



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

RAISSA NOVAIS RODRIGUES

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E PREVALÊNCIA DE *Cryptosporidium* sp., *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* EM CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

FORTALEZA

2014

RAISSA NOVAIS RODRIGUES

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E PREVALÊNCIA DE *Cryptosporidium* sp., *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* EM CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.
Coorientadora: Dra. Ila Fernanda Nunes Lima.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

R616p Rodrigues, Raissa Novais.
Perfil epidemiológico e prevalência de *Cryptosporidium sp.*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* em crianças com e sem diarreia no semiárido brasileiro / Raissa Novais Rodrigues. -2014.
58 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2014.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

Coorientação: Profa. Dra. Ila Fernanda Nunes Lima.

1. *Cryptosporidium*. 2. *Entamoeba histolytica*. 3. Saúde Pública. I. Título.

CDD 660.6

RAISSA NOVAIS RODRIGUES

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E PREVALÊNCIA DE *Cryptosporidium* sp., *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* EM CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Ila Fernanda Nunes Lima (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a. Marjorie Moreira Guedes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Antonio Vinicius Silva dos Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTO

A minha família, minha mãe Maria Moema Leite Novais Rodrigues, meu pai João Catarino Pereira Rodrigues, minha irmã Katherine Novais Rodrigues, que são fundamentais para mim e sempre estiveram ao meu lado nos momentos de felicidade e de angústias.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá, pelo aprendizado durante esse pouco tempo que passei no LDI, desde a realização de experimentos à escrita desse trabalho, e por toda a sua disponibilidade principalmente em momentos urgentes.

A minha Coorientadora Dr^a Ila Fernanda Nunes Lima, por toda a dedicação, grande paciência e simpatia durante essas últimas semanas, por ter sempre encontrado um tempo para me ajudar quando o Prof. Alexandre não estava presente. Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, por me receber no seu grupo de excelência como aluna de iniciação científica, que foi de importância indescritível para o meu desenvolvimento científico durante a graduação.

À Dr^a. Marjorie Moreira Guedes, por aceitar participar da banca e, assim, contribuir nesse trabalho.

A todos os meus colegas e amigos do grupo do Laboratório de Doenças Infecciosas. Obrigada, José Amadeus, por ser a peça fundamental para o funcionamento desse laboratório, resolvendo todo e qualquer problema, e ajudando a manter o bom astral no ambiente de trabalho. A Mara, Vinícius e Pedro Henrique, por terem me ajudado durante toda a minha estadia no LDI, no aprendizado de novos experimentos, na escrita desta monografia e por serem grandes amigos. As minhas queridas amigas piauienses, Ana Karolina e Herlice, por todos os momentos de companhia, ajuda e risadas. Todos vocês tornaram cada dia no laboratório especialmente único.

Aos meus amigos da primeira turma de Graduação em Biotecnologia, especialmente aos que pertencem às "Comadres" e à "Panela". Obrigada por todas as conversas, piadas, confissões, cafés e apoio.

A todos os amigos que fiz durante o Ciências sem Fronteira, por terem compartilhado momentos inesquecíveis e, principalmente, as minhas roommates Grace, Michelle e Victoria por terem sido o meu apoio e a minha família no Canadá.

Às agências CAPES e CNPq pelo fomento da pesquisa no que concerne a sua infraestrutura e desenvolvimento.

“True wealth is having the knowledge to maneuver and navigate the mental obstacles that inhibit your ability to soar.” (RuPaul)

RESUMO

As parasitoses intestinais ainda constituem um dos principais problemas de saúde pública, apresentando-se de forma endêmica em diversas áreas do Brasil. Podem apresentar estreita relação com fatores sociodemográficos e higiênico-sanitários, tais como: precárias condições socioeconômicas, consumo de água contaminada, ausência de saneamento básico e outros, sendo frequentemente a população infantil a mais atingida. O objetivo deste trabalho foi investigar, através do uso da tecnologia xMAP, a prevalência de *Cryptosporidium* sp, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* em crianças nas cidades de Crato-CE, Picos-PI e Ouricuri-PE, do Semiárido Brasileiro, e os principais fatores envolvidos na epidemiologia dessas enteroparasitoses. Foram analisadas 600 amostras de fezes de crianças com ou sem diarreia, de ambos os sexos, e com faixa etária de dois a 36 meses, para verificar a presença dos protozoários. O diagnóstico molecular foi realizado por tecnologia xMAP. Em seguida, foram analisados parâmetros socioeconômicos e sanitários. Observou-se a presença de pelo menos um parasita em 26% das amostras. A espécie de maior prevalência foi *G. lamblia* (85,3%), seguida de *Cryptosporidium* sp. (15,4%) e *E. histolytica* (6,4%). Essas infecções caracterizaram-se pelo predomínio monoparasitário em 93,5% das crianças infectadas. Diante os dados observados, ficou evidente a associação direta entre os fatores renda salarial familiar, tipo de esgoto presente na residência e tratamento da água antes de utilizá-la para beber e a prevalência dos protozoários na população estudada.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* sp, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*

ABSTRACT

Intestinal parasites still constitute a major public health problem, as an endemic form in several areas of Brazil. They may have close relationship with sociodemographic and hygienic and sanitary factors, such as poor socioeconomic conditions, consumption of contaminated water, lack of sanitation and others, often being the child the most affected population. The objective of this study was to investigate through the use of the xMAP technology the prevalence of *Cryptosporidium* sp, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* in children in the cities of Crato-CE, Picos-PI and Ouricuri-PE, from the Brazilian semiarid, and the main factors involved in intestinal parasites epidemiology. We analyzed 600 stool samples from children with or without diarrhea, of both sexes and aged from two to 36 months for the presence of protozoa *E. histolytica*, *Cryptosporidium* sp, and *G. lamblia*. The molecular diagnostic tests were done by xMAP technology. Then socioeconomic and health parameters were analyzed. It was observed the presence of a parasite at least 26% of the samples. *Giardia lamblia* was most prevalent (85.3%), followed by *Cryptosporidium spp* (15.4%) and *Entamoeba histolytica* (6.4%). These infections were characterized by the predominance of monoparasites (93.5%) in the infected children. Given the observed data, it became apparent the direct relationship between the family wage income, type of sewage present in the residence and treatment of water before using it for drinking and the prevalence of protozoa in the population studied.

