenças é eliminar o aparecimento de criadouros com inspeção sistemática e medidas de controle (drenagem, aterro e outros), além de dar destinação final adequada aos resíduos sólidos e fazer o controle de vetores e hospedeiros intermediários.

O município de Teresópolis RJ possui riqueza hidrográfica e geográfica que permite a larga exploração de atividade econômica para cultivo de hortaliças e leguminosas. Face a possibilidade de contaminação ambiental pela água de irrigação e com organismos indicadores de presença de matéria fecal, além de dejetos animais dispostos no solo diretamente ou como forma de adubo, faz-se necessário para o consumo de hortaliças a limpeza de folhas em jato de água corrente, removendo sujidades grosseiras e posterior desinfecção com permanência de 20 a 30 minutos da mesma em submersão em hipoclorito de sódio 2,5% para cada litro d'água e, em seguida, enxaguar em água filtrada. Se sofrer cozimento, que a folhagem atinja a temperatura de 75°C no interior da peça por 30 minutos.

Finalmente, por haver rota de transmissão fecal oral pessoa a pessoa, a cryptosporidiose necessita atenção por parte de práticas educativas, principalmente no contexto familiar, visando mudanças de comportamento para a promoção de sua saúde. Nesse universo insere-se o papel de educador em saúde por parte do Médico

Veterinário, fomentando a saudável convivência entre proprietário e seu animal doméstico, quer seja na área urbana ou rural. Práticas diárias de cuidados com a higiene do animal (especialmente se este tiver acesso ao interior do domicílio), oferta de alimento de qualidade e água potável, assim como o destino adequado de dejetos, são habilidades que o Médico Veterinário deve estimular na relação homem – animal de companhia, além do acompanhamento clínico com sistemática para desparasitismo e olhar preocupante para episódios diarréicos.

REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, I.; ALIYU, S. H.; ARUMUGAM, C.; USMAN, N. K.; HUNTER, P. R. 2007. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *J Clin Pharmacol.* 63(4) 387–393.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. 1997. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.* 2 ed., Washington: Organización Panamericana de La Salud – Publicación Científica n. 503:585-589.

ALBRECHT, C. R.; CUMBO, T. A.; GAMBERT, S. R. 2003. Health Issues, travel and the elderly. *Clinical geriatrics.* 11(7) 24-33.

ALLES, A. J., MARY, A. W.; SIERRA, L. S.; MATTIA, A. R. 1995. Prospective Comparison of Direct Immunofluorescence and Conventional Staining Methods for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Human Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 33(6) 1632–1634.

ANDERSON, B. C. 1981. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *Journal American Veterinary Medical Association.* 178(9) 892-984.

ANDERSON, B. C.; DONNDELINGER, T.; WILKINS, R. M.; SMITH, J. 1982. Cryptosporidiosis in a veterinary student. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 180:408-409.

ARAI H, FUKUDA Y, HARA T, FUNAKOSGI Y, KANEBO S, YOSHIDA T, ASAH, H, KUMADA M, KATO K, KOYAMA T. 1990. Prevalence of *Cryptosporidium* infection among domestic cats in Tokyo metropolitan district, Japan. *Japanese Journal of Medical Science and Biology.*43:7-14.

ARROWOOD, M. J. 2002. In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium* Species. *Clinical Microbiology Reviews.* 15(3) 390–400.

ATWILL, E. R., CAMARGO, S. M.; PHILLIPS, R.; ALONSO, L. H.; TATE, K. W.; JENSEN, W. A.; BENNET, J.; LITTLE, S.; SALMON, T. P. 2001. Quantitative

shedding of two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2840–2843.

ATWILL, E. R., HOAR, B.; PEREIRA, M. G. C.; TATE, K. W.; RULOFSON, F.; NADER, G. 2003. Improved quantitative estimates of low environmental loading and sporadic periparturient shedding of *Cryptosporidium parvum* in adult beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4604–4610.

AUGUSTIN-BICHIL VG, BOCH J, HENKEL G. 1984. Kryptosporodien-infektionen bei hund und katze. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 97(5) 179-181.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K.. 1995. *Short protocols in molecular biology*. New York: John Wiley e Sons.

BARR, S. C.; BOWMAN, D. D. 2006. *Cryptosporidiosis*. In: *The 5- Minute Veterinary Consult Clinical Companion: Canine and Feline Infectious Diseases and Parasitology*. Blackwell Publishing. 157–161.

BARWICK, R. S., LEVY, D. A., CRAUN, G. F., BEACH, M. J., CALDERON, R. L. 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks—United States, 1997–1998. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report.* 49:1–44.

BLAGBURN, B. L.; CURRENT, W. L. 1983. Accidental infection of a researcher with human *Cryptosporidium*. *The Journal of infectious diseases.* 148: 772-773.

BRASIL. 2004. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. O Ministério da Saúde aprova normas e padrões de potabilidade da água destinada ao consumo humano. *Diário Oficial*, Brasília, 26 mar. a, Seção 1, p.266-70.

CARREÑO, M.; VELASCO, C. A.; RUEDA, E. 2005. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en niños menores de 13 años con afecciones oncológicas. *Colombia Médica.* 36(2) 6-9.

CARVALHO-ALMEIDA, T. T.; PINTO, P. L. P.; QUADROS, C. M. S.; TORRES, D. M. A. G. V.; KANAMURA, H. Y.; CASINIMO, A. M. 2006. Detection of *Cryptosporidium* spp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 48(1) 27-32.

CASEMORE, D. P. 1987. The antibody response to *Cryptosporidium*: development of a serological test and its use in a study of immunologically normal persons. *Journal of Infection*. 14: 125-134.

CAUSAPE, A. C.; QUILEZ, J.; SANCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E. 1996. Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. *Vet Parasitol*. 67:161-167.

CENAC, J.; DELUOL, A. M.; MATHERON, S.; COULAUD, J. P.; SAVEL, J. 1984. Cryptosporidiosis I. A new human intestinal protozooisis. *Anales de Biologie Clinique*. 42(6) 389-397.

CHALMERS, R. M.; STURDEE, A. P.; BULL, S. A.; MILLER, A.; 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: 478-482.

CHANTRI, T.; KAVITA, P. 2007. Diarrheal diseases in the elderly. *Clin Geriatr Med*. 23(4) 833-56.

COELHO, W. M. D.; AMARANTE, A. F. T.; SOUTELLO, R. V. G.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. 2009. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal*. 18(2) 46-49.

CRAWFORD, F.G., VERMUND, S.H., MA, J.Y. & DECKELBAUM, R.J., 1988. Asymptomatic cryptosporidiosis in a New York city day care center. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7:806.

CURRENT, W. L. 1985. Cryptosporidiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187:1334-1338.

- CURRENT, W. L. 1983. Human cryptosporidiosis. *N Engl J Med.* 309: 614-5.
- DALL'OLIO, A. J.; FRANCO, R. M. B. 2004. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do Sudeste brasileiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56(1) 25-31.
- DE CARLI, G. A.; SARAIVA, P. J. 1991. Diagnóstico de Laboratório da Criptosporidiose Humana. *Rev. Bras. Anal. Clín.* 23(2) 26-30.
- DE PAUW, K.. 1984. Therapeutic horseback riding in Europe and America. In: ANDERSON R.K. *The Pet Connection: Its Influence on Our Health and Daily Life.* Hart LA ed. Minneapolis: Center to Study Human-Animal Relationships and Environments, p.141-153.
- EL-AHRAF, A.; TACAL, J. V.; SOBIH, M.; AMIN, M.; LAWRENCE, W.; WILCKE, B. W. 1991. Prevalence of cryptosporidiosis in a dog and a human being in San Bernardino country, California. *J Am Vet Med Assoc.* 198(4) 631-4.
- FALAVIGNA, L.M.; RODRIGUES DE FREITAS, C.; CARDOSO DE MELO, G. 2005. Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. *Parasitologia Latinoamericana.* 60(3-4) 144-149.
- FARACO, C.B.; SEMINOTTI, N. 2004. A relação homem-animal e a prática veterinária. *Revista CFMV.* 32(2) 57-62.
- FAYER, R. 1997. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis.* Boca Raton: CRC, 251p.
- FAYER, R.; MORGAN, U. M.; UPTON, S. J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal of Parasitology* 30(12-13) 1305-1322.
- FAYER, R; UNGAR, B. L. P. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis, *Microbiological Reviews.* 50(4) 458-483.

FERREIRA, A. P. 2003. Inspeção microbiológica para avaliação da qualidade das águas ambientais. *Revista Brasileira de Farmácia*. 84(2) 61-63.

FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; NOGUEIRA, R. B.; COSTA, P. R. DOS S. 2004. Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Ciência Rural*. 34(5).1625-1627.

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

FRIEDMANN, E. 1990. The value of pets for health and recovery in: Waltham Symposium 20, 1990, Proceedings... Pets, benefits and practice. *1st European Congress of the British Small Animal Veterinary Association*, Cheltenham, England: BVA Publications, p.8-17.

FUNDAÇÃO MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS. 2008. Identificação de oocistos de *Cryptosporidium*. Governo do Estado do Amazonas. Disponível em: <<http://www.fmt.am.gov.br/areas/parasitologia/copro.htm>>. Acessado em 20/04/2008.

GAMBA, R. C.; CIAPINA, E. M. P.; ESPÍNDOLA, R. S.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V. H. 2000. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S. Paulo – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31:151-153.

GAMBHIR, S., JAISWAL, J.P., NATH, G. 2003. Significance of *Cryptosporidium* as an aetiology of acute infectious diarrhoea in elderly Indians. *Tropical Medicine and International Health*. 8(5) 415–419.

GARCIA, L. S.; CURRENT, W. L. 1989. *Cryptosporidiosis*: clinical features and diagnosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 27:439-460.

GAUTHIER, J. L., RICHARDSON, D. J. 2002. Knowledge and attitudes about zoonotic helminths: a survey of connecticut pediatricians and veterinarians. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 24:4–9.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. 1999. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 36(2) 87-91.

GERBA, C. P.; ROSE, J. B.; HAAS, C. N. 1996. Sensitive populations: who is at the greatest risk? *International Journal of Food Microbiology.* 30: 113-123.

GOSTIN, L. O.; LAZZARINI, Z.; NESLUND, V. S.; OSTERHOLM, M. T. 2000. Water quality laws and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens. *Am J Pub Health.* 90(6): 847-53.

GRACZYK, T. K.; EVANS, B. M. SHIFF, C. J.; KARREMAN, H. J.; PATZ, J. A. 2000. Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Environ. Res.* 82:263–271.

GRANT, S., OLSEN, C. W. 1999. Preventing zoonotic diseases in immunocompromised persons: the role of physicians and veterinarians. *Emerg Infect Dis.* 5:159–163.

HELLER, L., BASTOS, R.K.X., VIEIRA, M.B.C.M., BEVILACQUA, P.D., BRITO, L. L. A. 2004. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 13(2):79 – 92.

HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. 1981. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 22(3-4):594-596.

HIGGINS, J. A.; JENKINS, M. C.; SHELTON, D. R.; FAYER, R.; KARNS, J. S. 2001. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 64(11):5321-5324.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1999. Projeto Teresópolis. Hydrology and elevation Teresópolis (Map). Scale Layer: 1:50.000. 4d ed., DAMTD. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>> Acessado em 01/08/2009.

IBGE - Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2002. Censo Demográfico, 2000. Rio de Janeiro: IBGE.

JAKUBOWSKI, W.S., BOUTROS, S., FABER, F., FAYER, F., GHIORSE, W., LeCHEVALLIER, M., ROSE, J.B., SHAUB, S., SINGH, A., STERWART, M., 1996. Environmental methods for *Cryptosporidium*. *J. Am. Water. Works Assoc.* 88:107-121.

JANOFF, E. N.; MEAD, P. S.; MEAD, J. R.; ECHEVERRIA, P.; BODHIDATTA, L.; BHAIBULAYA, M.; STERLING, C. R.; TAYLOR, D. N. 1990. Endemic *Cryptosporidium* and *Giardia lamblia* infection in a Thai orphanage. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 43:248-256.

JULIANO, R. S.; JAYME, V. de S.; FIORAVANTI, M. C. S.; PAULO, N. M.; ATAYDE, I. B. 2006. Terapia assistida por animais (TAA): uma prática multidisciplinar para o benefício da saúde humana. Universidade Federal de Goiás – Escola de Veterinária, Programa de Graduação. Disciplina de Bioética.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health.* 05(1):01-38.

KATSUMATA, T.; HOSEA, D.; RANUH, I. G.; UGA, S.; YANAGI, T.; KOHNO, S. 2000. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 62(1):70-72.

KEHL, K. S. C.; CICIRELLO, H.; HAVENS, P. L. 1995. Comparison of four different Methods for detection of *Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology.* 33(2):416-418.

KOCH, K. J.; PHILLIPS, D. J.; ABER, R. C.; CURRENT, W. L. 1985. Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission. *Annals of Internal Medicine*. 102:593-596.

LALLO, M. A.; BONDAN; E. F. 2006. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. *Revista Saúde Pública*. 40(1):120-125.

LAXER, M. A.; ALCANTARA, A. K.; JAVATO-LAXER, M.; MENORCA, D. M.; FERNANDO, M. T.; RANOA, C. P. 1990. Immune response to cryptosporidiosis in Philippine children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42:131-139.

LEVINE, N. D. Phylum II. Apicomplexa Levine 1970, p. 322-374. In: LEE, L. L.; HUTNER, S. H.; BOVEE, E. C. (ed.). 1985. *Illustrated guide to the protozoa*. Kans.: Society for Protozoology.

LUCIO-FORSTER, A.; GRIFFITHS, J. K.; CAMA, V. A.; XIAO, L.; BOWMAN, D. D. 2010. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends in Parasitology*. 26(4):174-179.

MACKENZIE, W. R.; SCHELL, W. L., BLAIR; K. A.; ADDISS, D. G.; PETERSON, D. E.; HOXIE, N. J. 1995. Massive outbreak of waterborne *Cyptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin. Recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clinical Infectology and Disease*, 21:57-62.

MANGINI, A. C. F.; DIAS, R. M. D.; GRISI, S. J. F. E.; ESCOBAR, A. M. U.; TORRES, D. M. A. G. V.; ZUBA, I. P. R.; QUADROS, C. M. S.; CHIEFFI, P. P. 1992. Parasitismo por *Cryptosporidium* spp. em crianças com diarréia aguda. *Revista do Instituto Tropical de São Paulo*, 34(4):341-345.

MACLER, B. A.; REGLI, S. 1993. Use of microbial risk assessment in setting US drinking water standards. *International Journal of Food Microbiology*. 18:245-256.

MANNION, A. M. 1999. Domestication and the origins of agriculture: an appraisal. *Progress in Physical Geography*. 23(1):37-56.

MASCARINI, L. M.; DONALÍSIO, M. R. 2006. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(6):577-579.

MATA, L. BOLAÑOS, H.; PIZARRO, D.; VIVES, M. 1984. Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rican and urban areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33:24-29.

MCPHERSON, M. J.; MOLLER, S. G. 2000. *PCR*. New York: Bios Springer.

MESQUITA, V. C. L.; SERRA, C. M. B.; BASTOS, O. M. P. UCHOA, C. M. A. 1999. Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32(4):363-366.

MEYERS, B. R. 1989. Infectious diseases in the elderly: an overview. *Geriatrics*. 44:4-6.

MIRZAEI, M. 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection in diarrheic and non-diarrheic humans in Iran. *Korean Journal of Parasitology*, 45(2):133-137.

MMWR. 1982. Cryptosporidiosis: an assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 31:589-592.

MOORE, A. C.; HERWALDT, B. L.; CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L.; HIGHSMITH, A. K.; JURANEK, D. D. 1993. Surveillance for waterborne disease outbreaks—United States, 1991–1992. MMWR. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 42:1–22.

MOTA, S. 2003. *Introdução à engenharia ambiental*. 3 ed., Rio de Janeiro: ABES.

MTAMBO, M. M.; NASH, A. S.; BLEWETT, D. A.; SMITH, H. V.; WRIGHT, S. 1991. *Cryptosporidium* infection in the cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. *Veterinary Record*. 129:502-504.

MULLER, A.P.B. 2000. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana do estado de São Paulo: *Instituto de Ciências Biomédicas*, Universidade de São Paulo.

NASH, A. S.; MTAMBO, M. M. A.; GIBBS, H. A. 1993. *Cryptosporidium* infection in farm cats in the Glasgow area. *Veterinary Record*. 133:576-577.

NAUMOVA, E. N.; EGOROV, A. I.; MORRIS, R. D.; GRIFFITS, J. K.. 2003. The Elderly and Waterborne. *Cryptosporidium* Infection: Gastroenteritis Hospitalizations before and during the 1993 Milwaukee Outbreak. *Emerging Infectious Diseases*, 9(4): 418-425.

NEILL, M. A.; RICE, S. K.; AHMAD, N. V.; FLANIGAN, T. P. 1996. Cryptosporidiosis: an unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients. *Clin Infect Dis*, 22(1):168-70.

NEWMAN, R. D.; WUHHIB, T.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. 1993. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 49(2):270-5.

O'DONOGHUE, P. J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals *International Journal for Parasitology*, 25(2):139-195.

OLIVEIRA, C. A.; GERMANO, P. M.. 1992. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo–SP, Brasil – II- Pesquisa de protozoários intestinais. *Revista Saúde Pública*. 26(5): 332- 335.

OVERRALL, K. L. 1997. *Clinical behavioral medicine for small animals*. St. Louis Mosby.

PACHECO, M. S. R; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H. G. G.; CANDIDO, V. L. P.; GOMES, A. H. S.; ARMELIN, J. M.; BERNARDES, R. 2002. Condições higiênicos–sanitárias de verduras e legumes comercializadas no Ceagesp de Sorocaba–SP. *Higiene Alimentar*. 16(101):50-51.

PENNISI, E. 2002. Biologists chase down pooches' genetic and social past: a shaggy dog history, *Science*, 298:1540-1542.

PEREIRA, C. R. A.; FERREIRA, A. P.; KOIFMAN, R. J. 2008. Detecção de *Cryptosporidium parvum* em alfaces frescas para consumo cru. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. *Gaia Scientia*, 2(2):31-36.

RAMBOZZI, L.; MENZANO, A.; MANNELLI, A.; ROMANO, S.; ISAIA, M. C. 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cats in Turin and analysis of risk factors. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9:392-396.

REICHMANN, M. L. A. B.; PINTO, H. B. F.; NUNES, V. F. P. 1999. *Vacinação contra raiva de cães e gatos*. São Paulo: Instituto Pasteur (Manuais, 3).

REY, L. 2001. *Parasitologia*. 3ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

RIBEIRO, P. C.; PILE, E.; QUEIROZ, M. M. DE C.; NORBERG, A. N.; TENÓRIO, J. R. DE O. 2004. Cryptosporidiosis occurrence in HIV+ patients attended in a hospital, Brazil. *Revista Saúde Pública*, 38(3):469-470.

RIDASCREEN® 2008. *Cryptosporidium*. Alka Tecnologia Em Diagnósticos Com. Imp. e Exp. de Produtos Ltda. São Paulo.

RIGO, C. R.; FRANCO, R. M. B. 2002. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e Acid-Fast-Trichrome para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(3): 209-214.

ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonosis. *International Journal of Parasitology*, 30:1369-1377.

ROLIM, H. M. V.; TORRES, M. C. L. 1992. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em alface comercializada em Goiana-GO. *Anais da Escola de Agronomia e Veterinária*, 22(1):47-53.

ROY, S.L.; DELONG, S.M.; STENZEL, A.S.; 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. 2004. Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *J. Clin. Microbiol.*, 42(7):2944-2951.

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

SEIDL, E. M. F; ZANNON, C. M. L. C. 2004. Qualidade de vida e saúde: aspectos metodológicos e conceituais. *Cadernos de Saúde Pública*, 20:580-589.

SIMPSON, J. W.; BURNIE, A. G.; MILES, R. S.; SCOTT, J. L.; LINDSAY, D. I. 1988. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* infection in dogs from Edinburgh. *Vet Rec.*, 123(17):445.

SPANO, F., PUTIGNANI, L., CRISANTI, A., SALLICANDRO, P., MORGAN, U. M., LE BLANCQ, S. M., TCHACK, L., TZIPORI, S., WIDMER, G. 1998. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11):3255-3259.

STULL, J. W.; CARR, A. P.; CHOMEL, B. B.; BERGHAUS, R. D.; HIRD, D. W. 2007. Small animal deworming protocols, client education, and veterinarian perception of zoonotic parasites in western Canada. *Can. Vet. J.*, 48:269-276.

TANGERMANN, R.H., GORDON, S., WIESNER, P. & KRECKMAN, L. 1991. An outbreak of cryptosporidiosis in a day care center in Georgia. *Am. J. Epidemiol.*, 133:471.

TEUNIS, P. F. M.; HAVELAAR, A. H. 2002. Risk assessment for protozoan parasites. *Internat Biodegr Biodet*, 9:122-46.

TEUNIS, P. F. M.; CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C. 2002 *Cryptosporidium* Dose-Response Studies: Variation Between Hosts. *Risk Analysis*, 22(3):475-485.

TIZZER, E. E. 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. Et sp. Nov.) of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medicine Research*, 23:487-509.

TRINH, C.; PRABHAKAR, K. 2007. Diarrheal diseases in the elderly. *Clin Geriatr Med*, 23:833-856.

TZANNES, S.; BATCHELOR, D. J.; GRAHAM, P. A.; PINCHBECK, G. L.; WASTLING, J.; GERMAN, A. J. 2008. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Isospora* species infections in pets cats with clinical signs of gastrointestinal disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10:1-8.

TZIPORI, S. & CAMPBELL, I. 1981. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. *Journal of Clinical Microbiology*, 14:455-456.

TZIPORI, S. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol. Rev.* 47:84-86.

TZIPORI, S., SMITH, M., BIRCH, C., BARNES, G. & BISHOP, R. 1983. Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32:931-940.

TZIPORI, S.; RAND, W.; THEODOS, C. 1995. Evaluation of a two-phase scid mouse model preconditioned with anti-interferon- monoclonal antibody for drug testing against *Cryptosporidium parvum*. *J. Infect. Dis.* 172:1160-1164.

UK NATIONAL REFERENCE METHOD. 2006. *Cryptosporidium detection and identification in faeces Standard Operating Procedure – For the Examination of Faeces for Cryptosporidium*. Veterinary and Public Health Test Standardisation Group on behalf of SGDIA.

UNGAR, B. L. P. Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. L.. 1990. *Cryptosporidiosis of Man and Animal*. Boston: CRC Press, p. 59-82.

UNGAR, B. L. P.; GILMAN, R. H.; LANATA, C. F.; PEREZ-SCHAEL, I. 1988. Seroepidemiology of *Cryptosporidium* infection in two Latin American populations. *Journal of Infectious Diseases*. 157:551-556.

UNGAR, B. L. P.; MULLIGAN, M.; NUTMAN, T. R.. 1989. Serologic evidence of *Cryptosporidium* infection in US volunteers before and during Peace Corps service in Africa. *Archives of Internal Medicine*. 149:894-897.

USEPA. 1998a. United States Environmental Protection Agency. *National primary drinking water regulations: interim enhanced surface water treatment; final rule. Part V* (40 CFR, Parts 9, 141, and 142). Washington, DC, Federal Register, Rules and regulations, vol. 613 n. 241; Wednesday, December 16, p.69479-69521.

VICKERMAN, K. 1977. *Protozoology*. London: London School of Hygiene and Tropical Medicine, vol. 3.

WERNER, H.; KUNTSCHKE, J. 2000. Infection in the elderly-what is different? *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 33(5):350-356.

WHO. 1990. World Health Organization. *Guidelines for dog population management*. Geneva.

XIAO, L., MORGAN, U.M., LIMOR, J., ESCALANTE, A., ARROWOOD, M., SHULAW, W., THOMPSON, R. C., FAYER, R., LAL, A. A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(8):3386-3391.

ANEXO I

Questionário Projeto Crypto

Público Alvo: idosos acima de 60 anos L1/ _____

Nome: _____

Resid: _____

Bairro: _____ Tel: _____

Animal de Companhia - no. ___ can. [] no. ___ fel. []

Abrigo na casa - interno [] externo []

Quadro diarréico - sim [] não [] freq. _____ vezes

Aceitação projeto - sim [] não []

Recebimento frasco MIF - sim [] não []

Data retirada MIF ___ / ___ / 200_

.....

Nome: _____

Aceitação projeto: sim []

Data retirada MIF ___ / ___ / 200_

Contato: Cássia Regina Alves Pereira CRMV-RJ 4895 Tel. (21) 87204050

Instruções: usar a pá de coleta para coletar 3 amostras de fezes de dias diferentes (não é necessário que sejam 3 dias seguidos).**Importante:** misture bem com o líquido do frasco e mantenha na geladeira dentro do saco plástico.

ANEXO II

Avaliação Proprietário

Público Alvo: idosos acima de 60 anos L1 / _____

Nome: _____

Resid: _____

Bairro: _____ Tel: _____

.....

Sexo masc [] femin []**Idade:** _____**Fuma** sim [] não []**Estado Civil** Solteiro []União Qualquer []Viúvo []**Quadro diarréico nos últimos 12 meses**sim [] não [] freq. _____ vezes

Proprietário: _____

Animal: _____ Porte: _____

Espécie: _____ Idade: _____ Sexo: [] macho [] fêmea

Peso estimativo: [] até 1kg
 [] de 1-5 kg
 [] de 5-10 kg
 [] de 10-20 kg
 [] de 20-40 kg
 [] acima de 40 kg

Temperatura (retal): _____

Normal cão 38-39° / gato 38-39°

Frequência Respiratória: _____

Normal cão: 10-40/min. / gato: 20-30/min.

Pulsação: _____

Normal: 60-160 cães adultos / 180 raças anãs / 200-220 raças grandes / gato 110-130/min.

Tonicidade da Pele: [] < 5% não detectável à anamnese
 [] 5% perda sutil da elasticidade cutânea
 [] 6-8% retardo definido no retorno da pele à posição normal, os olhos podem se afundar nas órbitas, ligeiro prolongamento do tempo de preenchimento capilar, as membranas mucosas podem se ressecar.
 [] 10-12% a pele levantada permanece no lugar, prolongamento do tempo de preenchimento capilar, afundamento dos olhos nas órbitas, ressecamento das membranas mucosas, podem-se observar sinais de choque (aumento da frequência cardíaca e pulsos fracos)
 [] 12-15% sinais de choque, colapso e depressão severa; morte eminente.

Aspecto da matéria fecal: - frequência movimento intestinal à palpação:

[] normal [] aumentado

- volume de matéria fecal:

[] 1-3 vezes/dia [] mais que 3 vezes/dia
 (normal)

- textura:

[] firmes [] pastosas [] líquidas
 (normal)

- presença de muco:

[] SIM [] NÃO
 (normal)

- presença de sangue:

[] SIM [] NÃO
 (normal)

Alimentação: [] ração [] outra qual: _____

Água: [] filtrada [] clorada [] outra fonte qual? _____

Local que reside: [] dentro de casa [] fora de casa

ANEXO III



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
Comitê de Ética em Pesquisa



Rio de Janeiro, 01 de julho de 2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – CEP/ENSP, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo, discriminado:

PROTOCOLO DE PESQUISA CEP/ENSP - Nº 43/08
CAAE: 0061.0.031.000-08

Título do Projeto: “Avaliação da presença de *Cryptosporidium* sp. em animais domésticos de companhia numa população de idosos”

Classificação no Fluxograma: Grupo III

Pesquisador Responsável: Aldo Pacheco Ferreira

Instituição onde se realizará: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca-ENSP/Fiocruz

Tipo do projeto: Projeto Individual

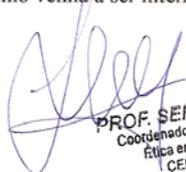
Data de recebimento no CEP-ENSP: 01 / 04 / 2008

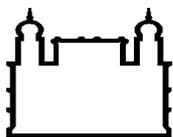
Data de apreciação: 07 / 05 / 2008

Parecer do CEP/ENSP: Aprovado.

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII.13.d., da resolução CNS/MS Nº 196/96*) de acordo com o modelo disponível na página do CEP/ENSP na internet.

Esclarecemos, que o CEP/ENSP deverá ser informado de quaisquer fatos relevantes (incluindo mudanças de método) que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador justificar caso o mesmo venha a ser interrompido.


PROF. SERGIO REGO
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa
CEPIENSP



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: “Avaliação da presença de *Cryptosporidium* sp. em animais domésticos de companhia numa população de idosos”.

Você foi selecionado por sorteio e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento.

Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Os objetivos deste estudo são determinar qual a prevalência de animais de companhia na população idosa participante das Campanhas Nacionais de Vacinação de Gripe no Município de Teresópolis – RJ, nos anos de 2007, 2008, 2009 e 2010; determinar a prevalência de *Cryptosporidium* spp. na população de animais de companhia dos idosos participantes do inquérito do Município de Teresópolis – RJ; estabelecer o perfil de distúrbios gastrointestinais entre os idosos da população em estudo; determinar a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em material fecal dos idosos em estudo; identificar as relações existentes entre a posse do animal de companhia e a indicação de problemas clínicos tais como hipertensão, depressão, etc., e determinar a associação entre diarreia em idosos e prevalência de *Cryptosporidium* spp. nos animais domésticos.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder as perguntas que serão feitas por meio de um questionário.

A realização desta pesquisa não implicará em riscos de qualquer natureza, uma vez que o material biológico coletado será de natureza fecal, em recipiente apropriado (MIF), diretamente realizado pelo pesquisador e a identidade dos entrevistados será preservada.

Os benefícios relacionados com a sua participação decorrerão da possibilidade de uma maior mobilização e envolvimento direto dos idosos na compreensão dos problemas existentes na posse de um animal de companhia e a necessidade de avaliação periódica do mesmo por um Médico Veterinário sobre suas condições de saúde.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação em todas as fases da pesquisa e nos relatórios a serem elaborados posteriormente.

A confidencialidade dos dados será garantida pela criação e análise dos dados em bancos protegidos por senhas eletrônicas. Além disso, nenhum dos entrevistados terá seu nome divulgado.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Aldo Pacheco Ferreira

CESTEH - Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana

Telefones para contato: (021) 25982814

Endereço: Avenida Leopoldo Bulhões, 1480 - CESTEH/ENSP/FIOCRUZ, sala 28– RJ.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Nome e assinatura do Entrevistado

IR.G. _____

COMITE DE ÉTICA DA ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA – FIOCRUZ (CEP/ENSP)

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - térreo

Manguinhos – RJ – CEP 21041-210

Tel: (021) 2598 2863

ARTIGO 1

Detecção de *Cryptosporidium parvum* em alfaces frescas para consumo cru. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil

Cassia R. A. PEREIRA¹
Aldo P. FERREIRA²
Rosalina J. KOIFMAN³

Resumo

A criptosporidiose humana surgiu como importante infecção gastrointestinal como resultado da ingestão de vegetais *in natura* ou contato de pessoa a pessoa, ambos contaminados pelo *Cryptosporidium parvum*. Este patógeno tem especial significado clínico por causar um quadro diarréico profuso, em pessoas imunodeprimidas, incluindo pacientes com AIDS e pacientes com câncer que recebem quimioterápicos sob regimes tóxicos medicamentosos. O emprego de água contaminada, não potável, para a produção de hortaliças, especialmente alface, pode representar importante fonte potencial de sua presença. Este artigo analisou a incidência de *C. parvum* em alface frescas para consumo cru, através de estudo de caso em Teresópolis, RJ, Brasil. Conclui-se que a ingestão de hortaliças contaminadas por estruturas parasitárias é uma via importante de transmissão de enteroparasitoses, necessitando a adoção de medidas, por parte dos órgãos de vigilância sanitária, que resultem em uma melhoria da qualidade higiênica desses produtos.

PALAVRAS-CHAVE: Alface, *Cryptosporidium parvum*, água

Abstract

DETECTION OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* IN FRESH LETTUCE FOR RAW CONSUMPTION. CASE STUDY: TERESÓPOLIS, RIO DE JANEIRO, BRAZIL Human cryptosporidiosis has emerged as an important gastrointestinal infection which results from the ingestion of vegetables in nature or by person to person contact, both contaminated by *Cryptosporidium parvum*. This pathogen has special clinical significance for causing a profuse diarrheic spectrum in immunocompromised persons, including AIDS patients and cancer patients receiving toxic chemotherapy under drug regimens. Employment of non-drinkable, contaminated, water, in the production of vegetables, particularly lettuce, may represent an important potential source for the presence of this pathogen. This article analyzed the incidence of *C. parvum* in raw lettuce, by means of a case study in Teresópolis, RJ, Brazil. It was concluded that the intake of vegetables contaminated by parasitic structures is an important route of transmission of enteric diseases, requiring the adoption of health measures by professional monitoring boards, which will result in an improvement of the hygienic quality of these products.

KEY WORDS: Human cryptosporidiosis; public health; *Cryptosporidium parvum*; contaminated water and vegetables.

Introdução

O parasitismo é uma relação direta e estreita entre dois organismos, geralmente bem determinado: o hospedeiro e o parasita, que levam a produção de doenças parasitárias, as quais As parasitoses são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade em todo o mundo e, freqüentemente, estão presentes com sinais e sintomas não específicos (Costa et al., 2001). As águas

destinadas à irrigação de hortaliças são fontes originais de contaminação quando comportam grande quantidade de microrganismos como coliformes fecais, *Aeromonas*, *Salmonelas* e *Cryptosporidium* spp. (Pacheco et al., 2002; Heller et al., 2004; Ferreira et al., 2008).

A necessidade de proteção e tratamento adequado da água de consumo humano relaciona-se, diretamente, com

1 SPMA/ENSP/FIOCRUZ – e-mail: cassiaapereira@ensp.fiocruz.br

Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente (doutoranda), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz - Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - 21041-210 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil.

2 CESTE/ENSP/FIOCRUZ – e-mail: aldoferreira@ensp.fiocruz.br

Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz - Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - 21041-210 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil.

3 DEMQS/ENSP/FIOCRUZ – e-mail: jorger@ensp.fiocruz.br

Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz - Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - 21041-210 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil.

os diferentes surtos epidêmicos onde microrganismos acometem a população por via hídrica. Recentemente, vários patógenos novos e patógenos emergentes têm evidenciado problemas. Dentre outros, ressalta o *Cryptosporidium parvum* que foi primeiramente descrito em 1907, reconhecido como patógeno animal em 1955, mas somente a partir da década de 80, caracterizado como patógeno humano (Szewzik et al., 2000). O *C. parvum* pertence ao reino *Apicomplexa*, classe *Sporozoa* e a família *Cryptosporidiidae*. É um ser parasito coccídeo entérico obrigatório, que infecta o trato gastrintestinal, sendo um dos patógenos entéricos mais importantes dentro do gênero *Cryptosporidium*.

A veiculação hídrica do *Cryptosporidium* é facilitada pelo longo período que o oocisto permanece viável no ambiente e pelo tamanho reduzido (2-5 µm). Hospedeiros infectados eliminam pelas fezes em torno de 10^9 a 10^{10} oocistos (Smith & Rose, 1998), que podem ser transmitidos pelas rotas indivíduo-indivíduo, animal-indivíduo, ou ainda pela ingestão de água e alimentos contaminados. Os oocistos de *Cryptosporidium* são altamente infectantes e a ingestão de até 30 oocistos podem resultar em infecções humanas (Dupont et al., 1995).

A criptosporidiose é caracterizada através de diarreia severa acompanhada por perda fluida, febre e dor abdominal. A transmissão ocorre pela rota fecal-oral por contaminação de nascentes, contaminação de alimentos *in natura* ou contato de pessoa-a-pessoa. Animais, como gado, podem eliminar um número grande de oocistos (a fase do ciclo de vida que é excretado no ambiente) em águas superficiais. Indivíduos imunodeprimidos como, por exemplo, aqueles com síndrome de imunodeficiência adquirida são facilmente acometidos por este patógeno (Harwood, 2001; Heller et al., 2004).

No Brasil, as parasitoses intestinais ainda constituem um sério problema de saúde coletiva, apresentando maior prevalência em populações de nível sócio-econômico mais baixo e condições precárias de saneamento básico, resultando em altos índices de morbidade. Em crianças, principalmente com idades entre 0 e 5 anos, por apresentarem, normalmente, hábitos higiênicos mais precários ou a ausência de imunidade de re-infecções, o parasitismo intestinal torna-se mais freqüente e relevante, inclusive pela possibilidade de redução da absorção intestinal, podendo influenciar no crescimento e desenvolvimento, podendo levando a diminuição da imunidade, anemia, subnutrição, desnutrição e até a morte (Uchoa et al., 2001; Heller et al., 2004).

Com base nos estudos desenvolvidos nos anos 90 ficou estabelecido que o *Cryptosporidium* spp. não é espécie-específico e que linhagens de uma espécie animal podem infectar um amplo espectro de outras espécies. Linhagens isoladas do homem, de bezerras, cordeiros, cabritos e cervos foram transmitidos por via oral a cordeiros, bezerras

e leitões, nos quais causaram diarreia. Potros, frangos e animais de laboratório contaminados produziram infecção assintomática (Uchoa et al., 2001). Esse resultado indica que os hospedeiros e reservatórios são múltiplos na natureza e que uma espécie animal pode contrair a infecção de outra (Acha & Szyfres, 1997; Silva et al., 2005).

Os vegetais são amplamente recomendados como parte da alimentação diária por seu apreciável conteúdo em vitaminas, sais minerais e fibras alimentares. Tem crescido o interesse, principalmente, por aqueles que apresentam em sua composição substâncias com atividade antioxidante, a exemplo dos carotenóides, vitamina C e flavonóides, que os caracterizam como alimentos funcionais. As doenças transmitidas por alimentos são resultantes predominantemente do ciclo de contaminação fecal / oral e seu controle tem recebido cada vez maior atenção em todo o mundo (Souto, 2005). Geralmente, tanto nas áreas rurais quanto urbanas dos países de Terceiro Mundo devido às más condições sanitárias, as parasitoses intestinais são amplamente difundidas, sendo as hortaliças citadas como um dos veículos de suas estruturas infectantes (Rolim & Torres, 1992; Slifko et al., 2000; Nóbrega, 2002; Souto, 2005).