Keywords: *Cryptosporidium* sp, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium sp</i> consistindo de fases assexual e sexual.....	16
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	18
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
Figura 4 – Microesferas de Luminex.....	23
Figura 5 – Fluxograma da técnica de extração de DNA fecal.....	27
Figura 6 – Distribuição da população baseada na renda familiar de até dois salários mínimos.....	33
Figura 7 – Distribuição da população em relação ao tipo de tratamento da água antes de utilizá-la para beber.....	37
Figura 8 – Distribuição da população de acordo com o tipo de esgoto presente na residência.....	38
Figura 9 – Prevalências das infecções simples e associações, por espécies de protozoários intestinais, na população.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes de diagnóstico relacionados com os protozoários, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos.....	29
Tabela 2 – Distribuição da população de estudo de acordo com o sexo e a idade.....	32
Tabela 3 – Distribuição da população de acordo com a ocorrência de três ou mais fezes nas últimas 24 horas.....	32
Tabela 4 – Distribuição da população segundo a renda familiar e a presença de parasitas..	34
Tabela 5 – Caracterização da sub-população caso-controle segundo o sexo e a idade.....	35
Tabela 6 – Distribuição da população quanto à presença de parasitas e à origem da água de beber.....	36
Tabela 7 – Distribuição da população quanto à realização de tratamento da água antes de utilizá-la para beber e à presença de parasitas.....	37
Tabela 8 – Distribuição da população que possui fossa ou rede/esgoto público em relação à presença de parasita.....	38
Tabela 9 – Prevalência das infecções simples e das associações de protozoários intestinais na população positiva; e amostras negativas para todos os parasitas.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ASL	Tampão de lise, do inglês <i>Stool Lysis buffer</i>
AW1	Tampão de lavagem 1, do inglês <i>Wash buffer 1</i>
AW2	Tampão de lavagem 2, do inglês <i>Wash buffer 2</i>
CE	Ceará
cMIF	Média da Intensidade de Fluorescência corrigida, do inglês <i>Corrected Mean Fluorescence Intensity</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético, do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IBISAB	Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MIF	Média da Intensidade de Fluorescência, do inglês <i>Mean Fluorescence Intensity</i>
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Significância Estatística, Valor p.
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Pernambuco
PI	Piauí
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
spp	Espécies
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Cryptosporidium spp	15
1.2	Giardia lamblia	17
1.3	Entamoeba histolytica	20
1.4	Técnicas moleculares para diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia lamblia</i> e <i>Entamoeba histolytica</i>	22
2	OBJETIVOS	24
2.1.	Objetivos Gerais	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	Considerações éticas e desenho do estudo	25
3.2	Transporte e armazenamento	25
3.3	Extração de DNA	25
3.4	Diagnóstico molecular por tecnologia xMAP	28
3.5	Leitura do Luminex	30
3.6	Análises Estatísticas	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Caracterização da população estudada	31
4.2	Caracterização da sub-população caso-controle	34
4.3	Caracterização das condições higiênico-sanitárias das crianças estudadas	35
4.4	Prevalência de enteroparasitas na população	39
5	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXOS	49

1 INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento, em virtude das precárias condições de saneamento e da má qualidade das águas, as doenças diarreicas de veiculação ou transmissão hídrica, têm sido responsáveis por vários surtos epidêmicos e pelas elevadas taxas de mortalidade infantil, relacionada à água de consumo humano. Crianças pequenas, principalmente as menores de três meses de idade e pessoas idosas são bastante susceptíveis ao desenvolvimento destas doenças (FREITAS et al., 2001).

Diarreia é uma das causas líderes mundiais de morbidade e mortalidade infantis. Segundo o relatório divulgado pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) em 2013, mais de 1.600 crianças com idade inferior a 5 anos morreram por dia no mundo em 2012, devido à falta de acesso à água potável e à ausência de saneamento básico, matando mais crianças do que a AIDS, a malária e o sarampo juntos. Doenças diarreicas continuam sendo uma das causas líderes em mortes infantis, chegando a uma perda de mais de 580.000 crianças em 2012 (UNICEF, 2013). As doenças transmitidas pela água são responsáveis por mais da metade das internações hospitalares no Brasil e por quase a metade das mortes de crianças de até um ano de idade (ZANCUL et al., 2006). Três quartos de todas as mortes infantis por diarreia ocorre em apenas 15 países. O tratamento efetivo de doenças diarreicas inclui soluções salinas de reidratação oral para prevenir a desidratação de ameaça à vida, suplemento de zinco para reduzir a duração e a severidade de episódios diarreicos e prevenir infecções futuras e a alimentação contínua da criança durante o uso do suplemento de reidratação e zinco. Infelizmente, estes tratamentos permanecem inacessíveis à grande maioria de crianças nos países mais pobres. Mais preocupante é a falta de progresso na expansão da cobertura de tratamento desde 2000 (UNICEF, 2013).

Do ponto de vista social, as doenças diarreicas causadas por parasitoses representam um grave problema de saúde pública. Elas são responsáveis pela diminuição da qualidade de vida da população causando grandes perdas econômicas, diminuição de sua produtividade, dificuldade de aprendizado, prejuízo da função de alguns órgãos vitais, além de contribuir para o aumento da desnutrição (MOTTA; SILVA, 2002).

No Brasil, a diarreia foi responsável por 17,3% dos óbitos infantis entre 1985-1987, caindo para 4,2% em 2003-2005. No mundo, chegou a atingir uma queda de mais de 50% no número de mortes infantis, de 1,3 milhões em 2000 para 0,6 milhões em 2012, graças ao emprego da terapia de reidratação oral (UNICEF, 2013). Apesar do emprego dessa terapia, a

proporção de mortes por diarreia ainda é três vezes maior na região Nordeste, hoje, quando comparada à região Sudeste, evidenciando diferenças regionais quanto ao acesso e qualidade da atenção à saúde e que determinantes sociais estão relacionados com a prevalência dessa doença (FIOCRUZ, 2008).

A amamentação representa um papel importante na prevenção das doenças diarreicas em crianças. As crianças amamentadas, especialmente as menores de 3 meses de idade, sofrem muito menos episódios de diarreia que crianças que não foram amamentadas. A exposição muito cedo, e frequente, a patógenos intestinais inicia um ciclo que afeta a digestão, a absorção de nutrientes, o crescimento e a imunidade (GUERRANT et al., 2008). Infecções repetidas, com diarreia evidente ou enteropatia subclínica, produzem desnutrição aguda e crônica, que leva a infecções mais frequentes e severas (PREIDIS et al., 2011).

De acordo com a determinação da Organização Mundial da Saúde (OMS), a síndrome da diarreia é caracterizada por três ou mais evacuações líquidas por dia. A etiologia das doenças diarreicas pode ser múltipla. Por conseguinte quando esta doença é causada por agentes infecciosos pode conduzir vários graus de disfunção da barreira intestinal, acarretando na diminuição da capacidade absorptiva de nutrientes e alterações na morfologia intestinal (GUERRANT et al., 2008; FIELD, 2003). Os principais problemas de contaminação da água estão relacionados aos agentes biológicos patogênicos introduzidos ocasionalmente, representados principalmente pelas bactérias, vírus e parasitos.

Por muitos anos o diagnóstico de parasitismo intestinal foi feito por análises de microscopia. Apesar da microscopia ter a vantagem do baixo custo, sua sensibilidade depende da gravidade da infecção e o nível de experiência do microscopista. Colorações são usadas para melhorar a detecção de organismos específicos. Muitos laboratórios têm substituído métodos de diagnóstico, baseados em microscopia das amostras fecais, por ensaios mais sensíveis e específicos como ELISA. Análises por PCR podem detectar a grande maioria de infecções por protozoários e são mais sensíveis que métodos de detecção com uso de anticorpos, apesar de que esses ensaios ainda não são praticados rotineiramente nas clínicas. Diagnósticos moleculares são utilizados principalmente em laboratórios de pesquisas e são altamente sensíveis e específicos na detecção de infecções em pequenas amostras (PAWLOWSKI; WARREN; GUERRANT, 2009).