A alface (*Lactuca sativa*) é a hortaliça folhosa mais comercializada no Brasil, seu baixo valor calórico a qualifica para diversas dietas, o que favorece o seu consumo sob a forma crua. É cultivada durante o ano inteiro, em canteiros de terra, de maneira que as touceiras ou pés permanecem por todo o período de desenvolvimento em contato com o solo (Filgueira, 2000; Falavigna et al., 2005).

A principal forma de contaminação das hortaliças se dá pela água contaminada por material fecal de origem humana, utilizada na irrigação das hortas. Vários autores mencionam a possibilidade de transmissão de parasitoses ao homem por meio da ingestão de frutas e verduras consumidas cruas, provenientes de áreas cultivadas contaminadas por dejetos fecais (Silva et al., 1995; Mesquita et al., 1999; Takayanagui et al., 2000; Souto, 2005).

Sob os aspectos qualitativos, a segurança alimentar pode ser entendida como a aquisição pelo consumidor de alimento de boa qualidade livre de contaminantes químicos, biológicos e físicos, ou qualquer substância que possa acarretar problemas à saúde (Silva et al., 2005). Nesse aspecto, enquadra-se a importância sanitária da pesquisa do *Cryptosporidium* spp. em hortaliças como a alface.

Padrões Sanitários

A importância do estudo sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático foi reforçada pelas citações da portaria nº 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (Brasil, 2004), que recomenda a inclusão da pesquisa deste patógeno para se atingir o

padrão de potabilidade da água. Atualmente, recomenda-se, mundialmente, o monitoramento de *Cryptosporidium* em sistema de água potável que abastecem cidades entre 10.000 e 100.000 habitantes (Franco et al., 2001).

Como um patógeno em evidência, o *C. parvum* possui implicações significativas à vigilância sanitária (saúde pública e água). Tem sido encontrado em fonte de águas não tratadas, causando substanciais surtos de graves doenças, onde testes de água e métodos de tratamento foram falhos para detectá-los ou removê-los. Dados mais recentes sugerem que mesmo doses baixas (cerca de 10 oocistos) podem causar infecção (Gostin et al., 2000; Heller et al., 2004).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que infecções por *C. parvum* são mais comuns e amplas que previamente se pensava, entretanto, muitos casos registrados têm sido limitados a hospedeiros individuais sofrendo severa doença clínica (Heller et al., 2004; Falavigna et al., 2005; Silva et al., 2005). Embora a verdadeira extensão de infecções por *Cryptosporidium* spp. permaneça conjectural, a importância como patógenos animais e humanos tem se tornado mais reconhecida através do número crescente e diversificado de casos clínicos registrados através do mundo (Cook et al., 2006).

Água de Cultivo

A água é essencial à vida, porém muitas vezes atua como veículo de doenças ao homem, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica antes de ser utilizada, com largo espectro de uso, com destaque na irrigação (Uchoa et al., 2001; Nóbrega, 2002).

Geralmente, a água utilizada na irrigação é proveniente de rios, córregos, lagos ou poços adjacentes às hortas, sendo raramente encontrada a utilização de água de abastecimento público, devido principalmente ao seu alto custo, uma vez que a demanda exigida para este propósito é bastante elevada. Portanto, a água destinada a irrigação é transportada através de bombas ou canais desde o rio e riacho até as hortas, sem qualquer tratamento prévio, podendo vir a ser uma fonte potencial de enteropatógenos para o vegetal que será irrigado (Oliveira & Germano, 1992; Nóbrega, 2002). Frequentemente se observa a disposição inadequada de esgotos domésticos, como também a deficiência de saneamento básico em alguns locais, contribuindo efetivamente para a contaminação das coleções hídricas, inclusive dos lençóis freáticos, por matéria orgânica (Talayanagui et al., 1996; Guimarães et al., 2003).

Entretanto, alimentos que estão em contato direto com águas contaminadas e são consumidos crus constituem fontes prováveis desses microrganismos e merecem especial atenção, principalmente nos países em desenvolvimento,

onde o estado nutricional da população é precário, interferindo diretamente nas condições imunológicas dos indivíduos. Crianças, imunodeprimidos e debilitados são considerados grupos susceptíveis, favorecendo o aparecimento dessas enfermidades (Mesquita et al., 1999; Pacheco et al., 2002).

No meio rural, o risco de ocorrência de surtos de doenças veiculadas pela água é bastante alto, principalmente em função da possibilidade de contaminação bacteriana de águas que muitas vezes são captadas em poços, inadequadamente vedados e próximos de fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais (Guimarães et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar parasitologicamente a qualidade de hortaliças consumidas cruas provenientes de locais de produção e comercializadas no município de Teresópolis, Rio de Janeiro.

Metodologia

Local de Estudo

O município de Teresópolis foi criado em 06 de julho de 1891 e faz parte da Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro estando distante da capital 90 km. Apresenta os seguintes municípios como limítrofes: Petrópolis, São José do Rio Preto, Sumidouro, Nova Friburgo, Cachoeiras de Macacu e Guapimirim, e corresponde a 11,1% da área da Região Serrana. Ocupa uma área de 772,4 km² e tem altitude da sede de 871 m. Suas coordenadas variam de: 22° 06' 52" a 22° 28' 38" de latitude e 42° 42' 17" a 43° 03' 19" de longitude.

De acordo com o Censo Demográfico do IBGE (2000), o Município de Teresópolis apresenta um total de 138.081 habitantes com 115.198 (83,5%) habitantes na zona urbana e 22.883 (16,5%) habitantes na zona rural, apresentando uma densidade demográfica de 158,7 hab/km² e taxa de urbanização de 83,9%.

Esse município é servido por duas estradas federais, a BR-116, que acessam Guapimirim ao sul e São José do Vale do Rio Preto ao norte, e a BR-495, estrada serrana que alcança Petrópolis, a oeste. A rodovia estadual RJ-130 acessa Nova Friburgo, a leste sendo denominada Circuito "Terê-Fri" pelo clima favorável à exploração turística dos recursos naturais e pelo pólo agrícola de importante aporte no Estado do Rio de Janeiro.

Segundo dados do Tribunal de Contas do Estado do Rio de Janeiro (2004) no setor primário, a horticultura (alface, couve-flor, tomate, repolho, salsa, entre outros) é responsável por 81% da produção agrícola do município, o qual é o principal produtor dessa cultura no Estado.

Preparo e coleta de amostras

Foram utilizadas 50 amostras de alface lisa (*Lactuca sativa*), coletadas em três locais distintos, entre os meses de março a setembro de 2007, perfazendo 15 do primeiro produtor, 15 do segundo produtor e 20 do terceiro produtor. As hortaliças foram coletadas aleatoriamente, no período da manhã, e foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos limpos e descartáveis. Cada amostra foi representada por 100g de cada hortaliça. No laboratório, utilizando luvas cirúrgicas, as folhas deterioradas foram descartadas. As demais folhas foram selecionadas em dois grupos: um contendo as folhas da base e outro as do meio do pé.

Todas as folhas foram submetidas à lavagem pela técnica de lavagem descrita por Silva et al. (2005), sendo lavadas com 450ml de solução salina (NaCl 0.85%), esfregando-se com pincel chato nº 16 num recipiente plástico esterilizado e deixadas em repouso por 5 minutos, sendo, então a solução de lavagem submetida à pesquisa de *C. parvum*.

Deteção de *C. parvum*

A detecção de *C. parvum* foi realizada conforme o método de coloração de Ziehl-Nielsen Modificado (UK National Reference Method, 2006) onde os dados obtidos sugerem a necessidade da adoção de medidas educativas aos produtores e do monitoramento da forma de cultivo dessas hortaliças, evitando-se problemas de saúde coletiva.

Um volume de 50 ml da solução de lavagem foi submetido à centrifugação a 900 RPM por 30 minutos (Silva et al., 2005). Para confecção dos esfregaços foi utilizado um volume de 20 ml do sedimento coletado após centrifugação, em triplicata, num total de 60 ml por amostra. Através de sucção com pipeta automática os sedimentos foram medidos tendo em média 0,25 ml de sedimento final por amostra e feito esfregaço em lâminas limpas e desengorduras.

Para a coloração dos esfregaços foi utilizada a técnica de Ziehl-Nielsen Modificado (Rigo & Franco, 2002; UK National Reference Method, 2006). Utilizando o concentrado obtido, fez-se um esfregaço delgado e homogêneo em lâminas de microscopia. Após isso, foi deixado secar ao ar e posteriormente fixado em metanol por 5 minutos, deixando secar a temperatura ambiente. A seguir, foi corado com carbolfucsina por 5 minutos e processadas as lavagens, utilizando primeiramente álcool etílico a 50% e depois água corrente. Descorar a lâmina mergulhando-a em álcool-ácido a 1% (ácido clorídrico concentrado em álcool etílico 95%). Lavar novamente em água corrente e contracorar com azul de metileno por 1 a 5 minutos. Lavar em água corrente e deixar as lâminas secarem ao ar. Para o

cálculo do número total de oocistos na amostra utilizou-se a metodologia de Oliveira & Germano (1992).

Resultados

Das 50 amostras de alface, os 50 esfregaços obtidos das folhas provenientes da base do pé apresentaram 100% de presença de oocistos. Das demais 50 amostras provenientes das folhas do meio das alfaces, 38% apresentaram presença de oocistos (Tabela 1).

Oocistos <i>Cryptosporidium parvum</i>	Positivas		Negativas	
	F	%	F	%
Nas folhas da base	50	100,0	0	0,0
Nas folhas do meio	19	38,0	31	62,0

Tabela 1. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em 50 amostras de alfaces lisas (*Lactuca sativa*) coletadas no município de Teresópolis, RJ. Manguinhos, FIOCRUZ, 2007.

Legenda

F= frequência

A Figura 1 denota oocistos presentes nas amostras pesquisadas. A leitura e contagem dos oocistos foram realizadas utilizando-se microscopia óptica, com objetiva de imersão, percorrendo-se todo o esfregaço.

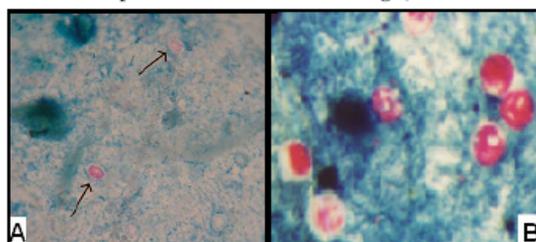


Figura 1. Oocistos de *C. parvum* nas amostras positivas analisadas (aumento 1000x).

Discussão

O estudo investigativo de parasitas intestinais tem por objetivo determinar as principais doenças e seus respectivos agentes etiológicos que se encontram distribuídos por todo o mundo, de forma endêmica ou epidêmica, observando as áreas de maior incidência ou prevalência e os fatores que favorecem a proliferação dessas parasitoses, para que possam ser diagnosticadas e utilizados programas de controle e de tratamento.

Essa pesquisa comprovou 100% de contaminação nas folhas da base dos pés de alface, provavelmente devido ao contato estreito de tal parte do vegetal com o solo que pode abrigar água contaminada e fezes de animais de sangue quente (Acha & Szyfres, 1997; Gostin et al., 2000).

A presença dos oocistos em 38% das folhas do meio do pé de alface demonstrou uma forma de contaminação, talvez, relacionada à água contaminada, uma vez que em seu habitat natural a alface apresenta uma formação folhosa densa e fechada ao miolo (Rolim & Torres, 1992), havendo apenas a suposição de que a água de irrigação, sem controle prévio pode ser potencial fonte de surto de doenças (Gostin et al., 2000; Pacheco et al., 2002).

Outro fator importante a ressaltar, e que explicaria os resultados encontrados, é o fato de no Brasil se utilizar estrume (fezes de animais) como fertilizantes para hortaliças, que é uma fonte de contaminação, bem como a água que irriga essas plantações, muitas vezes são oriundas de rios ou nascentes contaminadas, possibilitando a chegada à mesa do consumidor alimentos contaminados (Pacheco et al., 2002).

As doenças causadas por parasitos intestinais não têm sido prioritárias em programas de saúde pública. Algumas explicações para a falta de interesse das autoridades podem ser a carência de estudos epidemiológicos em várias regiões do país, assim como as altas taxas de reinfecção e a rapidez com que ocorrem após o tratamento.

É interessante enfatizar que verminose não é somente um problema que afeta crianças de baixa renda, mas ocorre em todo o país. Para mudar este quadro é necessário que haja transformação nas condutas de higiene, e se deve propor medidas sanitárias mais sérias tanto no saneamento básico, mais também no refinamento e controle sanitário de restaurantes, bares, lanchonetes, escolas, agricultura e tudo que se relacione à veiculação de água em alimentos.

Conclusões

Esta pesquisa, embora tenha utilizado pequena amostragem de hortaliças, revela que elas podem estar sendo cultivadas em solos poluídos, ou que a água de irrigação utilizada esteja contaminada com material fecal, ou ainda, que no cultivo desses vegetais esteja sendo utilizado adubo animal (suíno, bovino), que podem carrear ovos e larvas de helmintos, bem como cistos de protozoários, podendo causar enteroparasitoses.

Fator importante na mitigação do problema pode ser a implantação de políticas sanitárias aliadas ao tratamento das pessoas infectadas, bem como o fomento a programas educacionais junto às populações do meio rural para conscientização desse problema de caráter coletivo já que muitos casos são assintomáticos, não existe tratamento efetivo e pode ser fatal em indivíduos imunocomprometidos.

Conclui-se que a ingestão de hortaliças contaminadas por estruturas parasitárias é uma via importante de transmissão de enteroparasitoses, necessitando a adoção de medidas, por parte dos órgãos de vigilância sanitária,

que resultem em uma melhoria da qualidade higiênica desses produtos. Adicionalmente, torna-se importante o uso de instalação de fossas sépticas e redes de esgoto para impedir que o solo venha a se contaminado, bem como da água para irrigação.

Referências

- ACHA, P.N. & SZYFRES, B. 1997. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed., Washington: Organización Panamericana de La Salud – Publicación Científica n. 503.
- BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. O Ministério da Saúde aprova normas e padrões de potabilidade da água destinada ao consumo humano. Diário Oficial, Brasília, 26 mar., Seção 1, p.266-70.
- COOK, N.; PATON, C.A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R.A.B.; BARKER, K. & SMITH, H.V. 2006. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. International Journal of Food Microbiology 109: 215–221.
- COSTA, M.C.; PATRICK, A.; RUBINA, A.; OLIVEIRA, A.S.; PANGARO, C.; MOITINHO, C.; MENDONÇA, D.; VIEIRA, F.; JOSÉ, F. & WILSON, P. 2001. Doenças parasitárias. Parasitology 128: 113-116.
- DUPONT, H.L.; CHAPPEL, C.L.; STERLING, C.R.; OKHUYSEN, P.C., ROSE, J.B. & JAKUBOWSKI, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. New England Journal of Medicine 332: 855-859.
- FALAVIGNA, L.M.; RODRIGUES DE FREITAS, C.B. & CARDOSO DE MELO, G. 2005. Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. Parasitologia Latinoamericana 60(3-4): 144-149.
- FERREIRA, A.P.; CUNHA, C.L.N. & ROQUE, O.C.C. 2008. Avaliação da microfauna no efluente final para monitoramento da qualidade ambiental em estações de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados. Gaia Scientia 1(2): 51-59.
- FILGUEIRA, F.A.R. 2000. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV.
- FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; NETO, R.C. 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 43(2): 109-111.

- GOSTIN, L.O.; LAZZARINI, Z.; NESLUND, V.S. & OSTERHOLM, M.T. 2000. Water quality laws and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens. *American Journal of Public Health* 90(6): 847-53.
- GUIMARÃES, A.M.; ALVES, E.G.L.; FIGUEIREDO, H.C.P.; COSTA, G.M. & RODRIGUES, L.S. 2003. Frequência de enteroparasitas em amostra de alface (*Lactuca sativa*) comercializada em Lavras, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(5): 621-623.
- HARWOOD, V.J. 2001. Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens. *Water Environment Research* 73(5):155-167.
- HELLER, L.; BASTOS, R. K. X. & VIEIRA, M. B. C. M. 2004. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidemiologia dos Serviços de Saúde* 13(2): 79-92.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2000. Projeto Teresópolis. Hydrology and elevation Teresópolis (Map). Scale Layer: 1:50.000. 4d ed., DAMTD. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>> Acessado em 01/04/2008.
- MESQUITA, V.C.L.; SERRA, C.M.B.; BASTOS, O.M.P. & UCHOA, C.M.A. 1999. Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32(4): 363-366.
- NÓBREGA, M.F.F. 2002. Perfil sócio-demográfico dos vendedores de hortaliças e prevalência de entoparasitas humanos em *Lactuca sativa*. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 108f.
- OLIVEIRA, C.A. & GERMANO, P.M. 1992. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo-SP, Brasil - II- Pesquisa de protozoários intestinais. *Revista Saúde Pública* 26(5): 332- 335.
- PACHECO, M.S.R.; FONSECA, Y.S.K.; DIAS, H.G.G.; CANDIDO, V.L.P.; GOMES, A.H.S.; ARMELIN, J.M. & BERNARDES, R. 2002. Condições higiênicas-sanitárias de verduras e legumes comercializadas no Ceagesp de Sorocaba-SP. *Higiene Alimentar* 16(101): 50-51.
- RIGO, C.R. & FRANCO, R.M.B. 2002. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e Acid-Fast-Trichrome para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(3): 209-214.
- ROLIM, H.M.V. & TORRES, M.C.L. 1992. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em alface comercializada em Goiana-GO. *Anais da Escola de Agronomia e Veterinária* 22(1): 47-53.
- SMITH, H.V. & ROSE, J.B., 1998. Waterborne Cryptosporidiosis: Current Status. *Parasitol. Today*, 14:14-22.
- SILVA, C.G.M.; ANDRADE, S.A.C. & STAMFORD, T.L.M. 2005. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas in natura no Recife. *Ciência & Saúde Coletiva* 10: 63-69.
- SLIFKO, T.R.; SMITH, H.V. & ROSE, J.B. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal of Parasitology* 30: 1389-1393.
- SOUTO, R.A.D. 2005. Avaliação sanitária das águas de irrigação e de alfices (*Lactuca sativa*) produzidas no município de Lagoa Seca, Paraíba. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, 58f.
- SZEWZYK, U.; SZEWZYK, R.; MANZ, W. & SCHLEIFER, K.H., 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annual Review Microbiology* 54: 81-127.
- TAKAYANAGUI, O. M.; FEBRÔNIO, L.H.P.; BERGAMINI, A.M.; OKINO, M.H.T.; SILVA, A.A.M.C.C.E. & SANTIAGO, R. 2000. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(2): 169-174.
- TRIBUNAL DE CONTAS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. 2004. Estudo Socioeconômico 2004 - Teresópolis. Secretaria Geral de Planejamento do Rio de Janeiro.
- UCHÔA, C.M.A.; LOBO, A.G.B.; BASTOS, O.M.P. & MATOS, A.D. 2001. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro-Brasil. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 60(2): 97-101.
- UK NATIONAL REFERENCE METHOD. 2006. *Cryptosporidium* detection and identification in faeces Standard Operating Procedure - For the Examination of Faeces for *Cryptosporidium*. Veterinary and Public Health Test Standardisation Group on behalf of SGDA.