Os mecanismos pelos quais os enteropatógenos produzem diarreia são diversos, mas pode-se dividi-los entre os que promovem respostas inflamatórias sem causar dano morfológico e os que alteram a estrutura da mucosa intestinal, com ou sem invasão tecidual.

Durante infecções parasitárias podem ocorrer mudanças na motilidade intestinal, que funcionam como uma resposta patológica, conduzindo à diarreia, e também como uma resposta adaptativa do intestino, objetivando alterar o ambiente do parasita e, assim, contribuir para a sua expulsão (FARTHING et al., 1997).

Os protozoários apresentam diferentes graus de patogenicidade, podendo ter uma virulência elevada, como nas infecções causadas por *Cryptosporidium* sp, que geralmente estão associadas às infecções sintomáticas, virulência intermediária, como nas infecções causadas pela *Giardia lamblia* ou, ainda, inexistente como as observadas em algumas cepas de *Entamoeba histolytica* (MOTTA; SILVA, 2002).

1.1 *Cryptosporidium* spp

O gênero *Cryptosporidium* descrito por Tyzzer em 1907, agrupa espécies de protozoários intestinais que parasitam animais vertebrados (MORGAN-RYAN et al., 2002). Criptosporidiose é uma doença protozoária zoonótica causada por espécies coccídeas desse gênero, e é registrada em mais de 40 países (GUERRANT et al., 2002). Na criptosporidiose, o estado imunológico do hospedeiro exerce um papel fundamental na definição do quadro clínico. Dentre as cinco espécies comuns de *Cryptosporidium* em humanos, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* são responsáveis por mais de 90% dos casos de criptosporidiose humana (RYAN et al., 2004).

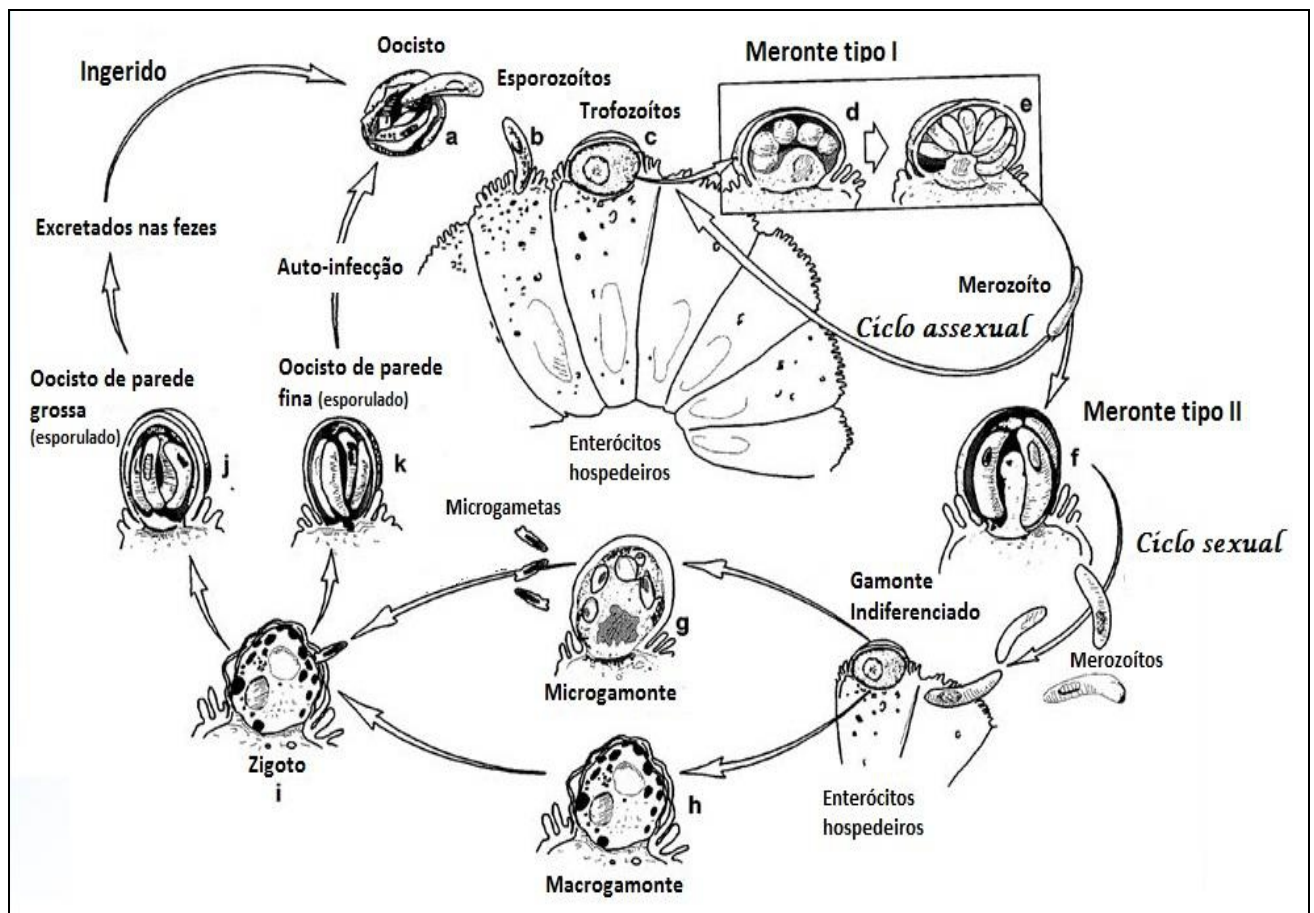
Vários são os fatores que influenciam a epidemiologia dessa protozooze: tamanho reduzido e variado dos oocistos, permitindo sua passagem por filtros usualmente empregados nos processos de tratamento de água; oocistos esporulados já infectantes quando eliminados com as fezes; sua resistência a diferentes desinfetantes usados no processo de tratamento de água (PEREIRA et al., 2008). O emprego de fezes de animais como adubo orgânico em culturas vegetais pode causar infecção direta pela formação de aerossóis ou contaminar águas superficiais e subterrâneas. A ingestão de água contaminada mostra-se a principal via de infecção humana (FAYER et al., 2000).

O parasito tem distribuição mundial e pode ser encontrado tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. No ambiente, os oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem sobreviver por até um ano a 4°C (TAMBURRINI et al., 1999); na água, permanecem viáveis por até 176 dias; em água do mar, por 35 dias; em fezes, sobrevivem 130 dias. Com

congelamento a -22°C , uma pequena proporção de oocistos ainda permanece viva e capaz de resistir por 775 horas. A dessecação é o único fator que realmente afeta a sobrevivência deles. Com 4 horas de dessecação, 100% dos oocistos morrem (EISENBERG et al., 2005). A irradiação solar também representa um importante fator na inativação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (KING et al., 2008).