Artigo recebido:24/05/2008

Artigo aceito: 7/7/2008

ARTIGO 2

**OCORRÊNCIA DE ENTEROPROTOZOÁRIOS EM ÁGUAS DE IRRIGAÇÃO
DE ESTABELECIMENTOS PRODUTORES DE HORTALIÇAS. ESTUDO DE
CASO: TERESÓPOLIS, RJ**

Cássia Regina Alves Pereira¹, Aldo Pacheco Ferreira², Marco Aurélio Pereira Horta¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

² Cesteh/Ensp/Fiocruz

Endereço para correspondência: Cássia Regina Alves Pereira. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz - Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - 21041-210, Manguinhos – Rio de Janeiro – Brasil, cassiaapereira@ensp.fiocruz.br

RESUMO

Foi detectado *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. nas águas destinadas a irrigação utilizadas em 10 estabelecimentos produtores de hortaliças do município de Teresópolis, RJ. O período de pesquisa deu-se de maio a dezembro de 2010. Para o isolamento de *Cryptosporidium* spp. utilizou-se o método de concentração de oocistos por centrifugação em membrana filtrante. Para determinação da presença/ausência de oocistos e cistos utilizou-se a imunofluorescência direta (IFD). Os coliformes totais (CT) e termotolerantes (CTT) foram avaliados de acordo com a Portaria nº 518. A IFD proporcionou confirmação de 23,82% de amostras positivas de *Cryptosporidium* spp. no período chuvoso e de 41,44% no de seca; e confirmação de 21,63% de amostras positivas de *Giardia* spp. no período chuvoso e 45,33% no de seca. No período chuvoso a média de CT foi de 37,6 NMP/100ml e de CTT 17,8 NMP/100ml. Para o período seco a média de CT foi de 45,5 NMP/100ml e de CTT 19,9 NMP/100ml. Urge a implementação de ações sanitárias nos estabelecimentos agrícolas produtores de hortaliças e do município de Teresópolis, para que tenha a garantia de que a água de irrigação não contamine os alimentos, nem ofereça riscos à saúde da população.

DESCRITORES: *Cryptosporidium*, *Giardia*, saneamento ambiental, saúde pública

INTRODUÇÃO

A água doce é um recurso natural finito, cuja qualidade vem decaindo devido ao aumento da população e à deficiência de políticas públicas voltadas para a sua preservação. Parasitoses intestinais ainda representam agravo importante à saúde humana, não obstante a melhoria das condições gerais de vida em muitas regiões do mundo (34). Estima-se que aproximadamente doze milhões de pessoas morrem anualmente por problemas relacionados com a qualidade da água no planeta (16). No Brasil, esse problema não é diferente, uma vez que os registros do Sistema Único de Saúde (SUS) mostram que 80% das internações hospitalares do país são devidas a doenças de veiculação hídrica, ou seja, doenças que ocorrem devido à qualidade imprópria da água para consumo humano (9).

Diversos fatores influem no sentido de que exista elevada prevalência de parasitoses intestinais nos países em desenvolvimento, mas saneamento básico deficiente e inadequadas condições ambientais nas quais vivem inúmeras pessoas constituem, sem dúvida, os mais proeminentes (24,32). O aumento da demanda por recursos naturais eleva a probabilidade de encontrar os ambientes e os produtos contaminados com microrganismos patogênicos. A rota de transmissão ambiental para protozoários e helmintos é particularmente significativa e envolve a água, o solo e o alimento (15), representando grande potencial de contaminação ambiental, devido à habilidade dos mesmos em sobreviver em regiões úmidas por períodos de tempo prolongados, sendo conseqüentemente uma ameaça persistente à saúde pública (11).

A contaminação fecal do ambiente aquático se origina das descargas do esgoto público ou doméstico, como também da liberação direta do material fecal na água de superfície por animais domésticos ou selvagens. Os enteroparasitas também aderem às 25 partículas do solo e são arrastados para água, onde sobrevivem e movem-se em toda sua superfície, principalmente em condições de tempo excepcionais tais como chuvas pesadas e inundações carreando o esgoto e ou solo contaminado, aumentando a carga fecal na água de superfície dos lagos e dos rios, prejudicando a qualidade da água dos mananciais (1). Dessa forma, acrescentou-se à saúde pública a preocupação quanto à ocorrência de protozoários patogênicos tais como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., em resposta ao crescente número de surtos (6), potencializado pela queda nos índices de prevalência sem que ocorra diminuição no número total de casos em razão do aumento vegetativo da população (5).

A cadeia de transmissão das enteroparasitoses sofre profunda influência das condições de higiene ambiental, refletindo diretamente nas condições sanitárias em que

vive o homem. O indivíduo parasitado, por meio de seus dejetos, contamina seu próprio ambiente com ovos, cistos e larvas de parasitos intestinais, e a água pode acumulá-los e transportá-los a grandes distâncias (1,15).

A criptosporidiose é uma infecção causada por um protozoário coccídeo, reconhecido como patógeno animal (4). Esse parasito atinge as células epiteliais das vias gastrointestinais, biliares e respiratórias do homem, de diversos animais vertebrados e grandes mamíferos, sendo responsável por diarreia esporádica em todas as idades, diarreia aguda em crianças e a diarreia dos viajantes. Em indivíduos imunocompetentes, esse quadro é auto-limitado, entre 1 e 20 dias, com duração média de 10 dias, evoluindo para cura (20).

Giardia spp. é um protozoário flagelar, causador de gastroenterites em humanos, com aspectos clínicos diversos, podendo apresentar infecções assintomáticas ou até quadros severos de diarreia persistente. Os cistos de *Giardia* spp., são ingeridos através de água ou alimentos contaminados, sendo esse protozoário comumente identificado como o patógeno mais envolvido em surtos de doenças de veiculação hídrica nos Estados Unidos, contudo é um organismo endêmico em toda parte do mundo, tendo a prevalência mais elevada em países tropicais e subtropicais (7).

A ocorrência de infecção causada por *Giardia* spp. é freqüente, particularmente entre crianças em idade pré-escolar. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que houvesse 200 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, em 1996. Cantusio e colaboradores (8) estimaram que a prevalência da infecção por *Giardia* spp. varia de 2 a 5% em países desenvolvidos e de 20 a 30% em países em desenvolvimento.

A maioria das infecções por *Giardia* spp. é assintomática e ocorre tanto em adultos quanto em crianças, que muitas vezes podem eliminar cistos nas fezes por um período de até seis meses (21). Nos casos sintomáticos, as manifestações podem incluir diarreia líquida e volumosa; dor abdominal; náusea; vômitos; flatulência; presença de febre baixa ou sem febre; perda ponderal importante devido a uma síndrome desabsortiva; períodos de diarreia alternados com períodos de constipação intestinal e evacuações normais (23).

Vários estudos também demonstram a preocupação em incluir na investigação diagnóstica dos quadros diarreicos em crianças a detecção de *Cryptosporidium* spp, com o objetivo de melhor elucidar o agente etiológico envolvido (7,16). A criptosporidiose tem sido relatada em todas as partes do mundo com uma prevalência de 1,9 a 19% dos casos em crianças diarreicas (21). No Brasil a prevalência esperada para crianças fica

entre 0,5 a 21,3% (26). Na **tabela 1** verifica-se um resumo de ocorrências relatadas na literatura.

Tabela 1: Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. no ambiente aquático do Brasil no período de 1993 a 2006

O gênero predominante entre os coliformes termotolerantes é a *Escherichia coli*, cujo hábitat exclusivo é o trato intestinal de animais homeotérmicos, equivalendo a 98% da flora intestinal (2). Porém, algumas espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* também são consideradas termotolerantes. A *Escherichia coli* é a única bactéria do grupo coliformes fecais de origem exclusivamente fecal, encontrada somente em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente (10).

No município de Teresópolis-RJ, a região denominada “Circuito Tere-Fri” localizada na rodovia RJ-130, possui grande potencial agrícola e é a principal fonte de abastecimento de hortaliças para o estado do Rio de Janeiro. O importante papel de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em vários surtos epidêmicos de veiculação hídrica e alimentar coloca em evidência as hortaliças que, por serem ingeridas cruas, favorecem a aquisição destas parasitoses (30). No Brasil, são escassos os dados sobre a ocorrência destes protozoários em vegetais como alface e rúcula, alimentos frescos amplamente consumidos pela população.

O propósito deste estudo foi investigar a ocorrência destes parasitos em águas de irrigação de estabelecimentos produtores de hortaliças da região de Teresópolis-Friburgo, RJ, no período de maio a dezembro de 2010.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho verificou a presença dos enteroprotazoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., em águas destinadas a irrigação em 10 estabelecimentos produtores de hortaliças da RJ-130.

Local de Estudo

O município de Teresópolis foi criado em 6 de julho de 1891 e faz parte da Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro estando distante da capital 90 km.

Apresenta os seguintes municípios como limítrofes: Petrópolis, São José do Rio Preto, Sumidouro, Nova Friburgo, Cachoeiras de Macacu e Guapimirim, e corresponde a 11,1% da área da Região Serrana. Ocupa uma área de 772,4 km² e tem altitude de 871 m. Suas coordenadas variam de: 22° 06' 52" a 22° 28' 38" de latitude e 42° 42' 17" a 43° 03' 19" de longitude.

De acordo com o Censo Demográfico do IBGE de 2000 (22), o Município de Teresópolis apresenta um total de 138.081 habitantes com 115.198 (83,5%) habitantes na zona urbana e 22.883 (16,5%) habitantes na zona rural, apresentando uma densidade demográfica de 158,7 hab/km² e taxa de urbanização de 83,9%.

Esse município é servido por duas estradas federais, a BR-116, que acessam Guapimirim ao sul e São José do Vale do Rio Preto ao norte, e a BR-495, estrada serrana que alcança Petrópolis, a oeste. A rodovia estadual RJ-130 acessa Nova Friburgo, a leste sendo denominado Circuito “Terê-Fri” pelo clima favorável à exploração turística dos recursos naturais e pelo pólo agrícola de importante aporte no Estado do Rio de Janeiro.

Segundo dados do Tribunal de Contas do Estado do Rio de Janeiro (2004) no setor primário, a horticultura (alface, couve-flor, tomate, repolho, salsa, entre outros) é responsável por 81% da produção agrícola do município, o qual é o principal produtor dessa cultura no Estado.

Preparo e coleta de amostras

Foram escolhidos dez pontos distintos ao longo da RJ-130, por estes apresentarem um grande número de estabelecimentos produtores de hortaliças (**figura 1**), sendo assim considerados representativos, são eles:

Ponto 01 - Km 28 no rio que banha a localidade de “Estrelinha”;

Ponto 02 - Km 28,5 no rio que banha a localidade de Bonsucesso;

Ponto 03 – Km 29 no rio que banha a localidade de “Contenas”;

Ponto 04 – Km 30 no rio ao longo da RJ-130 entre Bonsucesso e Vieira;

Ponto 05 – Km 34 no córrego Imperial, na localidade de Vieira;

Ponto 06 – Km 35,5 no rio na localidade de Vieira;

Ponto 07 - Km 36 no córrego a localidade de Vieira;

Ponto 08 – Km 36,5 no rio junto a localidade do “Alto de Vieira”;

Ponto 09 – Km 37 no rio próximo a localidade de “Palmital” Vieira;

Ponto 10 – Km 37,5 no rio próximo a localidade do “Quilombo Telles” em Vieira.

Figura 1: Mapa de localização espacial dos bairros de coleta das amostras no circuito “Tere-fri” – RJ.

A aquisição das amostras foi feita no período de maio a dezembro de 2010; correspondendo assim a amostragens na época das águas, onde o clima é mais quente e chuvoso e na época da seca, devido ao clima de temperaturas amenas e pouca incidência de chuva.

Coleta de amostras de água de irrigação

Foram coletados 10 litros de água em recipientes plásticos com tampa, previamente tratados com solução de eluição contendo Tween 80 a 1%. As amostras foram devidamente identificadas e transportadas ao laboratório sob refrigeração a 4°C. O tempo de coleta da amostra e o início da análise não excederam 24 horas (2).

Coleta das informações sobre as condições sanitárias das propriedades

Em ocasião prévia às colheitas, foram realizadas entrevistas quantitativas semi-estruturada constando tópicos previamente estabelecidos de acordo com a problemática central com os proprietários ou trabalhadores da unidade agrícola que aceitaram colaborar com o estudo. Para obtenção do consentimento de realização dessa investigação, após prestarem-se esclarecimentos sobre os objetivos e a importância da pesquisa, foram obtidas informações sobre as condições sanitárias, além do perfil agrícola das propriedades.

Detecção e identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

A concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. nas amostras ocorreu com a filtração de 5 litros de água em membranas de ésteres de celulose Milipore® de poro 0,45 µm e 47mm de diâmetro, seguido da dissolução da membrana em acetona foi substituída pela eluição da membrana utilizando uma solução contendo Dodecil Sulfato de Sódio - SDS (1%) e de Tween 80 (1%). O líquido resultante foi transferido para tubos de centrifuga. Após duas centrifugações por 10min a 1050 x g (aproximadamente 2400rpm), foi aspirado cuidadosamente o sobrenadante até a graduação final de 1ml. Transferiu-se o *pellet* para um tubo *ependorf*, mantendo o volume final de 1ml. Os sedimentos finais das amostras acondicionados em tubos de

eppendorf foram conservados a 4-8°C, e posteriormente num prazo máximo de 24 horas, submetidos aos procedimentos de imunofluorescência direta (IFD), utilizando o kit Kit Merifluor Meridian Bioscience® (Meridian Diagnostics, Cincinnati, Ohio), para determinação da presença/ausência de oocistos e cistos (*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.). Uma alíquota de 5 µl da suspensão de cada amostra foi transferida e distribuída uniformemente nos poços da lâmina de imunofluorescência. Após a secagem das lâminas sob temperatura ambiente por 30 min adicionou-se uma gota do reagente de detecção contendo anticorpo monoclonal anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*, marcado com fluoresceína e 01 gota do contra-reagente (solução de negro de ericromo). Em seguida as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37° C, por 30 min. As preparações foram examinadas no microscópio óptico, com filtros apropriados epifluorescência. Quanto ao critério de identificação, consideraram-se como positivas todas as estruturas ovóides ou esféricas de 3 - 6 µm de diâmetro que apresentaram coloração verde-maçã brilhante com intensidade comparável a apresentada pelos oocistos detectados nas amostras ambientais inoculadas e usadas como controle.

Paralelamente, foram conduzidos procedimentos com o reagente 4',6'-diamidino - 2 phenylindole (DAPI) como teste confirmatório da presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (25).

Cálculo do número médio de oocistos *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

A contagem dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. foi realizada através da leitura das lâminas resultantes das técnicas de coloração histoquímica e IFD, sendo A estimativa de cistos/l e oocistos/l na água de irrigação foi feita com a seguinte fórmula:

$$X = \frac{\text{(oo)cistos} \times 10^6}{\text{Volume da amostra no poço}} \times \frac{\text{Volume total do sedimento}}{\text{Volume inicial da amostra}}$$

Análise Estatística dos Dados

Foi analisado o percentual de amostras positivas quanto ao período do ano (chuvoso e seco) e a densidade de oocistos/l e cistos/l.

Utilizando-se o teste estatístico não-paramétrico Shapiro-Wilk ($p < 0,05$), foi analisado se houve ou não diferença significativa entre os períodos chuvoso e seco para *Cryptosporidium* spp. e para *Giardia* spp.

A análise dos dados foi feita por meio do *software Origin*, (OriginLab), versão 7.5.

Análises microbiológicas: Coliformes totais e termotolerantes

Foram realizadas análises microbiológicas para detecção de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes (3). Para tal utilizou-se a técnica do número mais provável (NMP) também conhecido como método de tubos múltiplos. Na primeira etapa, foram retirados assepticamente 25 ml de amostra e preparadas três diluições sucessivas (0,1; 0,01 e 0,001) e para cada diluição foram utilizados três tubos contendo 10 ml de Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST) com tubos de *Durhan* invertidos, os quais foram posteriormente incubados de 35 a 37°C por 24 horas. Os tubos que apresentaram formação de gás no Caldo LST, tiveram alíquotas semeadas em tubos contendo 5 ml de Caldo verde brilhante 2% (VB) contendo tubos de *Durhan* invertidos para o crescimento de coliformes totais. Em uma segunda etapa, os tubos positivos para VB foram transferidos para tubos contendo caldo com *Escherichia coli* (E.C.), meio confirmatório para coliformes termotolerantes (E.C.) e deixados em banho-maria de 44,5 a 45°C durante 24 horas.

A positividade do teste foi observada pela produção de gás no interior dos tubos de *Durhan*. Os resultados foram analisados em tabela do NMP. Dos tubos positivos para o meio E.C. alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar eosina azul de metileno (EMB) e posteriormente incubadas de 35 a 37°C por 24 horas. A caracterização dos coliformes termotolerantes foi evidenciada pelo crescimento de colônias com centros enegrecidos e brilho verde metálico (2).

Ética

Registre-se que o Comitê de Ética em Pesquisas da Ensp/Fiocruz, aprovou o presente estudo, estando os procedimentos de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

RESULTADOS

Avaliação das condições sanitárias das áreas de produção

Em relação à presença de animais, observaram-se apenas animais domésticos de pequeno porte como aves, cães e gatos em todos os estabelecimentos agrícolas.

Todos os estabelecimentos agrícolas apresentavam edificações como casas de alvenaria e barracões abertos ou galpões para manipulação, armazenamento e distribuição da produção agrícola. Em 4 das instalações sanitárias observou-se rede de abastecimento e coleta de esgoto, e nas 6 restantes, sem abastecimento de água e o esgoto era destinado a fossa séptica.

Quanto ao tipo de captação de água para a irrigação, havia 7 estabelecimentos agrícolas cuja água utilizada para a irrigação era proveniente de captação subterrânea e em 3 dos estabelecimentos a água usada para irrigar era proveniente de poços artesianos.

Avaliação da contaminação da água de irrigação

Nas análises de prevalência natural de cistos e oocistos das amostras coletadas na época das águas, compreendidas nos meses de novembro-dezembro, 70% das amostras apresentaram a presença de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp.; já nas amostras coletadas nos meses de maio-junho-julho-agosto-setembro foi constatada a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em 90% delas. A metodologia de IFD utilizada neste estudo possibilitou a confirmação de 23,82% de amostras positivas de *Cryptosporidium* spp. no período chuvoso e de 41,44% no período de seca. Encontrou-se a confirmação de 21,63% de amostras positivas de *Giardia* spp. no período chuvoso e 45,33% no período de seca (**tabela 2**).

Tabela 2. Estimativa de amostras positivas e densidade de oocistos e cistos /L nas amostras de água de irrigação

As concentrações médias de coliformes totais para o período chuvoso foi de 37,6 NMP/100ml (18 - 78) e 17,8 NMP/100ml (7 - 41) para os termotolerantes; e para o período seco as concentrações médias de coliformes totais foi de 45,5 NMP/100ml (15 - 71) e 19,9 NMP/100ml (6 - 33) para os termotolerantes (**tabela 3**).

Tabela 3. Detecção de Coliformes fecais e termotolerantes nas amostras de água de irrigação

Utilizando-se o teste estatístico não-paramétrico Shapiro-Wilk ($p < 0,05$), constatou-se que não houve diferença significativa entre os períodos chuvoso (P value = 0,18933) e seco (P value = 0,62600) para *Cryptosporidium* spp. Da mesma forma não se constatou diferença significativa entre os períodos chuvoso (P value = 0,08719) e seco (P value = 0,55870) para *Giardia* spp.

DISCUSSÃO

As águas utilizadas na irrigação dos 10 estabelecimentos agrícolas pesquisados, invariavelmente denotaram presença preocupante de microrganismos de alto comprometimento em surtos diarréicos, justificando o foco da pesquisa tem sido na investigação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Cabe destacar que esses microrganismos são protozoários patogênicos com grande importância por sua veiculação hídrica (6). Suas formas infectantes (oocistos e cistos, respectivamente) são liberadas em grande quantidade nas fezes dos hospedeiros infectados.

Na pesquisa com os indicadores de qualidade de água (Coliformes totais e Coliformes termotolerantes), sua detecção também se deu, denotando condições sanitárias precárias locais, fato identificado nas observações participativas e entrevistas realizadas na pesquisa de campo. Deixa claro de que a falta de saneamento básico juntamente com má conservação ambiental são fatores determinantes na contaminação dos recursos hídricos (20,24); e assim justifica a presença microbiológica na águas de irrigação dos estabelecimentos agrícolas da região estudada; fato também já sinalizado por outros autores de outras áreas agrícolas investigadas (16,29).

Tem-se atribuído como potencializador dos fatores de risco a surtos diarréicos, o baixo nível sócio-econômico da população, a ausência e/ou precariedade dos sistemas de esgotamento sanitário, a ausência de educação sanitária, educação ambiental e condições de higiene, juntamente com o descaso de ações governamentais preventivas, culminando na falta de políticas públicas. Ocorrendo a inversão desses fatores, ou seja, melhorando a qualidade de vida da população e das condições de saneamento, pode-se reduzir significativamente a prevalência de enteroparasitoses.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. estão amplamente distribuídos no ambiente, ocorrendo em diversos tipos de água e em várias partes do mundo, sendo urbanos e rurais, impedindo a contaminação dos lençóis freáticos e águas superficiais, como principalmente de rios (7,13,30).

A preocupação com as fontes e a incidência da infecção humana por parasitas patogênicos envolvidos na veiculação hídrica e alimentar, deveriam proporcionar um monitoramento e tratamento sanitário nos diferentes usos da água e, para tal, emerge a aplicação de tecnologias para a prevenção, detecção e inativação da carga microbiológica, rotineiramente presente em nossos mananciais.

Quanto a incidência de acometimentos diarréicos na população que opera esses estabelecimentos nada ficou claramente identificado nas entrevistas. Porém, pela falta de programas de saúde pública junto à população rural, provavelmente tal fato possa subsidiar a carência de dados epidemiológicos sobre casos de parasitoses intestinais da região.

CONCLUSÕES

Esta pesquisa com água de irrigação de produtores de hortaliças revelou que a água de irrigação está invariavelmente contaminada com material fecal, sendo inevitável o desencadear de enteroparasitoses. Fator importante na mitigação do problema pode ser a implantação de políticas sanitárias aliadas ao tratamento das pessoas infectadas, bem como o fomento a programas educacionais junto às populações do meio rural para conscientização desse problema, que é de caráter coletivo; já que muitos casos de enteroparasitoses são assintomáticos, dificultando um tratamento efetivo e, em decorrência, podem ser fatais a indivíduos imunocomprometidos.

As enteroparasitoses ainda representam um grave problema de saúde pública e não resta dúvida que estão muito relacionadas aos fatores de risco que os indivíduos estão expostos durante a vida, principalmente em crianças. O elevado índice de enteroparasitos encontrado neste estudo é reflexo de um conjunto de vários fatores que têm sido negligenciados ao longo dos anos. Dentre os prejuízos causados pelos parasitos intestinais podemos citar o absenteísmo entre adultos e a deficiência de aproveitamento escolar entre os mais jovens e crianças. E, em consequência, a ingestão de hortaliças contaminadas por estruturas parasitárias é uma via importante de transmissão, necessitando a adoção de medidas, por parte dos órgãos de vigilância sanitária, que resultem em uma melhoria da qualidade higiênica desses produtos.

Adicionalmente, torna-se importante o uso de instalação de fossas sépticas e redes de esgoto para impedir que o solo venha a se contaminado, dificultando que a água para irrigação dos estabelecimentos agrícolas estejam contaminadas.

ABSTRACT**OCCURRENCE OF ENTEROPROTOZOANS IN WATER IRRIGATION OF ESTABLISHMENT OF VEGETABLES PRODUCERS. CASE STUDY: TERESÓPOLIS, RJ**

It was detected *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in waters used for irrigation on 10 establishment of vegetables producers in Teresópolis, RJ. The survey period took place from May to December 2010. For isolation of *Cryptosporidium* was used the of oocysts concentration method by centrifugation through a membrane filter. To determine the oocysts and cysts presence or absence, were used direct immunofluorescence (DIF). The total coliform (TC) and thermotolerant (TTC) were evaluated in accordance with Portaria No. 518. The DIF has provided confirmation in 23.82% of positive samples of *Cryptosporidium* spp. during the rainy season and 41.44% in the dry season, and confirmation in 21.63% of samples positive for *Giardia* spp. during the rainy season and 45.33% in the dry season. In the rainy season the TC median was 37.6 MPN/100ml and TTC 17.8 MPN/100ml. For the dry period the TC median was 45.5 MPN/100ml and TTC 19.9 MPN/100ml. Urge implementation of sanitation actions in the vegetable farms and in Teresópolis, to be sure of that irrigation water does not contaminate food or pose a risk to the public health.

KEY WORDS: *Cryptosporidium*. *Giardia*. Environmental sanitation. Public Health

REFERÊNCIAS

1. Acha PN, Szyfres B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2 ed., Washington: Organización Panamericana de La Salud – Publicación Científica n. 503. 1997.
2. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21^a ed. Washington DC: APHA INC. 1015, 2005, 1085 p.
3. Brasil. *Portaria n° 518*. O Ministério da Saúde aprova normas e padrões de potabilidade da água destinada ao consumo humano. Diário Oficial, Brasília, Seção 1, p.266-70. 26 mar. 2004.
4. Blans MCA, Ridwan BU, Verweij JJ, Rosemberg-Arska M, Verhoef J. Cyclosporiasis outbreak Indonesia. *Emerg Infect Dis* 11(9): 1453- 1455, 2005.
5. Botero JH, Castaño A, Montoya MN, Ocampo NE, Hurtado MI, Lopera MM. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in imunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. *Rev Inst Med Trop* 45(4): 197-200, 2003.
6. Bradford SA, Schijven J. Release of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calf manure: impact of solution salinity. *Environ Sci Technol* 36: 3916-3923, 2002.
7. Brookes JD, Antenucci J, Hipsey M, Burch MD, Ashbolt J, Ferguson C. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. *Environ Int* 30: 741-759, 2004.
8. Cantusio Neto R, Santos JU, Franco RMB. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. *W Sci Tech* 54(3): 89-94, 2006.
9. Chieffi PP, Gryschek RCB, Amato Neto V. *Parasitoses intestinais – diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Lemos Editorial, 2001.
10. Cunha AC, Cunha HFA, Júnior ACPB, Daniel LA, Shulz HE. Qualidade microbiológica da água em rios de áreas urbanas e periurbanas no baixo Amazonas: o caso do Amapá. *Eng Sanit Amb* 9(4): 322-328, 2004.
11. Da Silva CGM, Andrade SAC, Stamford TLM. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas “*in natura*”, no Recife. *Ciênc Saud Col* 10(supl. 0): 16-25, 2005.

12. Dias Junior O. *Ocorrência de cistos de Giardia spp e oocistos de Cryptosporidium spp. em águas superficiais e esgoto no município de Araras – SP*. São Paulo. Dissertação de Mestrado – Universidade Mackenzie, 1999.
13. Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J Hazard Mat A117*: 1-11, 2005.
14. Farias EWC, Gamba RC, Pellizari VH. *Cryptosporidium spp. em águas de esgoto*. *Br J Microbiol 3(1)*: 41-43, 2002.
15. Fayer R, Dubey JP, Lindsay DS. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitol 20(11)*: 531-536, 2004.
16. Ferreira UM, Ferreira CS, Monteiro CA. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev Saúd Públ 34(6)*:73-82, 2000.
17. Ferreira GM, Bevilacqua PD, Bastos RKX, Oliveira AA, Dias FM. *Dinâmica de cistos de Giardia e oocistos de Cryptosporidium em manancial de abastecimento de água para consumo humano, Viçosa-Minas Gerais*. In: Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 6., Recife. Anais...Recife: ABRASCO, 2004.
18. Franco RMB, Cantusio Neto, R. Occurrence of Cryptosporidial oocysts and Giardia cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Osw Cruz 97(2)*: 205-207, 2002.
19. Gamba RC, Ciapina EMP, Espíndola RS. Detection of *Cryptosporidium spp.* oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S. Paulo-Brazil. *Braz J Microbiol 31*: 23-30, 2000.
20. Gostin LO, Lazzarini Z, Neslund VS, Osterholm MT. Water quality laws and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens. *Am J Pub Health 90(6)*: 847-53, 2000.
21. Hunter PR, Thompson RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol 35*: 1181-1190, 2005.
22. Ibge. *Censo Demográfico 2000 - Resultados do universo*. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 out. 2010.
23. Levi GC. *Doenças produzidas por protozoários e helmintos*. In: Marcondes E. *Pediatria Básica*. 7a ed. São Paulo: Savier; p.977-1019. 1988.

24. Ludwig KM, Frei F, Alvares Filho F, Ribeiro-Paes JT. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 32(5): 547-555, 1999.
25. Machado ECL, Stamford TLM, Machado EHL, Soares DS, Albuquerque MNL. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife-PE. *Arq Bras Med Vet Zootec* 61(6): 76-91, 2009.
26. Malta RCG, Waib CM, Branco Jr AC. Investigação epidemiológica sobre enteroparasitos em crianças em idade pré-escolar no município de Lins (SP). *Rev Patol Trop* 31(1): 109-120, 2002.
27. Muller APB. *Detecção de oocistos de Cryptosporidium spp. em amostras de águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo*. Dissertação de Mestrado- Universidade São Paulo/ SP, ICB- Instituto de Ciências Biomédicas. Nutrição, 1999.
28. Newman RD, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 49(2): 270-275, 1993.
29. Oliveira CA, Germano PM. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo-SP, Brasil – II- Pesquisa de protozoários intestinais. *Rev Saúd Públ* 26(5): 332- 335. 1992.
30. Pereira CRA, Ferreira AP, Koifman RJ. Detecção de *Cryptosporidium parvum* em alfaces frescas para consumo cru. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. *G Scient* 2(2):31-36, 2008.
31. Ré AL. *Qualidade microbiológica e parasitológica de águas de consumo humano do município de Araras – SP, com ênfase na pesquisa de oocistos de Cryptosporidium spp e cistos de Giardia lamblia*. São Paulo, Dissertação de Mestrado – Universidade Mackenzie, 1999.
32. Rose JB. *Emerging issues for the microbiology of drinking water*. Water Engineering & Management, p.23-9. 1990.
33. Tomps SR. *Estudo epidemiológico da cryptosporidiosis e sua associação com as condições de saneamento ambiental no distrito de São Paulo-SP*. Dissertação de mestrado, São Paulo. Universidade Mackenzie de São Paulo. 1998.
34. Tzannes S, Batchelor DJ, Graham PA, Pinchbeck GL, Wastling J, German AJ. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Isospora* species infections in pet cats with clinical signs of gastrointestinal disease. *J Feline Med Surg*.10: 1-8. 2008.

Tabela 1: Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. no ambiente aquático do Brasil no período de 1993 a 2006

Local/Fonte	Parasito	Densidade (oo)cistos/L	Amostras positivas	Referência
Fortaleza- CE/ (poço)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	ND	22,2%	Newman et al.,1993 (28)
Perus-SP/ (água tratada)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	ND	50%	Tomps, 1998 (33)
Araras-SP / (água bruta)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	ND	64,4%	Dias Junior, 1999 (12)
	<i>Giardia</i> spp.	ND	66,7%	
Araras-SP / (esgoto)	<i>Cryptosporidium</i> spp.			Dias Junior, 1999 (12)
	<i>Giardia</i> spp.	2,23	100%	
Araras-SP/ (poço e água tratada)	<i>Giardia</i> spp.	ND	16,66%	Ré, 1999 (31)
São Paulo- SP/ (água bruta e tratada)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	0,1 - 236	50%	Muller, 1999 (27)
Itaquacetuba- SP/ (poço)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	ND	100%	Gamba et al., 2000 (19)
Campinas- SP/ (água bruta)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	4,45-6,08	100%	Franco et al., 2002 (14)
	<i>Giardia</i> spp.	3,3 – 9,5	100%	
São Paulo- SP/ (esgoto)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	1200-1400	100%	Farias, 2002 (14)
Viçosa-MG/ (água bruta)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	8 – 135		Ferreira et al., 2004 (17)
	<i>Giardia</i> spp.	0 - 24	ND	
Recife-PE/ (água bruta)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	16 - 40	5%	Machado, 2009 (25)

Figura 1: Mapa de localização espacial dos bairros de coleta das amostras no circuito

“Tere-fri” – RJ.

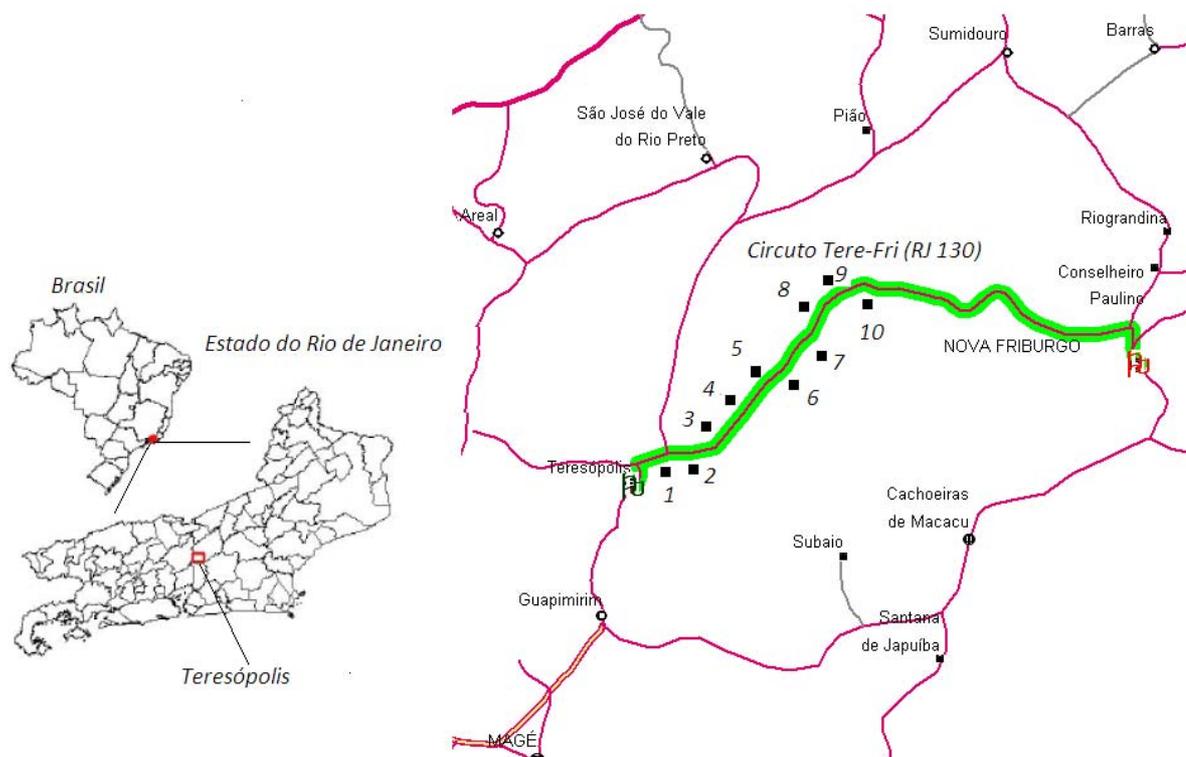


Tabela 2. Estimativa de amostras positivas e densidade de oocistos e cistos /L nas amostras de água de irrigação

Período de coleta	Pontos de Coleta	Amostras positivas (%)		Densidade (oocistos/L)	Densidade (cistos/L)
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
chuvoso	1	24,4	14,3	1,22x10 ²	3,65x10 ²
	2	35,6	27,8	1,45x10 ²	4,18x10 ²
	3	26,7	23,5	1,56x10 ⁴	6,56x10 ²
	4	47,8	32,1	1,27x10 ³	1,91x10 ⁵
	5	39,8	56,2	1,24x10 ⁵	1,86x10 ⁴
	6	45,0	25,7	3,66x10 ²	4,25x10 ⁴
	7	ND	ND	ND	ND
	8	18,9	36,7	4,52x10 ³	1,2x10 ²
	9	ND	ND	0,2x10 ²	ND
	10	ND	ND	0,8x10 ²	0,06x10 ²
	média	23,82	21,63	1,46 x10⁴	2,53x10⁴
	variação	0 – 47,8	0 – 56,2	0 - 1,24x10⁴	0 - 1,91x10⁵
seco	1	43,2	52,5	4,44x10 ⁴	4,52x10 ⁴
	2	29,9	76,2	1,93x10 ³	6,78x10 ³
	3	65,8	77,8	2,52x10 ⁶	3,62x10 ⁶
	4	75,4	31,4	6,48x10 ⁴	1,55x10 ⁴
	5	43,5	33,8	3,44x10 ⁶	7,18x10 ⁶
	6	56,9	45,6	2,98x10 ³	1,62x10 ³
	7	23,6	23,7	1,77x10 ³	4,33x10 ³
	8	34,1	67,8	1,6x10 ⁴	2,15x10 ⁴
	9	ND	ND	ND	ND
	10	42,0	44,5	1,64x10 ³	1,15x10 ³
	média	41,44	45,33	6,09x10⁵	1,08x10⁶
	variação	0 - 75,4	0 – 77,8	0 - 3,44x10⁶	0 - 7,18x10⁶

Tabela 3. Detecção de Coliformes fecais e termotolerantes nas amostras de água de irrigação

Período de coleta	Pontos de Coleta	NMP/100ml	
		<i>Coliformes totais</i>	<i>Termotolerantes</i>
chuvoso	1	25	11
	2	56	24
	3	29	9
	4	78	41
	5	34	23
	6	19	11
	7	34	13
	8	38	16
	9	45	23
	10	18	7
	média	37,6	17,8
	variação	18 - 78	7 - 41
seco	1	43	16
	2	67	24
	3	32	15
	4	71	33
	5	39	31
	6	15	6
	7	39	14
	8	31	11
	9	53	19
	10	65	30
	média	45,5	19,9
	variação	15 - 71	6 - 33

NMP = número mais provável

ARTIGO 3

Prevalence of *cryptosporidium* spp. in domestic companion animals of elderly population in Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil

Prevalência de cryptosporidium spp. em animais domésticos de companhia da população idosa em Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil

Cassia R. A. Pereira¹
Aldo P. Ferreira²
Rosalina J. Koifman³
Sérgio Koifman³

Abstract

Objective: This study aims to highlight the prevalence of cryptosporidiosis in domestic companion animals. **Method:** Eligible for study were all elderly (over 60 years of age) of both sexes who have dogs and / or cats at home, living in the city of Teresópolis and who attended a vaccination post in the municipality during the period of national campaigns vaccination against influenza in 2007 and 2008. **Results:** It was identified the presence of one or more oocysts in fecal material (positive for *Cryptosporidium* spp.) in 29.0% (87) of these animals and 28.7% had about 2 or more oocysts per field. The prevalence by history of diarrhea among the 300 animals examined was 27%, reaching 29.5% in dogs and 24.7% in cats showed no statistically significant difference between species. **Conclusion:** This fact indicates gaps to be more detailed, since there are few studies that explore the cryptosporidiosis relationship in the human population with companion animals. The results show the importance of conducting periodic parasitological examination in dogs with or without diarrhea for the specific treatment and the implementation of prophylaxis and control methods.