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* é completado em um único hospedeiro, envolvendo ambas as fases assexual e sexual (**Figura 1**) (ROSSLE, LATIF, 2013). A infecção começa com a ingestão do oocistos pelo hospedeiro.

Figura1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* sp. consistido de fases assexual e sexual.



(Adaptado de LATIF, ROSSLE, 2013)

Oocisto é a fase exógena, contendo quatro esporozoítos revestidos por uma parede de duas camadas. Essa fase é estável, capaz de sobreviver às rotinas do tratamento de águas residuais, e é resistente à inativação por desinfetantes usados na água de beber (GUERRANT et al., 2002).

Após a ingestão dos oocistos através de água ou comida contaminadas ou do contato direto com pessoas ou animais infectados, esses oocistos sofrem excitação, liberando os quatro esporozoítos no intestino delgado (íleo). Os esporozoítos se anexam à superfície luminal das células epiteliais e diferenciam-se assexuadamente em trofozoítos que produzirão dois tipos diferentes de merontes por merogonia. O meronte tipo I forma oito merozoítos, que entram nas células epiteliais adjacentes e se desenvolvem em merontes tipo II ou completam outro ciclo do meronte tipo II. Os merontes tipo II produzem quatro merozoítos que se tornam micro ou macrogamontes (RYAN et al., 2004).

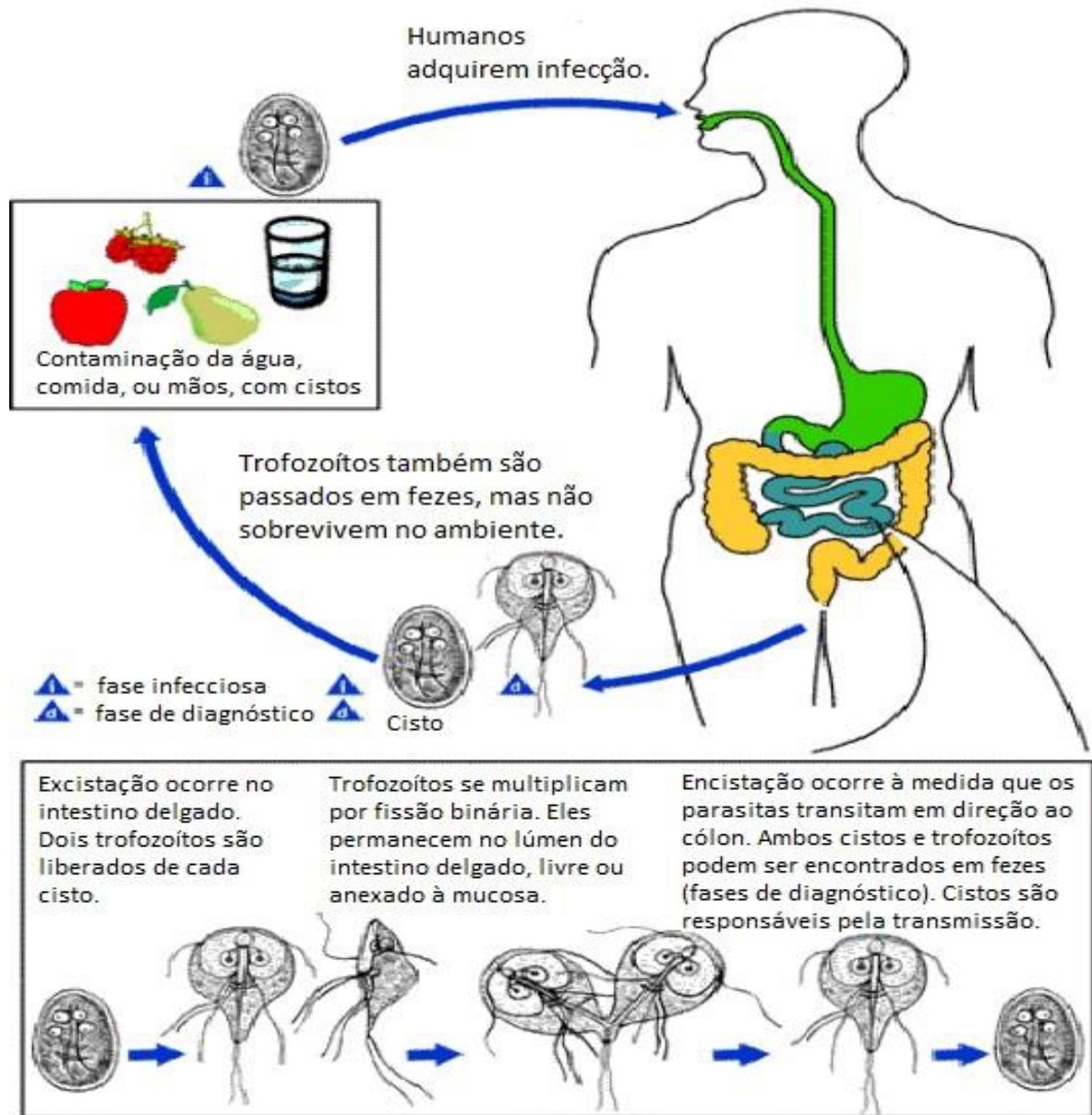
Fertilização entre gamontes resulta na formação de um zigoto que se desenvolve em oocisto contendo quatro esporozoítos. Dois tipos de oocistos são produzidos, oocistos com parede grossa que são excretados nas fezes, e oocistos com parede fina que recirculam no trato intestinal causando autoinfecção (TZIPORI, WARD, 2002). Esse fenômeno pode explicar o mecanismo de infecção persistente em pacientes com AIDS na ausência de exposição subsequente aos oocistos.

Cryptosporidium desfaz a barreira intestinal e aumenta a sua permeabilidade, causando uma absorção prejudicada e um aumento da secreção de fluidos e eletrólitos, e nutrientes, o que leva a desnutrição e diarreia líquida. Além disso, a ligação de esporozoítos móveis ao epitélio gástrico induz a formação de vacúolos parasitóforos e essa estrutura peculiar fornece proteção ao *Cryptosporidium* contra o severo ambiente do trato gastrointestinal do hospedeiro (ROSSLE, LATIF, 2013).

1.2 *Giardia lamblia*

A infecção por *Giardia lamblia* é endêmica em várias partes do mundo. Mesmo em países industrializados, como os Estados Unidos, a giardíase é considerada como a enteroparasitose mais frequente na infância, ocorrendo principalmente nos primeiros anos de vida (MACEDO et al., 2003). O cisto viável é a forma infectante capaz de sobreviver em ambiente externo adequado por longos períodos. Os trofozoítos, formas que causam a doença, apenas aderem ao epitélio do enterócito, não apresentando capacidade invasora ou destrutiva direta. O mecanismo pelo qual a *Giardia lamblia* causa diarreia e má absorção intestinal permanece controverso e é provável que seja multifatorial (**Figura 2**) (ADAM, 2001).

Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.