Key words: *Cryptosporidium*. Prevalence. Health of the elderly. Domestic Animal.

Resumo

Objetivo: Este estudo visa a destacar a prevalência da criptosporidiose em animais de companhia doméstica. **Método:** Foram elegíveis para o estudo todos os idosos (acima de 60 anos de idade) de ambos os sexos que tenham cães e / ou gatos em casa, vivendo na cidade de Teresópolis e que foram a um posto de vacinação no município durante o período das campanhas nacionais de vacinação contra a

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. Prevalência. Saúde do Idoso. Animais Domésticos.

¹ Program in Public Health and Environment, National School of Public Health, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

² Center for the Study of Workers Health and Human Ecology, National School of Public Health, Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - 21.041-210, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Department of Epidemiology and Quantitative Methods in Health, National School of Public Health, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondência / Correspondence

Aldo Pacheco Ferreira

E-mail: aldoferreira@ensp.fiocruz.br

gripe em 2007 e 2008. *Resultados:* Em 29,0% dos animais pesquisados detectou-se a presença de oocistos e em 28,7% foram observados 2 ou mais oocistos por campo. A prevalência de história de diarreia entre os 300 animais examinados foi de 27%, atingindo 29,5% em cães e 24,7% em gatos, não mostrando diferença estatisticamente significativa entre as espécies. *Conclusão:* Este fato indica lacunas a serem mais aprofundadas, uma vez que são poucos estudos que exploram a relação da criptosporidiose com os animais de companhia na população humana. Os resultados demonstram a importância de realização periódica de exames parasitológicos em cães com e sem diarreia para tratamento específico e adoção medidas de controle e profilaxia.

INTRODUCTION

The cryptosporidiosis is an important zoonosis responsible for clinical signs of diarrhea and gastroenteritis, associated with abdominal pain in humans and domestic animals caused by opportunistic protozoan of the genus *Cryptosporidium*.¹ It is transmitted between individuals through oocysts that are already eliminated in the infectious form, being the main transmission routes the direct contact (person to person), oral-fecal or indirectly by ingestion of contaminated food or water (cysts and oocysts).²

Its distribution is cosmopolitan and presents various hosts where *C. muris* was the first species described in 1907 by Tyzzer, being its endogenous development restricted to glands of the rodent stomach. *C. parvum*, also described by Tyzzer (1912) occurs mainly in the small intestine of various mammals, including humans.³

The protozoan parasite *Cryptosporidium* has emerged as an important water contaminant, responsible for several outbreaks of cryptosporidiosis, affecting until half of 2001, approximately, 427,000 people worldwide. Several *Cryptosporidium* species have been described, but only *C. parvum* have been associated with gastrointestinal illnesses.⁴ The cryptosporidiosis can be fatal in immunocompromised patients and can severely debilitate immunocompetent individuals. Another problem is given by the fact that *Cryptosporidium* oocysts can survive for several months in the aquatic environment and are also resistant to disinfection by chlorine used in conventional water treatment.⁵

The importance of a study on the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in the aquatic environment has been reinforced by Brazilian regulations in Health Environmental Surveillance associated to Drinking Water Quality Manual (Act n° 518, Ministry of Health)⁶ that developed and implemented regulatory standards for *Cryptosporidium* in drinking water. Currently, monitoring of *Cryptosporidium* in drinking water system that supplies cities between 10,000 and 100,000 inhabitants is worldwide recommended.⁷ However, the methods commonly used in the determination of oocysts in water are highly variable and inefficient, for example, the identification of false-positive by interference with algae and others protozoan species.⁸

The amount and the quality of water are important factors for the establishment of health benefits related to the incidence reducing and prevalence of several diseases, including diarrheal illness.⁹ Brazil is one of the countries with high incidence of diarrhea, which directly affects the rates of infant mortality and with greater severity among the elderly.^{10,11}

C. parvum has been recognized worldwide as one of the major contaminants of the water supply.¹² The description of hydric contamination by oocysts presence, probably due to human and animal origin, are frequently associated with diarrhea outbreaks and consequently to high morbidity and mortality levels, preferably affecting immunocompromised and children, but also immunocompetent and animals.¹³ Although of endemic characteristics, diarrhea can present cases related to itself (clinical, spatial-temporal distribution, source of infection) that are able to characterize an outbreak.

The *Cryptosporidium* transmission through the environment is gaining recognition, especially, after the occurrence of numerous outbreaks associated with consumption or contact with contaminated waters.¹⁴ Some biological factors and characteristics of *Cryptosporidium* facilitate disease transmission through water.¹⁷ There is no specific therapy to treat the high number of oocysts excreted by infected individuals, around 10^9 to 10^{10} oocysts, as well as a wide variety of hosts that act as reservoirs of infection or promote the cross-transmission or increase the potential dissemination of cryptosporidiosis.^{5,9} The oocysts excretion may or may not coincide with the period of symptomatic disease; there may be uncertainties as to its actual occurrence, by the lack of further information on the incidence in asymptomatic individuals.^{10,12}

The elderly population presents a greater susceptibility to cryptosporidiosis.¹⁵⁻¹⁷ The number of fatal cases by specific enteric pathogens present from 10 to 100 times higher in elderly than in the general population.^{18,19} Mirzaei²⁰ observed that in different age groups of Iran population a prevalence of *C. parvum* in individuals over 51 years ranged from 25.6% with diarrhea and it was more expressive than in cases of non-diarrhea (3.7%).

Studies detach the role of pets, especially dogs and cats, indicating significant benefits for people and for society. They would contribute for the physical, social and emotional development of the children and with well-being of its proprietors, particularly the elderly.¹⁶ However, companion animals can be an important source of infection for humans, determining diseases generically known as zoonosis, as cryptosporidiosis.^{16,21} Aggravating case related to this infection is given by the fact that most of the infected animals are asymptomatic.^{22,23}

This still little explored scenario motivated this paper, that aims to present the prevalence of cryptosporidiosis in companion animals, in a sample of the elderly population from the city of Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil.

METHODS

Local Study

According to the Demographic Census,²⁴ Teresópolis has a total of 138,081 inhabitants with 115,198 (83.5%) inhabitants living in the urban areas and 22,883 (16.5%) inhabitants living in rural areas, with a density of 158.7 inhabitant/km² and urbanization rate of 83.9%.

Population target

All elderly (60 years or older) of both sexes who have dogs at home and / or cats, living in Teresópolis and who had attended a municipal health unit during the national influenza vaccination campaign in 2007 and 2008 were eligible for the study.

We identified 300 elderly in these two campaigns who agreed with the term consent for the anamnesis, carried out through a questionnaire answered by the research participants, with the aim to gather information about residence location and conditions of handling the animal in the household.

Were collected fecal samples of companion animals (dogs and cats). The fecal samples obtained from the animals were kept in phormol acetic acid 10% and submitted to refrigeration until laboratorial analysis.⁷ Two coprological methods for diagnosis were used. As first method it was done direct fecal smear, and these stained by modified Ziehl-Neelsen,^{25,26} after which it was carried out the microscopic observation of smears. As second method it was weighed two grams of each stool sample which diluted in 15.0 ml PBS (Phosphate-buffered saline), filtered and placed in centrifuge tube. The filtrate was centrifuged at 750 x g per 7 minutes, discarding the supernatant. In pellet was added 10.0 ml of sucrose solution saturated with a specific gravity of 1.2 and centrifuged under the same conditions. Supernatant sample was collected with the aid of a bacteriological loop being prepared smears on a glass microscopic slide. Drying and fixation

with methanol were followed by staining using the modified Ziehl-Neelsen technique. The stained slides were observed and *Cryptosporidium* oocysts were identified by ocular micrometer $\times 1000$ using a Zeiss Axioskop microscope.

It was considered as relevant for prevalence study age data owner's grouped by age band (60 to 64 years, 65 to 69 years, 70 to 74 years and above 75 years), sex of owner, number of domestic animals for household, its distribution according to species, its domiciliation inside or outside the residence, and origin as the location (urban or rural) as well as the diarrhea presence or absence in both species.

Statistical analysis

Descriptive statistics included the calculation frequency measures and prevalence for diarrhea for internal and external residence variables, the total number of dogs and cats in residence, presence of cysts and number of cysts per field observed in the laboratory, using *SPSS* software for windows version 15.0 (SPSS Inc. Chicago, III., USA).

Ethical issues

The ethical issues were respected according to the Diretrizes and Normas Regulamentadoras - Resolution # 196/96, through a Free Informed Consent Term and by the consent of the institution's Ethical Committee where this research was conducted.

RESULTS

The average age of the 300 elderly, owners of companion animals who participated in this study was 68.9 years with standard deviation (SD) of 6.9 and a median of 68 years, being the minimum age of 58 years and maximum of 90 years. The age group 70 years and more concentrated 43.3% of participants and there was a predominance of elderly females (67.7%). The animal of choice for company was preferentially the dog (71.7%), cats (12.0%) and in 16.3% both coexisted. Whether dogs or cats, the majority of owners (59.3%) had only one pet per household and 78.3% lived in urban areas (table 1).

Table 1 - Distribution of the elderly population and animals according to predetermined variables, Teresópolis, RJ, 2007-2008.

Variables			
	Number	%	
Owners age			
60 to 64 years	102	34.0	
65 to 69 years	68	22.7	
70 to 74 years	64	21.3	
> 75 years	66	22.0	
Total	300	100.0	
Owners sex			
Female	203	67.7	
Male	97	32.3	
Total	300	100.0	
Domestic animal per residence			
Canine	215	71.7	
Feline	36	12.0	
Both	49	16.3	
Permanence of the animal inside the residence			
Yes	172	57.3	
No	128	42.7	
Number of animals per residence			
1	178	59.3	
2 to 4	103	34.3	
5 or more	19	6.3	
Origin of animal residence			
Urban	235	78.3	
Rural	65	21.7	
Total	300	100.0	

We identified the presence of one or more oocysts in fecal material (positivity for *Cryptosporidium* spp.) In 29.0% (87) of these animals and 28.7% had about 2 to 10 oocysts per field.

Prevalence of diarrhea among the 300 animals examined was 27% to 29.5% in dogs and 24.7% in cats, showing no statistically significant difference between species (table 2).

Tabel 2 - Animal distribution in data on diarrhea, presence of oocysts in laboratory tests and number of oocysts per field, Teresópolis, RJ, 2007-2008.

Variables			
Diarrhea in total examined animals		Number	%
Yes		81	27.0
No		219	73.0
Diarrhea in canines		Number	%
Yes		78	29.5
No		186	70.5
Diarrhea in felines		Number	%
Yes		64	75.3
No		21	24.7
<i>Cryptosporidium</i> spp. oocysts presence		Number	%
Yes		87	29.0
No		213	71.0
Number of <i>Cryptosporidium</i> spp. oocysts per field		Number	%
1		62	71.3
2		16	18.4
3		5	5.7
4 or more		4	4.6

The prevalence ratio of diarrhea in the animals researched for oocysts presence showed a strong association with statistical significance with P-value of 0.0077 ($\chi^2 = 7.09$), PR = 5.49 (CI 95%: 3,66-8,21) and when was stratified to oocysts number per field showed a dose response with increasing effect measures reaching a PR of 6.39 (CI 95%: 3,25-12,56) when the oocysts number was 4 or more per field. It was observed a protective effect

with 27% reduction in the probability of diarrhea in animals when they lived inside the home. Considering as reference category (OR = 1) that only one companion animal per residence, no significant difference was found when compared with the prevalence of diarrhea in animals living until a total of 4 per residence (OR = 1.004), but the probability of diarrheic events was 2.6 times higher when living 5 or more animals (table 3).

Table 3 - Prevalence ratio of diarrhea in animals for oocysts presence, oocysts number per field, residence type, animals number per residence, Teresópolis, RJ, 2007-2008.

Variables	Diarrhea			PR	CI (95%)
	Yes Nº (%)	No Nº (%)	Total Nº (%)		
<i>Oocysts presence</i>					
Yes	56 (64.37)	31 (35.63)	87 (100)	5.49	3.66 – 8.21
No	25 (11.74)	188 (88.26)	213 (100)		
<i>Oocysts number per field</i>					
1	38 (61,29)	24 (38,71)	62 (100)	5,22	3,43 – 7,94
2	11 (68,75)	5 (31,25)	16 (100)	5,86	3,57 – 9,61
3	4 (80)	1 (20)	5 (100)	6,82	3,84 – 12,10
4 or more	3 (75)	1 (25)	4 (100)	6,39	3,25 – 12,56
<i>Residence type</i>					
Inside	39 (22,67)	133 (77,33)	172 (100)	1.00	
Outside	42 (32.81)	86 (67.19)	128 (100)	0.73	0.48 – 1.10
<i>Animals number per residence</i>					
1	43 (24.15)	135 (75.85)	178 (100)	1.00	
2 to 4	26 (25.24)	77 (74.76)	103 (100)	1.04	0,68 – 1,59
5 or more	12 (63.15)	7 (36.85)	19 (100)	2.61	1.69 – 4.03
				$\chi^2 = 7.09$; $P = 0.0077$	

PR = Prevalence ratio; CI = Confidence interval; χ^2 = Chi square; P = P-value

DISCUSSION

The 300 elderly residents in Teresópolis who attended the national influenza vaccination campaign in 2007 and 2008 owned at least one domestic animal. The population sample studied was predominantly female, preferred dogs as companion animal and most of them kept the animals inside the residence.

The study performed in a population of dogs and cats (300) showed a high global prevalence of positivity for *Cryptosporidium* spp. (29.0%), higher than the one reported among other canine populations in the literature. Lallo and Bondan,²³ in a study conducted with dogs from a university hospital and two private kennels, reported a positivity rate of 8.85% when the light microscopy technique was used, and 9.5% with polymerase chain

reaction (PCR) and a similar proportion (10.2%) was observed by Newman and colleagues²⁷ with an animal population in northwestern Brazil. An investigation conducted with 263 faeces samples collected from healthy dogs from the city of Lavras and Viçosa, Minas Gerais state, Brazil, found a prevalence of 1.85% for *C. parvum*.²² Slightly higher proportion was reported by Gennari and colleagues, in São Paulo State,²⁸ analyzed 160 dogs' faeces samples with the presence of diarrhea, getting a global frequency of 2.83% of excreted oocysts, with no significant difference between the two groups. A study done in Zaragoza, Spain, in 81 dog, registered positivity of 7.4%,²⁹ while El-Ahraf and colleagues,³⁰ testing 200 dogs in San Bernadino, California, found 2%. Some studies conducted in Finland did not reveal oocysts excretion in adult dogs' faeces.³¹⁻³³ A study conducted in São Paulo, Brazil, showed that oocysts in feces is shedding.²²

Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in the canine population and those with companion animals (dogs and cats) are sparse and the prevalence rates reported are very different; some factors may be pointed to justify these differences, especially the degree of environmental sanitation, the type of fecal collection and technical analysis.

The high prevalence of *Cryptosporidium* in Teresópolis region is consistent with the findings of Pereira and colleagues²⁶, who detected high contamination (100%) of this protozoan in vegetables consumed by the population in Teresópolis, a worrying data for water and sludge treatment, due to non-sanitation actions.

The elderly population, most of the time, is psychologically dependent on companion animals, including medical prescription. Infectious diseases are common causes of increased morbidity and mortality in elderly patients and show a very frequent problem in daily geriatrics practice.²⁴ Infections in elderly people are different from the ones presented by the young population, differences that can be due to immunological changes or organic malfunction (which decline with age).¹⁶

A positive for *Cryptosporidium* in animals living with elderly people aged of 70-74 and 75 or more (43.9%) was very high, setting a higher exposure probability for this in more susceptible population groups. A study conducted in Iran²⁰ with 400 individuals the group above 51 years who had history of diarrhea had a prevalence of 25% in positivity for *Cryptosporidium* spp.

It can also be noticed that the canine population for one animal per residence compared to cases of overcrowding (more than 5 animals), showed a lower diarrhea prevalence, probably as a result of minor contact with other animals (oral / faecal route) avoiding cross-contamination. It was also observed that animals that lived inside the houses had a protective prevalence rate, with reduced probability of presenting diarrhea,

maybe due to the fact that the inner environment means less exposure to *Cryptosporidium* infection.

Domestic dogs and / or cats are sources of asymptomatic *Cryptosporidium* infection, housing them in their intestinal tract and feeding viable oocysts to the environment through their faeces.²² The concern is that the high prevalence of cryptosporidiosis is only clinically manifested in diarrheal events in cases of weakness of the animal.²³ The prevalence of *Cryptosporidium* spp. increases with higher population density of companion animals per residence. This fact points to the need of further deepening of this research, since there are few studies that explore the cryptosporidiosis relationship between human population and animals. So it should improve the assessment of the level that this relationship conforms, that is, elderly companion animals, by the potential cycle of exposure of the elderly, thus justifying the attempt to know what happens in this particular group of population, here preliminarily studied.

CONCLUSION

Domestic companion animals provide valuable assistance to the physical and mental health of their owners. It was found that the close relationship to these animals, besides benefits, may bring risks to public health, exacerbated by the potential presence of parasites in their animals. Therefore, owners need to be aware of the risks of human infection through faeces of infected dogs and thus have a greater concern with regular vermifugation of animals (deworming program), in order to provide better health conditions for animals and avoid the risk of transmission to the owners and for the general population.

We consider relevant the findings of this research, which are important to show the zoonotic relationship of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples of companion animals of the elderly population being studied.