(Fonte: Division of Parasitic Diseases, 2003)

Giardia é um dos enteroparasitos mais frequentemente observados nos exames parasitológicos devido à facilidade com que os cistos são acidentalmente ingeridos com a água e alimentos contaminados com fezes. A infecção por *Giardia* é cosmopolita, ocorrendo em áreas desenvolvidas e em desenvolvimento. Os índices de prevalência variam de 2% nos países desenvolvidos até 30% nos países em desenvolvimento. Essa infecção é a causa mais frequente de surtos epidêmicos de diarreia associados à água para consumo (NETO; AMATO; GRYSCHK; TUON, 2008).

Infecções por *Giardia lamblia* se iniciam pela ingestão de cistos em água ou comida contaminadas, ou através do contato oral direto com fezes contaminadas. A excitação desses cistos no intestino delgado superior libera os trofozoítos, que se proliferam enquanto ligados às células epiteliais do intestino. O parasita não é invasivo e nenhuma toxina ou fatores de virulência foram claramente definidos. *Giardia* possui duas fases com diferenças bioquímicas e estruturais em seu desenvolvimento: a móvel, trofozoítos flagelados que são responsáveis pela manifestação clínica da doença; e as formas de cisto, a fase infectante do microrganismo, na qual os trofozoítos são envolvidos por uma parede rígida e protetora que confere ao parasita a capacidade de sobreviver fora do intestino do hospedeiro (ADAM, 2001).

Giardia apresentam dois mecanismos de adaptação para sobreviver dentro e fora do intestino do hospedeiro, a variação antigênica e a encistação, respectivamente. A primeira consiste na troca contínua de antígenos específicos da superfície, sendo importante para a invasão do sistema imunológico do hospedeiro (NASH, 2002). Encistação, por outro lado, compreende a formação de uma resistente parede em volta do cisto que permite ao parasita sobreviver em condições ambientais hostis externas e garante a transmissão da infecção para hospedeiros susceptíveis (NASH et al., 1997).

A infecção assintomática é a forma mais comum, principalmente nas áreas onde o parasita é endêmico. A giardíase aguda é autolimitada (a cura ocorre em duas a quatro semanas) e caracteriza-se por diarreia em mais de 90% dos casos (apresentando-se como fezes líquidas, com muco e sem sangue), acompanhada por perda de peso em 60 a 70% dos indivíduos, náuseas, desconforto e distensão abdominais e flatulência. Entretanto, pode haver evolução para esteatorreia (FARTHING, 1996). Em 30 a 50% dos casos, a diarreia torna-se persistente e crônica, com consequente parada ou retardo do crescimento devido à má absorção intestinal. Fatores imunológicos do hospedeiro podem ter importância na determinação do curso da infecção. Pacientes com imunodeficiências variadas geralmente apresentam maior predisposição e manifestações clínicas prolongadas, com baixa resposta terapêutica (MOTTA, SILVA, 2002).

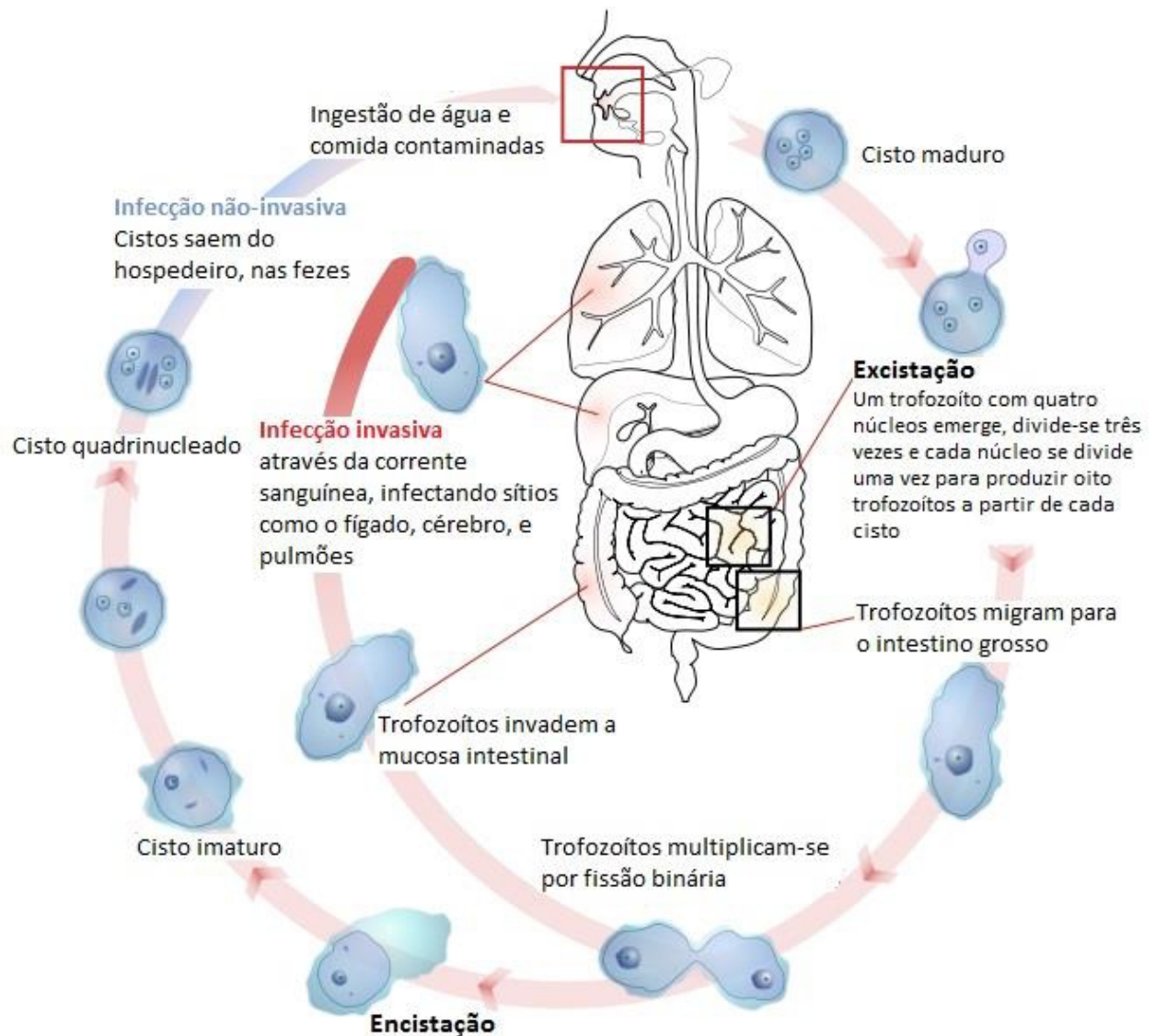
1.3 *Entamoeba histolytica*

A amebíase, causada pelo parasita intestinal *Entamoeba histolytica*, possui distribuição cosmopolita, com maior prevalência nas regiões tropicais e subtropicais, onde ocorre com maior gravidade. Essa incidência parece não estar relacionada com os fatores climáticos, mas sim com as precárias condições de higiene e educação sanitária, fruto do subdesenvolvimento dessas regiões. A amebíase constitui problema de saúde pública no México, Índia, Bangladesh, leste e sul da África, Vietnam e América do Sul (ZLOBL, 2001).

Em muitas infecções de *E. histolytica* o parasita vive como comensal no intestino, sendo o indivíduo infectado considerado portador assintomático. Os pacientes sintomáticos apresentam formas invasoras, que são responsáveis por alterações intestinais e extraintestinais (QUE, REED, 1997), caracterizadas por uma grande diversidade de quadros clínicos. A ingestão de cistos viáveis de *E. histolytica* causa a infecção, mas o trofozoíto é a forma que promove a invasão da mucosa intestinal e, assim, a doença por esse parasita. Adultos e crianças são igualmente susceptíveis à infecção, que atinge 10% a 12% da população mundial, mas apenas cerca de 10% dos infectados apresentam sintomatologia. A ocorrência de infecção assintomática por *E. histolytica* patogênica em áreas endêmicas explica-se pela elevada prevalência de anticorpos séricos anti-ameba (MOTTA, SILVA, 2002).

E. histolytica apresenta em seu ciclo de vida quatro estágios evolutivos: trofozoítos, pré-cistos, cistos e metacistos. Os cistos e trofozoítos são fases bem definidas do parasito e os pré-cistos e metacistos, fases intermediárias (**Figura 3**).

Figura 3. O ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*



(Adaptado de Parasitologia Clínica de Craig & Faust)

A infecção geralmente começa através da ingestão de cistos junto com água ou alimentos contaminados com fezes de humanos. Os cistos sobrevivem à ação do suco gástrico e, chegando ao final do intestino delgado ou início do intestino grosso onde a tensão de oxigênio é baixa, através de uma pequena fenda na parede cística, liberam o metacisto. Este sofre sucessivas divisões nucleares e citoplasmáticas, dando origem a quatro e depois oito trofozoítos, chamados trofozoítos metacísticos. Estes, normalmente, residem no intestino grosso, aderidos ao muco colônico e às células epiteliais. A *E. histolytica* geralmente persiste por meses ou anos no intestino como comensais, no entanto, ocasionalmente o parasita penetra na mucosa do intestino, induzindo a colite ou disseminando-se para outros órgãos (STANLEY, 2003).

Para completar o ciclo normal, os trofozoítos se desprendem da mucosa e caem na luz intestinal, diferenciando-se em pré-cistos. O encistamento ocorre no cólon e o ciclo de vida se completa quando o cisto infeccioso é eliminado juntamente com as fezes para o meio ambiente. Os cistos, dependendo das condições ambientais, permanecem infectantes de semanas a meses (WALSH, 1988).

A manifestação clínica observada com maior frequência é a colite amebiana aguda. Em geral, ocorre início gradual com dor abdominal e diarreia com fezes líquidas contendo sangue e muco. Podem estar associados tenesmo, vômitos e flatulência. Os sintomas duram de uma a duas semanas. Poucos doentes tem febre, contrastando com a disenteria bacteriana. Ocasionalmente, pode haver diarreia profusa conduzindo à desidratação rápida. A aparência característica de úlceras hemorrágicas puntiformes com mucosa ao redor relativamente normal à endoscopia do reto ou sigmóide pode auxiliar no diagnóstico. Uma complicação rara é a evolução para colite fulminante, caracterizada por diarreia sanguinolenta intensa e febre, com progressão da ulceração superficial do intestino para necrose transmural (MOTTA, SILVA, 2002).

1.4 Técnicas moleculares para diagnóstico de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, e *Entamoeba histolytica*

A tecnologia Luminex-xMAP trata-se de uma nova técnica que combina processamento óptico e de fluidos em processamento de sinal digital, sendo capaz de realizar múltiplos ensaios em pequenas quantidades de amostras. Tal tecnologia permite números altos de testes biológicos a serem conduzidos e analisados rapidamente, sendo a primeira a utilizar comercialmente microesferas diferentemente coradas, mas com o mesmo tamanho, para obter perfis multi-analito para proteínas e ácidos nucleicos.

Essa tecnologia foi originalmente desenvolvida utilizando os princípios do sistema do citômetro de fluxo, como lasers, fluídica e óptica. Entretanto, diferentemente dos demais citômetros de fluxo baseados em ensaios com microesferas que usam uma combinação de tamanhos e intensidades de cores diferentes para identificar uma única microesfera, a tecnologia xMAP usa microesferas de um único tamanho com processo próprio de coloração para criar 500 misturas únicas de corantes que são utilizadas para identificar uma única microesfera (**Figura 4**) (LUMINEXCORP, 2014). A utilização da tecnologia Luminex

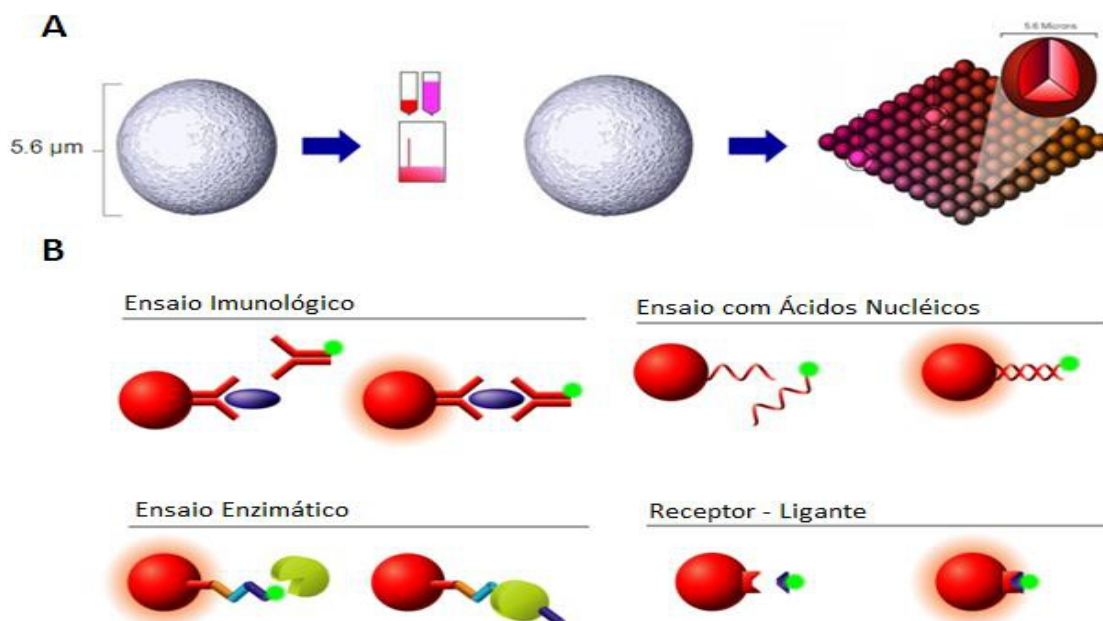
permite uma complexação múltipla de até 500 bioensaios dentro de uma única amostra de forma rápida e precisa (LUMINEXCORP, 2014).