REFERENCES

- Current WL. Human cryptosporidiosis. *N Engl J Med* 1983; 309:614-5.
- O'donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol* 1995; 25(2): 139-95.
- Arrowood MJ. In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(3):390-400.
- Teunis PPM, Havelaar AH. Risk assessment for protozoan parasites. *Internat Biodegr Biodet* 2002; 9:122-46.
- Muller APB. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana do estado de São Paulo. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000.
- Ministério da Saúde (Brasil). Portaria n° 518 de 25 de março de 2004. Aprova normas e padrões de potabilidade da água destinada ao consumo humano. Diário Oficial da União 26 mar 2004.
- Franco RMB, Rocha-Eberhrd R, Cantusio NR. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and cysts in raw water from the Atibaia river. *Rev Inst Med Trop* 2001; 43(2):109-11.
- Jakubowski WS, et al. Environmental methods for *Cryptosporidium*. *J Am Wat Works Assoc* 1996; 88:107-21.
- Mota S. Introdução à engenharia ambiental. Rio de Janeiro: ABES; 2003.
- Ribeiro PC, Pile E, Queiroz MMC, Norberg NA, Tenório JRO. Cryptosporidiosis occurrence in HIV + patients attended in a hospital. *Rev Saud Publ* 2004; 38(3):469-70.
- Mascarini LM, Donalísio MR. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(6):577-79.
- Ferreira AP. Inspeção microbiológica para avaliação da qualidade das águas ambientais. *Rev Bras Farm* 2003; 84(2):61-3.
- Heller L, Bastos RXX, Vieira MBCM, Bevilacqua PD, Brito LLA. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epid Serv Saúde* 2004; 13(2):79 - 92.
- Fayer R, Morgan UM, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 2000; 30(12-13):1305-22.
- Neill MA, Rice SK, Ahmad NV, Flanigan TP. Cryptosporidiosis: an unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 1996; 22(1):168-70.
- Werner H, Kuntsche J. Infection in the elderly- what is different? *Zeit für Geront Geriat* 2000; 33(5):350-56.
- Gambhir S, Jaiswal JP, Nath G. Significance of *Cryptosporidium* as an aetiology of acute infectious diarrhoea in elderly Indians. *Trop Med Int Health* 2003; 8(5):415-19.
- Meyers BR. Infectious diseases in the elderly: an overview. *Geriatrics* 1989; 44:4-6.
- Chantri T, Kavita P. Diarrheal diseases in the elderly. *Clin Geriatr Med* 2007; 23(4): 833-56.
- Mirzaei M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection in diarrheic and non-diarrheic humans in Iran. *Kor J Parasitol* 2007; 45(2): 133-37.
- Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonosis. *Int J Parasitol* 2000; 30:1369-77.
- Figueiredo HCP, Pereira Júnior DJ, Nogueira RB, Costa PRS. Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa. *Rev. Ciên Rural* 2004; 34(5):1625-27.
- Lallo MA, Bondan EF. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. *Rev Saud Publ* 2006; 40(1):120-25.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Demographic Census 2000: Population and Household Characteristics [Acced 03 February 2010] Available on line at: <http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2000/>.
- Oliveira CA, Germano PM. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo. II- Pesquisa de protozoários intestinais. *Rev Saud Publ* 1992; 26(5):332-35.
- Pereira CRA, Ferreira AP, Koifman RJ. Detecção de *Cryptosporidium parvum* em alfaces frescas para consumo cru :estudo de caso . *Gaia Scent* 2008; 2(2):31-6.
- Newman RD, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49(2):270-5.

28. Gennari SM, Kasai N, Pena HFJ, Cortez A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. Braz J Vet Res Anim Sci 1999; 36(2):87-91.
29. Causape AC, Quilez J, Sanchez-Acedo C, del Cacho E. Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. Vet Parasitol 1996; 67:161-167.
30. El-Ahraf A, Tacal JV, Sobih M, Amin M, Lawrence W, Wilcke BW. Prevalence of cryptosporidiosis in a dog and a human being in San Bernardino country. J Am Vet Med Assoc 1991;198(4):631-4.
31. Fayer R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC;1997. 251p.
32. Augustin-Bichil VG, Boch J, Henkel G. Kryptosporodien-infektionen bei hund und katze. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1984;97(5):179-81.
33. Simpson JW, Burnie AG, Miles RS, Scott JL, Lindsay DI. Prevalence of Giardia and *Cryptosporidium* infection in dogs from Edinburgh. Vet Rec 1988;123(17):445.
34. Gerba CP, Rose JB, Hass CN. Sensitive populations: who is at the greatest risk? Int J Food Microbiol 1996; 30:113-23.

Recebido: 30/03/2010

Revisado:13/08/2010

Aprovado:03/09/2010

ARTIGO 4

**Análise da prevalência de *Cryptosporidium* spp. em animais de companhia de idosos.
Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil**

**Analysis of the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in companion animals of elderly
population. Case study: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil**

**Análisis de prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en animales de compañía de
ancianos. Estudio de caso: Teresópolis, Río de Janeiro, Brasil**

Cassia Regina Alves Pereira^a

Aldo Pacheco Ferreira^b

Marco Aurélio. P. Horta^a

Rosalina Jorge Koifman^b

^a Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz (Ensp/Fiocruz)

^b Pesquisador da Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz (Ensp/Fiocruz)

Endereço para correspondência: Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, (Cesteh/Ensp/Fiocruz). Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - 21041-210, Manguinhos – Rio de Janeiro – Brasil, aldopachecoferreira@gmail.com

**Análise da prevalência de *Cryptosporidium* spp. em felinos de companhia de idosos.
Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil**

Analysis of the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in companion felines of elderly population. Case study: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil

**Análisis de prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en gatos de compañía de ancianos.
Estudio de caso: Teresópolis, Río de Janeiro, Brasil**

Resumo

Foi pesquisada a prevalência de criptosporidiose em gatos domésticos de companhia em idosos (acima de 60 anos de idade) de ambos os sexos, residentes no Município de Teresópolis e que compareceram a um posto de vacinação do município no período da vacinação contra gripe de 2009 e 2010. A prevalência de diarreia nos idosos foi 29,4% e nos felinos 24,5%. Foi identificada presença de 1 ou mais oocistos em 16,7% dos idosos e 12,7% nos felinos. A análise da razão de prevalência de diarreia evidenciou uma forte associação em idosos (RP = 4,37, IC a 95%: 2,67 - 7,16), porém com menor força de associação, mas ainda com significância estatística para felinos (RP = 2,16, IC a 95%: 1,06 - 4,39). Por de imunofluorescência confirmado pelo PCR houve semelhante força de associação em idosos (RP = 4,43, IC a 95%: 3,04 - 6,45), porém observou-se um aumento na força de associação para felinos (RP = 4,67, IC a 95%: 3,9 - 6,81). É preocupante, mas importante para a saúde pública, os achados obtidos com esta pesquisa por demonstrar a relação zoonótica do *Cryptosporidium* spp. presente nas amostras fecais dos animais de companhia do grupo populacional de idosos estudados.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*, prevalência, saúde do idoso, animais de companhia

Abstract

It was researched the prevalence of cryptosporidiosis in domestic cats in companion of elderly (over 60 years of age) of both sexes, residents in the city of Teresópolis and who attended a vaccination post in the municipality during the period of vaccination against influenza in 2009 and 2010. The prevalence of diarrhea in the elderly was 29.4% and 24.5% in cats. It was identified the presence of one or more oocysts in fecal material in 16.7% and 12.7% in elderly cats. The prevalence of diarrhea showed a strong association in elderly people (PR = 4.37, 95% CI: 2.67 to 7.16), but lower strength of association, but still statistically significant for cat (PR = 2.16, 95% CI: 1.06 - 4.39). By immunofluorescence confirmed by PCR was similar strength of association in elderly people (PR = 4.43, 95% CI: 3.04 to 6.45), but there was an increase in the strength of association for felines (PR = 4.67, 95% CI: 3.9 to 6.81). It is disturbing, but important to public health, the findings from this research, showing the relationship of zoonotic *Cryptosporidium* spp. present in fecal samples of companion animals from the population elderly studied.

Key words: *Cryptosporidium*, prevalence, health of the elderly, companion animals

Resumen

Se investigó la prevalencia de criptosporidiosis de la infección en los gatos domésticos en el compañero de edad avanzada (más de 60 años de edad) de ambos sexos, residentes en la ciudad de Teresópolis y que asistieron al puesto de vacunación en el municipio durante el período de vacunación contra la influenza en 2009 y 2010. La prevalencia de diarrea en ancianos fue de 29,4% y 24,5% en los gatos. Se identificó la presencia de uno o más oocistos de materia fecal en el 16,7% de los ancianos y 12,7% en gatos. La prevalencia de la diarrea mostró una fuerte asociación en ancianos (RP = 4.37, IC 95%: 2,67 a 7,16), pero menor fuerza de la asociación, pero aún estadísticamente significativas para el gato (PR = 2,16, IC 95%: 1:06-04:39). Por inmunofluorescencia confirmada por PCR fue la misma asociación en ancianos (RP = 4.43, IC 95%: 3,04 a 6,45), pero hubo un aumento en la fuerza de asociación para los felinos (PR = 4, 67, 95% CI: 3.9 a 6.81). Es preocupante, pero importante para la salud pública, los resultados de esta investigación, que demuestra la relación de enfermedades zoonóticas de *Cryptosporidium* spp. presente en las muestras fecales de los animales de compañía de la población de ancianos estudiados.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, prevalencia, salud de ancianos, animales de compañía

INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma importante zoonose responsável por manifestações clínicas de diarreias e gastroenterites, associado à dor abdominal, em seres humanos e animais domésticos causada por protozoários oportunistas do gênero *Cryptosporidium*.¹ É transmitida entre indivíduos por meio de oocistos que já são eliminados na forma infectante, sendo as principais vias de transmissão o contato direto (pessoa-a-pessoa), oral/fecal ou indiretamente pela ingestão de alimentos ou água contaminados (cistos e oocistos).² Sua distribuição é cosmopolita apresentando vários hospedeiros onde o *C. muris* foi a primeira espécie descrita, em 1907 por Tyzzer, sendo seu desenvolvimento endógeno restrito às glândulas estomacais de roedores. O *C. parvum*, também descrito por Tyzzer (1912) ocorre principalmente no intestino delgado de vários mamíferos, incluindo o homem.³

O protozoário parasita *Cryptosporidium* emergiu como um importante contaminante da água, responsável por vários surtos de criptosporidiose, afetando até meados de 2001, aproximadamente 427 mil pessoas em todo mundo. Várias espécies do gênero *Cryptosporidium* foram descritas, mas somente o *C. parvum* têm sido associado às doenças gastrintestinais,^{3,4} apresentando-se como uma doença fatal em imunocomprometidos que pode debilitar severamente indivíduos imunocompetentes.² Oocistos de *Cryptosporidium* podem sobreviver por vários meses no ambiente aquático e são também resistentes à desinfecção por cloro utilizada no tratamento convencional de água.⁵

O *C. parvum* tem sido reconhecido mundialmente como um dos maiores contaminantes das águas de consumo.⁵ A descrição da contaminação dos recursos hídricos pela presença de oocistos, provavelmente de origem humana e animal, estão freqüentemente associadas a surtos diarreicos e conseqüentemente a altas taxas de morbidade e mortalidade, atingindo preferencialmente imunocomprometidos e crianças, mas também imunocompetentes e animais.^{2,6} Embora de características endêmicas, a diarreia pode apresentar casos relacionados entre si (clínica, distribuição espaço-temporal, fonte de infecção) que são capazes de caracterizar um surto. Estudos desenvolvidos nos anos de 1980 estabeleceram que o *Cryptosporidium* não é espécie-específico⁴ e que linhagens de uma espécie animal podem infectar um amplo espectro de outras espécies, indicando que os hospedeiros e reservatórios são múltiplos na natureza e que uma espécie animal pode contrair a infecção de outra.^{5,6}

A ausência de uma terapia específica para o seu tratamento e o alto número de oocistos excretados por indivíduos infectados, em torno de 10^9 a 10^{10} oocistos, assim como a ampla variedade de hospedeiros que atuam como reservatório da infecção ou favorecem a transmissão cruzada ou aumentam o potencial de disseminação da criptosporidiose.⁷ A excreção dos oocistos pode ou não coincidir com o período sintomático da doença, pode haver imprecisões quanto a sua real ocorrência, pela carência de maiores informações da incidência em indivíduos assintomáticos.²

A população de idosos apresenta uma maior susceptibilidade à criptosporidiose.^{8,9,10} O número de casos fatais por patógenos entéricos específicos apresentam-se de 10 a 100 vezes maior em idosos que na população em geral.^{11,12} Mirzaei¹³ observou que em diferentes grupos etários da população do Irã uma prevalência do *C. parvum* em indivíduos acima de 51 anos dos quais 25% apresentavam diarreia, enquanto que 3,5% dos positivos não apresentaram quadro diarréico.

Estudos destacam o papel dos animais de estimação, em especial cães e gatos, aportando significantes benefícios para as pessoas e para a sociedade, contribuindo para o desenvolvimento físico, social e emocional das crianças e com o bem-estar de seus proprietários, em particular de idosos.¹⁴ No entanto, animais de companhia podem constituir importante fonte de infecção para o homem, determinando doenças genericamente denominadas zoonoses, como a criptosporidiose.^{14,15} Caso agravante quanto a essa infecção dá-se pelo fato que grande parte dos animais infectados serem portadores assintomáticos.¹⁴

Estudos reportam prevalência de criptosporidiose e giardíase em populações de felinos é variável, geralmente alto, porém a maioria apresentam valores em torno de 12%.¹⁶ A variabilidade é parte devida a diversidade de técnicas usadas para sua detecção, sendo a técnica mais sensível a reação em cadeia de polimerase (PCR).^{17,18}

Diante deste quadro ainda pouco explorado se insere este artigo que objetiva evidenciar a prevalência de criptosporidiose em animais domésticos de companhia, numa amostra da população de idosos do município de Teresópolis.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Estudo

O município de Teresópolis foi criado em 06 de julho de 1891 através do decreto nº 280, fazendo parte da região serrana do Estado do Rio de Janeiro. Apresenta os seguintes municípios como limítrofes: Petrópolis, São José do Rio Preto, Sumidouro, Nova Friburgo, Cachoeiras de Macacu e Guapimirim, e corresponde a 11,1% da área da Região Serrana. Ocupa uma área de 772,4 km² e tem altitude da sede de 873 m. Suas coordenadas compreendem os valores de 22° 24' 43" de latitude e 42° 57' 57" de longitude. De acordo com o Censo Demográfico do IBGE ¹⁹, o Município de Teresópolis apresenta um total de 138.081 habitantes com 115.198 (83,5%) habitantes na zona urbana e 22.883 (16,5%) habitantes na zona rural, apresentando uma densidade demográfica de 158,7 hab/km² e taxa de urbanização de 83,9%.

População de Estudo

Foram elegíveis para estudo, idosos (acima de 60 anos de idade) de ambos os sexos residentes no Município de Teresópolis, que tenham em domicílio gatos, e que compareceram a um posto de vacinação do município no período das Campanhas nacionais de vacinação contra gripe de 2009 e 2010, respectivamente. Foram identificados 102 idosos nessas duas campanhas os quais concordaram com o termo de consentimento para o estudo, preenchendo questionário com dados de anamnese, dados de localização da residência e condições de manejo do animal no domicílio. Considerou-se apenas um felino por proprietário idoso independente de haverem mais animais de companhia no domicílio.

Amostragem

Obtenção das amostras de fezes. Para a colheita das amostras de fezes foram utilizados frascos descartáveis (coletor universal), contendo solução conservadora de MIF (merbromino, iodo e formol). Os recipientes foram entregues aos responsáveis após identificação prévia com o número do domicílio e o nome do morador amostrado naquela residência. Na primeira visita foram dadas as instruções de como colher a amostra fecal e foi marcada a data de retorno para recolhimento da mesma (uma semana após o primeiro contato).

Exames parasitológicos

Foram recolhidas amostras fecais das pessoas participantes e de seus felinos e foram processadas no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal Fluminense e no Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisas Evandro Chagas.

As amostras fecais foram conservadas sob duas formas: formalina tamponada a 10% sob refrigeração a 4°C e *in natura* congeladas a -20°C. Todas as amostras formolizadas foram submetidas à identificação de oocistos de *Cryptosporidium* através de esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada.²⁰ De igual forma, todas as amostras congeladas foram avaliadas pelo teste imunoenzimático para identificação através de anticorpos monoclonais e policlonais contra o antígeno de superfície do *Cryptosporidium* spp. e quando positivas foram confirmadas pela extração do DNA e identificação por PCR.²¹

Dentro das residências foram verificadas condições de manejo e sanidade do animal com dados gerais de anamnese envolvendo o estado geral do animal, suas mucosas, temperatura retal, apresentação das fezes, histórico de diarreia, alimentação por ração ou não, procedência da água ingerida e local de permanência do animal (interno ou externo).

Para o instrumento aplicado, os participantes davam informação sobre ao sexo, a idade do proprietário agrupados por faixa etária (60 a 64 anos, 65 a 69 anos, 70 a 74 anos e acima de 75 anos), hábito de tabagismo, estado civil (solteiro, união qualquer ou viúvo) e a presença de diarreia. Quanto aos felinos, os participantes respondiam sobre variáveis como sexo, idade do animal (não definida, 0 a 2,0 anos, 2,1 a 4,0 anos, 4,1 a 6,0 anos e acima de 6,1 anos), estimativa de peso (não definido, 1,0 a 2,5kg, 2,6 a 4,0kg, 4,1 a 5,5kg e 5.6 a 7,0kg), tipo de água ingerida (outra fonte, filtrada ou clorada), permanência no interior, exterior da casa ou ambos e presença de diarreia.

Análise Estatística

A prevalência da infecção por *Cryptosporidium* spp. nos felinos foi calculada para os fatores de risco sexo, idade, peso, tipo de ingestão de água (filtrada, clorada ou outra fonte), ocorrência de diarreia e frequência de domicílio (interior ou exterior da casa). Para os proprietários dos felinos, utilizaram-se os seguintes fatores de risco: sexo, idade, fumo (presença ou ausência do hábito), ocorrência de diarreia e estado civil. Para os felinos e seus respectivos donos foram obtidas por meio de variáveis categorizadas, o caso de

Cryptosporidium spp. por meio de Ziehl-Neelsen (presença ou ausência), o número de oocistos por campo (nenhum, 1, 2, 3, acima de 4), e caso de *Cryptosporidium* spp. por meio de Elisa (presença ou ausência). Foi obtida a razão de prevalência de diarreia em proprietários idosos e seus respectivos felinos segundo a positividade para *Cryptosporidium* spp., pelos métodos Ziehl-Neelsen modificada, número de oocistos por campo e PCR. Uma análise univariada foi realizada objetivando verificar o efeito de cada possível fator de risco usando distribuição de frequência do fator em relação à positividade por *Cryptosporidium* spp. A seguir, foi realizada uma regressão logística incondicional para testar os efeitos das variáveis independentes sobre a variável caso de *Cryptosporidium* spp. por meio de Ziehl-Neelsen (presença ou ausência) como variável dependente. Valores da associação entre as variáveis por meio de X^2 foi obtido. A razão de chance estimada (OR) e seus intervalos de confiança (95 % IC) foram obtidas como medidas do efeito preditor.

Ética

Registre-se que o Comitê de Ética em Pesquisas da Ensp/Fiocruz, aprovou o presente estudo, estando os procedimentos de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Resultados

A média de idade dos 102 idosos proprietários de felinos de companhia participantes deste estudo foi de $66,7 \pm 4,58$, mediana de 66 anos sendo a idade mínima de 60 anos e a máxima de 82 anos. O grupo etário de 65 a 69 anos e mais concentrou 43,1% dos participantes e observou-se um predomínio de idosos do sexo feminino (75,5%). Observou-se 82,4% dos idosos livres do hábito de tabagismo e predomínio estado civil de 84,3% para união de qualquer tipo. Os felinos fêmeas (59,8%) predominaram sobre os machos (40,2%) sendo a maioria sem idade estimada (65,7%) e peso estimado de 2,6 a 4,0kg (67,6%) na maior parte. 79,4% dos felinos transitam tanto na parte interna quanto externa do domicílio e a maioria (56,9%) ingere água de outras fontes que não seja água filtrada ou clorada.