A tecnologia xMAP incorpora microesferas de poliestireno que são internamente coradas com quantidades precisas de dois ou três corantes fluorescentes com espectros distintos. As características espectrais únicas dentro de conjuntos individuais das microesferas permite que cada uma seja especificamente diferenciada de todas as outras em uma reação de multiplex. Uma vez que as elas podem ser distinguidas por seus endereços espectrais e cada um desses endereços é associado a um anticorpo ou sonda de ácido nucleico específico, as microesferas podem ser combinadas em uma única reação para medir múltiplos analitos simultaneamente (SHERRY, 2010).

A configuração de um ensaio xMAP consiste em um conjunto de suspensão onde fragmentos específicos capturados são covalentemente acoplados à superfície das microesferas internamente coradas. Após finalizadas as incubações com o reagente de detecção, as microesferas são separadas dentro do analisador Luminex e interceptadas com dois lasers - um para classificação da identidade da microesfera (região) e o outro para a quantificação do fluoróforo ligado.

A utilização dessa plataforma no diagnóstico de enteroparasitoses permite a execução rápida e precisa dos testes, possuindo, ainda, uma reprodutibilidade muito maior do que as demais técnicas até então disponíveis.

Figura 4. Microesferas de Luminex



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Determinar a prevalência de *Cryptosporidium* sp., *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*, isolados de fezes de crianças com e sem diarreia aguda no semiárido nordestino, além de investigar possíveis associações com aspectos socioeconômicos e clínicos da infecção.

2.2 Objetivos Específicos

- Implementar o diagnóstico dos protozoários *Cryptosporidium* sp, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* por ensaios de PCR-Luminex
- Determinar a prevalência de *Cryptosporidium* sp., *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* obtidos a partir de fezes de crianças com e sem quadro clínico de diarreia no semiárido nordestino;
- Avaliar a correlação entre a prevalência dos parasitas encontrados e fatores socioeconômicos;
- Avaliar relações entre as condições higiênico-sanitárias das crianças com a presença dos agentes etiológicos citados.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas e desenho do estudo

Esse estudo fez parte de um projeto intitulado "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil - Subprojeto 2A", aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMPEPE, parecer nº 283/05 - **ANEXO 1**).

Todos os responsáveis pelas crianças receberam orientação sobre o projeto antes da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - **ANEXO 2**)

Esta análise compreendeu a participação das cidades de Crato (CE), Picos (PI) e Ouricuri (PE), que são representantes do Semiárido Brasileiro. Este estudo foi do tipo observacional, analítico, caso-controle e incluiu 600 crianças atendidas em unidades de saúde de cada município, sendo 297 crianças com diarreia (casos) e 303 crianças sem diarreia (controles), a diarreia foi definida como sendo três ou mais evacuações líquidas num período de 24 horas.

Foram incluídas nesse estudo crianças de 2 a 36 meses de idade que tiveram o consentimento dos pais ou de respectivos responsáveis no período de setembro de 2009 a março de 2010. Protocolos de campo e laboratorial para pesquisa foram desenvolvidos e várias equipes foram treinadas para execução das atividades. Um questionário (**ANEXO 3**) com informações demográficas, epidemiológica, clínico, nutricional e laboratorial foi aplicado e amostras de fezes foram coletadas de cada criança para posterior análise molecular.

3.2 Transporte e armazenamento

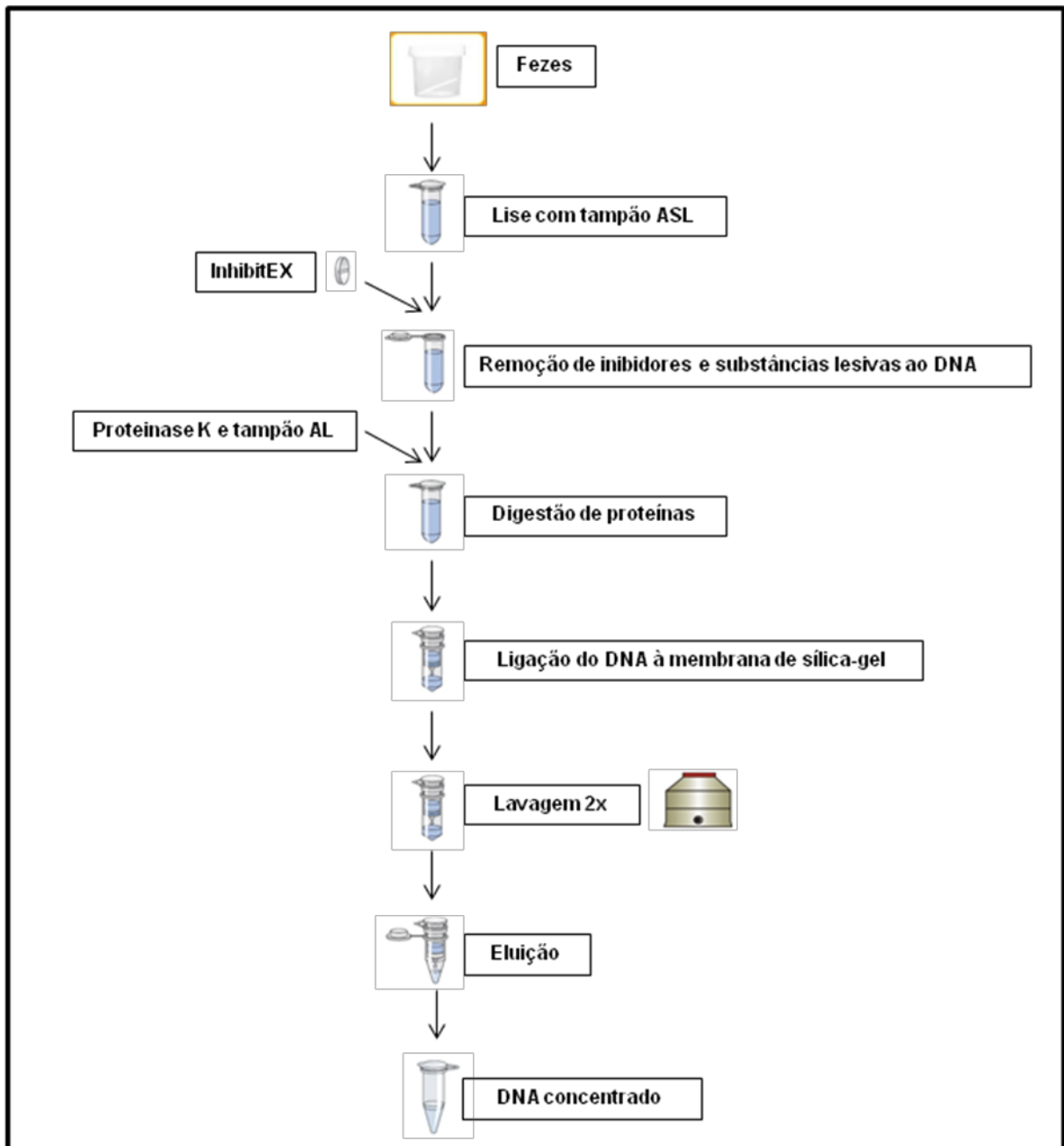
Amostras de fezes foram coletadas de todas as crianças nas unidades de saúde das cidades onde foram armazenadas a -20°C. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em caixas de gelo e transportadas para o Instituto de Biomedicina do Semi-Árido Brasileiro (IBISAB). Todas as amostras foram fracionadas sem diluição e armazenadas a -20°C até serem realizados os testes moleculares.