A prevalência de diarreia nos proprietários idosos foi de 29,4% ao passo que nos felinos foi de 24,5%. Foi identificada presença de 1 ou mais oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada em 16,7% dos idosos proprietários e

12,7% dos felinos de companhia. Ambos, idosos (8,8%) e felinos (6,9%) apresentaram apenas 1 oocisto por campo. Quanto ao método imunoenzimático, 8,8% dos idosos e 3,9% dos felinos expressaram positividade para a presença do *Cryptosporidium*, sendo todos os positivos confirmados pela reação por PCR (**Tabela 1**).

Tabela 1. Distribuição de proprietários idosos e felinos em dados de diarreia, presença de oocistos nos exames laboratoriais e número de oocistos por campo

A análise da razão de prevalência de diarreia segundo a presença de oocistos pelo método de coloração Ziehl-Neelsen modificada evidenciou uma forte associação em idosos (RP = 4,37, IC a 95%: 2,67 - 7,16), porém com menor força de associação, mas ainda com significância estatística para felinos (RP = 2,16, IC a 95%: 1,06 – 4,39). Já pelo método de imunofluorescência confirmado pelo PCR houve semelhante força de associação em idosos (RP = 4,43, IC a 95%: 3,04 – 6,45), porém observou-se um aumento na força de associação para felinos (RP = 4,67, IC a 95%: 3,9 – 6,81). Esses resultados quando estratificados por número de oocistos por campo demonstrou efeito dose resposta para idosos com aumento das medidas de efeito, estabilizando-se para 2 ou mais oocistos numa RP de 5,31 (IC 95%: 1,08 - 9,54). Diferente comportamento observou-se na dose resposta para felinos com aumento das medidas de efeito a medida que aumenta o número de oocistos por campo embora seus respectivos IC a 95% não sejam estatisticamente significativos (**Tabela 2**).

Tabela 2. Razão de prevalência de diarreia em proprietários idosos e felinos segundo a positividade para *Cryptosporidium* spp. pelos métodos Ziehl-Neelsen modificada, número de oocistos por campo e PCR

Não foram observadas relação entre a presença de *Cryptosporidium* spp. e as variáveis obtidas como possíveis fatores de risco. Entretanto, alguns resultados podem ser destacados. Em relação aos animais, percebeu-se um pouquíssimo aumento da chance de infecção por *Cryptosporidium* spp. para as fêmeas em relação aos machos (OR=1.08, IC=0.32-3.59). Observou-se um aumento da chance de infecção do felino com o aumento

da idade do mesmo (OR=1.22, 1.90, 2.85), apesar de não estatisticamente significativa. Em relação ao tipo de água ingerida pelo animal, observa-se um efeito protetor com a redução da chance de infecção à medida que o animal bebe água filtrada (OR= 0.80, IC=0.22-2.90) e clorada (OR=0.78, IC=0.08-7.11). A diarreia mostrou-se como um fator resultado da infecção por *Cryptosporidium* spp. (OR=3.15, IC= 0.94-10.51), sendo que o não encontro de significância neste caso pode ser puramente um resultado do tamanho amostral (**Tabela 3**).

Tabela 3. Análise de regressão logística para determinar os fatores associados da infecção por *Cryptosporidium* spp. em felinos do município de Teresópolis – RJ.

Para os fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. nos proprietários dos animais, a regressão logística não apresentou associações significativas ao nível de $p < 0.05$, com exceção da variável diarreia. Da mesma forma, alguns resultados podem ser destacados. Observou-se uma maior chance de infecção para as mulheres em relação aos homens (OR=2,78, IC=0.59-13-12), e um aparente efeito protetor pela infecção com o aumento da idade das pessoas (OR=0.37, 0.57). A ocorrência de diarreia apresentou uma forte associação com a infecção por *Cryptosporidium* spp. (OR=20.12, IC=5.16-78.44) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Análise de regressão logística para determinar os fatores associados da infecção por *Cryptosporidium* spp. em moradores do município de Teresópolis – RJ.

DISCUSSÃO

Os 102 indivíduos idosos residentes em Teresópolis-RJ que compuseram a amostra da população estudada que demandaram a campanha de vacinação contra a gripe nos anos de 2009 e 2010 eram predominantemente do sexo feminino, proprietários de pelo menos um felino doméstico, animal de escolha para companhia e na sua maioria permitem que os animais domiciliados transitem dentro e fora das residências.

A elevada prevalência *Cryptosporidium* em animais na região de Teresópolis é compatível com os achados de Pereira e colaboradores (2008)²², quando detectaram

elevada contaminação (100%) deste protozoário nas verduras consumidas pela população do município de Teresópolis, sinalizando dados preocupantes ao tratamento de água e de esgoto devido a não-ações de saneamento.

O estudo da população de gatos (102) através da identificação de oocistos pela presença de *Cryptosporidium* spp. pela coloração de ZNM evidenciou uma moderada prevalência (12,7%), compatível com a variação global de resultados em diferentes países como 3,8% no Japão²³, 8,1% no Reino Unido²⁴, 12,3% na Escócia²⁵ e os 24,5% de 200 felinos de Turin na Itália.²⁶ Semelhante estudo realizado em 51 felinos obteve uma prevalência de 3,9% pela coloração verde de malaquita no município de Andradina-SP.²⁷

A população idosa, na maioria das vezes, depende psicologicamente da companhia de animais, inclusive por indicação médica. As doenças infecciosas são causas comuns do aumento de morbidades e mortalidades em pacientes idosos e revelam como um problema freqüente na prática diária da geriatria.¹² As infecções em idosos são de características diferenciadas das apresentadas na população jovem, sendo essas diferenças atribuídas às alterações imunológicas ou mau funcionamento orgânico (que declinam com a idade).¹¹

A positividade para *Cryptosporidium* nos animais de conviviam com idosos de 70-74 anos e com 75 ou mais (43,9%) foi muito elevada configurando uma maior probabilidade de exposição desta parasitose em grupos populacionais considerados mais suscetíveis. Estudo realizado no Iran¹³ com 400 indivíduos o grupo acima de 51 anos que apresentava historia de diarréia apresentava uma prevalência de 25% de positividade para o *Cryptosporidium*. Pode-se também observar que a população canina de um animal por domicilio comparada aos casos de superpopulação (mais que 5 animais), apresentou menor prevalência de diarréia provavelmente como resultado do menor contato com outros animais (via oral/fecal) evitando uma contaminação cruzada. Observou-se também que os animais que eram domiciliados dentro das residências apresentaram um razão de prevalência protetora, com redução da probabilidade de apresentar diarréia, provavelmente pelo fato do ambiente interno estar em condições de menor exposição a infecção do *Cryptosporidium*.

Os animais domésticos são fontes de infecção assintomáticos do *Cryptosporidium*, albergando-os em seu trato intestinal e veiculando oocistos viáveis ao ambiente através de suas fezes.^{2,3} O preocupante é que a alta prevalência de criptosporidiose só se manifesta clinicamente com quadro diarréico nos casos de debilidade do animal.⁶ A prevalência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. aumenta a medida que aumenta a densidade

populacional de animais de companhia por residência. Tal fato sinaliza a necessidade de um maior aprofundamento dessa investigação, uma vez que existem poucos estudos que exploram a relação criptosporidiose na população humana com animais de companhia. Devido a isso, deve-se melhorar a avaliação do nível que tal relação se conforma, ou seja, idosos – animais de companhia, pelo potencial ciclo de exposição aos idosos, justificando dessa maneira a tentativa de conhecimento do que está ocorrendo neste grupo específico da população, aqui preliminarmente estudada.

A utilização de animais como terapia vem sendo utilizada desde o século XVIII, focada ao tratamento de doentes mentais.¹⁴ Pesquisas subseqüentes voltaram-se aquelas sobre que efeitos a interação homem-animal incidiria favoravelmente sobre parâmetros fisiológicos e saúde cardiovascular humana.⁹ Observou-se que tal interação poderia promover a saúde física através de três mecanismos básicos que incluem a diminuição da solidão e da depressão; diminuindo a ansiedade, os efeitos do sistema nervoso simpático e aumentando o estímulo para prática de exercícios. Conseqüentemente, há um impacto positivo no dia-a-dia repercutindo numa melhoria na qualidade de vida e na saúde física dos indivíduos.^{8,11}

Inicia-se o século XXI amargando diversos problemas sociais sérios, com reflexos diretos sobre a saúde pública. Dentre estes, o aumento da expectativa de vida, como conseqüência aumentando significativamente a população idosa, que da forma que está a atenção à saúde neste grupo específico, ainda incipiente, evidentemente, vários fatores contribuirão para o aumento da incidência de doenças parasitárias, nas quais a criptosporidiose sinaliza uma expansão preocupante, pelas características do parasito e pela proximidade da exposição pelos animais de companhia.

Enfim, ponderamos serem pertinentes os achados obtidos com esta pesquisa por demonstrar a relação zoonótica do *Cryptosporidium* spp. presente nas amostras fecais dos animais de companhia do grupo populacional de idosos estudados.

REFERÊNCIAS

1. O'donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Int J Parasitol 1995; 25(2): 139-95.
2. Teunis PFM, Havelaar AH. Risk assessment for protozoan parasites. Internat Biodegr Biodet 2002; 9:122-46.
3. Tzipori S. Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev. 1983; 47: 84-86.
4. Fayer R., Ungar BLP. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. Microbiological Reviews 1986; 458-483.
5. Heller L, Bastos RKX, Vieira MBCM, Bevilacqua PD, Brito LLA. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. Epid Serv Saúde 2004; 13(2):79 – 92.
6. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 1989.
7. Figueiredo HCP, Pereira Júnior DJ, Nogueira RB, Costa PRS. Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. Cien Rural 2004; 34(5):1625-27.
8. Neill MA, Rice SK, Ahmad NV, Flanigan TP. Cryptosporidiosis: an unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients. Clin Infect Dis 1996; 22(1):168-70.
9. Werner H, Kuntsche J. Infection in the elderly-what is different? Zeit für Geront Geriat 2000; 33(5):350-56.
10. Gambhir S, Jaiswal JP, Nath G. Significance of *Cryptosporidium* as an aetiology of acute infectious diarrhoea in elderly Indians. Trop Med Int Health 2003; 8(5):415–19.
11. Meyers BR. Infectious diseases in the elderly: an overview. Geriatrics 1989; 44:4-6.
12. Chantri T, Kavita P. Diarrheal diseases in the elderly. Clin Geriatr Med 2007; 23(4): 833-56.

13. Mirzaei M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection in diarrheic and non-diarrheic humans in Iran. *Kor J Parasitol* 2007; 45(2): 133-37.
14. Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonosis. *Int J Parasitol* 2000; 30:1369-77.
15. Lallo MA, Bondan EF. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães de instituições da cidade de São Paulo, Brasil. *Rev S Publ* 2006; 40(1):120-125.
16. Nash AS, Mtambo MM, Gibbs HA. *Cryptosporidium* infection in farm cats in the Glasgow area. *Veterinary Record* 1993; 133-577.
17. McGlade TR, Robertson ID, Elliot AD, Thompson RC. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Veterinary Parasitology* 2003; 197-205.
18. Gonçalves EMN, Araujo RS, Orban M, Matté GR, Matté MH, Corbett CEP. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2008; 50(3): 165-167.
19. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeto Teresópolis. Hydrology and elevation Teresópolis (Map). Scale Layer: 1:50.000. 4d ed., DAMTD, 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>
20. De Carli GA, Saraiva PJ. Diagnóstico de Laboratório da Criptosporidiose Humana. *Rev. Bras. Anal. Clín.* 1991; 23(2) 26-30.
21. Higgins JA, Jenkins MC, Shelton DR, Fayer R, Karns JS. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 64(11) 5321-5324.
22. Pereira CRA, Ferreira AP, Koifman RJ. Detecção de *Cryptosporidium parvum* em alfaces frescas para consumo cru. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. *Gaia Scientia* 2008; 2(2):31-6.
23. Arai H, Fukuda Y, Hara T, Funakosgi Y, Kanebo S, Yoshida T, Asahi, H, Kumada M, Kato K, Koyama T. Prevalence of *Cryptosporidium* infection among domestic cats in

Tokyo metropolitan district, Japan. Japanese Journal of Medical Science and Biology 1990; 43:7-14.

24. Mtambo MM, Nash AS, Blewett DA, Smith HV, Wright S. *Cryptosporidium* infection in the cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. Veterinary Record 1991; (129) 502-504.

25. Nash AS, Mtambo MMA, Gibbs HA. *Cryptosporidium* infection in farm cats in the Glasgow area. Veterinary Record 1993; (133) 576-577.

26. Rambozzi L, Menzano A, Mannelli A, Romano S, Isaia MC. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cats in Turin and analysis of risk factors. Journal of Feline Medicine and Surgery 2007; (9)392-396.

27. Coelho WMD, Amarante AFT, Soutello RVG, Meireles MV, Bresciani KDS. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo. Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal, 2009; 18(2) 46-49.

Tabela 1. Distribuição de proprietários idosos e felinos em dados de diarreia, presença de oocistos nos exames laboratoriais e número de oocistos por campo.

Variáveis		
Diarreia	Número	%
Proprietários idosos		
Não	72	70,6
Sim	30	29,4
Felinos		
Não	77	75,5
Sim	25	24,5
Positividade para <i>Cryptosporidium</i> spp. em ZNM	Número	%
Proprietários idosos		
Não	85	83,3
Sim	17	16,7
Felinos		
Não	89	87,3
Sim	13	12,7
Número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por campo	Número	%
Proprietários idosos		
1	9	8,8
2	4	3,9
3	3	2,9
4 ou mais	1	1,0
Felinos		
1	7	6,9
2	4	3,9
3	1	1,0
4 ou mais	1	1,0
Positividade para <i>Cryptosporidium</i> spp. em TI/PCR	Número	%
Proprietários idosos		
Não	93	91,2
Sim	9	8,8
Felinos		
Não	98	96,1
Sim	4	3,9

ZNM = Ziehl-Neelsen modificada

TI/PCR = Teste Imunoenzimático confirmado pela reação em cadeia de polimerase (PCR)

Tabela 2. Razão de prevalência de diarreia em proprietários idosos e felinos segundo a positividade para *Cryptosporidium* spp. pelos métodos Ziehl-Neelsen modificada, número de oocistos por campo e PCR

Razão de Prevalência					
Variáveis	Diarreia			RP	IC (95%)
Presença de oocistos por ZNM	Sim Nº (%)	Não Nº (%)	Total Nº (%)		
Proprietários Idosos					
Sim	14 (82,35)	3 (17,35)	17 (16,67)	4,37	2,67 – 7,16
Não	16 (18,82)	69 (81,18)	85 (83,33)		
Felinos					
Sim	6 (46,15)	7 (53,85)	13 (12,75)	2,16	1,06 – 4,39
Não	19 (21,35)	70 (78,65)	89 (87,25)		
Número de oocistos por campo	Sim Nº (%)	Não Nº (%)	Total Nº (%)	RP	IC (95%)
Proprietários Idosos					
1	6 (66,66)	3 (33,34)	9 (8,82)	3,54	2,15 – 4,92
2	4 (100,00)	0 (0,00)	4 (3,92)	5,31	1,08 – 9,54
3	3 (100,00)	0 (0,00)	3 (2,95)	5,31	0,25 – 10,36
4 ou mais	1 (100,00)	0 (0,00)	1 (0,98)	5,31	0,00 – 14,68
Felinos					
1	2 (28,57)	5 (71,43)	7 (6,86)	1,34	0,63 – 2,05
2	2 (50,00)	2 (50,00)	4 (3,92)	2,34	0,34 – 4,34
3	1 (100,00)	0 (0,00)	1 (0,98)	4,68	0,21 – 9,27
4 ou mais	1 (100,00)	0 (0,00)	1 (0,98)	4,68	0,21 – 9,27
Presença de oocistos por TI / PCR	Sim Nº (%)	Não Nº (%)	Total Nº (%)	RP	IC (95%)
Proprietários Idosos					
Sim	9 (100,00)	0 (00,00)	9 (8,82)	4,43	3,04 – 6,45
Não	21 (22,58)	72 (77,42)	93 (91,18)		
Felinos					
Sim	4 (100,00)	0 (00,00)	4 (3,92)	4,67	3,19 – 6,81
Não	21 (21,43)	77 (78,57)	98 (96,08)		

ZNM = Ziehl-Neelsen modificada

TI/PCR = Teste de Imunofluorescência confirmado pela reação em cadeia de polimerase (PCR)

RP = Razão de Prevalência

IC = Intervalo de Confiança

Tabela 3. Análise de regressão logística para determinar os fatores associados da infecção por *Cryptosporidium* spp. em felinos do município de Teresópolis – RJ.

Variável	Categoria	Testado	Positivo	(N=9)	X ²	OR	95% I.C.	P	
			N	%	P valor				
Sexo	Macho	41	5	12,2	0,89	1			
	Fêmea	61	8	13,1		1,08	0,32 – 3,59	0,89	
Idade (anos)	indefinida	67	7	10,4	0,81	1			
	0 a 2,0	8	1	12,5		1,22	0,13 – 11,46	0,85	
	2,1 a 4,0	22	4	18,2		1,90	0,50 – 7,25	0,34	
	>4,1	5	1	25,0		2,85	0,26 – 31,32	0,39	
Estimativa de peso	1,0 a 2,5	22	4	18,2	0,67	1			
	2,6 a 4,0	69	9	13,0		0	0,67	0,18 – 2,45	0,55
	>4,1	11	0	0		-	-	-	
Tipo de Ingestão de água	Outra	58	8	13,8	0,78	1			
	Filtrada	35	4	11,4		0,80	0,22 – 2,90	0,74	
	Clorada	9	1	11,1		0,78	0,08 – 7,11	0,82	
Frequência no domicílio	Ambos	81	12	14,8	0,24	1			
	Interior	8	0	0		-			
	Exterior	13	1	7,7		0,47	0,057 – 4,03	0,49	
Diarréia	Não	77	7	9,09	0,06	1			
	Sim	25	6	24		3,15	0,94 – 10,51	0,06	

Tabela 4. Análise de regressão logística para determinar os fatores associados da infecção por *Cryptosporidium* spp. em moradores do município de Teresópolis – RJ.

Variável	Categoria	Testado	Positivo		X ² P valor	OR	95% I.C.	P
			N	(N=9) %				
Sexo	Masculino	25	2	8,0	0,15	1	0,59 – 13,12	0,19
	Feminino	77	15	19,5		2,78		
Idade (anos)	60 a 64	31	8	25,0	0,28	1	0,11 – 1,27	0,11
	65 a 69	44	5	11,1		0,37		
	>70	24	4	16,0		0,57		
Fumo	Não	84	15	17,9	0,46	1	0,11 – 2,77	0,49
	Sim	18	2	11,1		0,57		
Est. civil	Solteiro	6	1	16,7	0,95	1	0,10 – 8,97	0,98
	União	86	14	16,3		0,97		
	qualquer viúvo	10	2	20,0		1,25		
Diarréia	Não	72	3	4,2	0,001	1	5,16 – 78,44	<0,001
	Sim	30	14	46,7		20,12		