3.3 Extração de DNA

O DNA de protozoário foi extraído a partir de amostras de fezes, utilizando o *kit QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizada, inicialmente, uma incubação da amostra no tampão de lise ASL a 95°C ao invés de 70°C, opção recomendada pelo fabricante com o objetivo de facilitar a ação do tampão de lise em células difíceis de lisar, aumentando de três a cinco vezes a concentração final de DNA genômico de enteropatógenos.

O processo de purificação do DNA envolveu, ainda, a digestão de proteínas, ligação do DNA à membrana de sílica-gel proveniente do kit, lavagens com tampões adequados para remoção de impurezas e eluição do DNA. As proteínas foram digeridas e degradadas durante a incubação com Proteinase K. Condições tamponantes foram ajustadas para permitir a ligação ótima do DNA à membrana *QIAamp*, e as amostras foram colocadas na coluna. O DNA foi absorvido à membrana durante centrifugação. As condições do lisado, como concentração de sais e pH, dificultam a ligação de proteínas digeridas e outras impurezas à membrana. Com o intuito de remover qualquer impureza residual, o DNA absorvido foi, então, lavado em dois passos de centrifugação. No primeiro deles, o tampão AW1 foi adicionado à membrana e submetidos à centrifugação durante 1 minuto. A membrana ligada ao DNA foi transferida para um novo tubo coletor e o filtrado foi descartado. No passo seguinte, o tampão AW2 foi adicionado à membrana e submetidos à centrifugação durante 3 minutos. Para que nenhum excesso de tampão permanecesse na amostra antes da eluição final, o filtrado foi descartado e o filtro foi colocado de volta ao mesmo tubo coletor e submetido a uma nova centrifugação de 1 minuto. A membrana contendo o DNA concentrado e purificado foi transferida para um novo tubo de 1,5mL. Adicionou-se, então, o tampão de eluição AL e incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente. A concentração de sal do tampão permite a eluição do DNA ligado à membrana, livre de proteínas, nucleases, inibidores e outras impurezas. A centrifugação durante 1 minuto completou o processo. O produto obtido foi armazenado a -20°C para posterior análise (**Figura 5**).

Figura 5. Fluxograma da técnica de extração de DNA fecal utilizando o *QIAamp DNA Stool Mini Kit*.



(Fonte: LIMA, 2008)

Após a realização da extração de DNA das amostras selecionadas, procedeu-se à quantificação de DNA no espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific). O teste indica a qualidade e a quantidade do material ao final do processo. O DNA extraído foi avaliado nos comprimentos de onda de 260, 280 e 320nm. A leitura em 260nm nos fornece a quantidade de DNA da amostra como resultado da multiplicação do valor observado pelo

fator de diluição e pela constante 50 para leitura final na concentração de mg/mL. A razão 260/280nm fornece uma estimativa da qualidade e pureza da amostra extraída, demonstrando se ela apresenta ou não contaminação de ácido ribonucléico (*ribonucleic acid* – RNA), proteína ou reagentes, como o ácido etilenodiamino-tetra-acético (*ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA), por exemplo. A leitura em 320nm reduz a influência da leitura da absorvância do *background*. A leitura de DNA deve ter razão $260/280 \geq 1,8$ para demonstrar falta de contaminantes (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Este procedimento é essencial para permitir análise do grau de pureza e da quantidade do DNA extraído. Como a extração foi realizada a partir de amostras fecais, e estas possuem substâncias que podem ser inibidores da PCR, a determinação correta do grau de pureza das amostras é essencial pois do contrário pode interferir na realização e nos resultados obtidos na PCR. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

3.4 Diagnóstico molecular por tecnologia xMAP

Foi utilizada a técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) do tipo Multiplex para a detecção dos genes de diagnóstico, com os reagentes do *Qiagen multiplex PCR kit* (Valencia, CA). A técnica de Multiplex-PCR é uma das variantes do PCR que usa múltiplos pares de iniciadores de DNA para a detecção de vários genes em uma única reação, ocorrendo assim, a amplificação simultânea de sequências de DNA de tamanhos diferentes. Cada reação incluía 12,5 µL da enzima Multiplex PCR Mastermix, 1,0 µL do mix de pares de iniciadores específicos para os genes de cada agente mencionado (**Tabela 1**), 5,5 µL de água mili-Q autoclavada, 2,0 µL de solução Q e 4,0 µL de DNA da amostra. Primer mix é constituído 0,4 µM primers de *E. histolytica*, 0,6 µM primers de *Giardia lamblia*, 1,0 µM iniciadores de *Cryptosporidium* spp. No protocolo do multiplex-PCR foi incluído um passo inicial de desnaturação (95 °C) por 15 minutos, seguido por 40 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação (95 °C) por 30 segundos, anelamento (55°C) por 30 segundos e extensão (72 °C) por 30 segundos, e por fim uma extensão (72 °C) por 10 minutos e manutenção a 4° C. Este protocolo foi desenvolvido pelo grupo dos pesquisadores americanos Eric Houpt e Mami Taniuchi, da Universidade da Virgínia, Estados Unidos. Então, utilizou-se a tecnologia xMAP (Perfil de Múltiplos Analitos) para analisar os produtos do multiplex, através do uso do equipamento BioPlex 200 (Bio-Rad, Estados Unidos).

Tabela 1 - Genes de diagnóstico relacionados com os protozoários, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos.

AGENTE	GENES ALVOS	NOME DOS INICIADORES	SEQUÊNCIA DE PRIMERS (5'→3')
<i>G. lamblia</i>	18S RRNA	G62F G62R* G62P	GACGGCTCAGGACAACGGTT TTGCCAGCGGTGTCCG CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG
<i>E. histolytica</i>	18S RRNA	EH134F EH134R* EH134P	AACAGTAATAGTTTCTTTGGTTAGTAAA CTTAGAATGTCATTTCTCAATTCAT ATTAGTACAAAATGGCCAATTCATTCA
<i>CRYPTOSPORIDIUM</i> spp.	COWP	C151F C151R* C151P	CAAATTGATACCGTTTGTCTTCTG GGCATGTCGATTCTAATTCAGCT TGCCATACATTGTTGTCTGACAAATTG

*Primers biotinizados para os ensaios de PCR Multiplex-Luminex . Fonte: Taniuchi, M. *et al.*, 2011

Esta tecnologia emprega a técnica de PCR associada à hibridização de seus produtos com o uso de microesferas de poliestireno que apresentam a possibilidade de detecção simultânea de até 100 produtos de DNA. Para tanto, cada microesfera teria uma dupla de fluorescências de intensidades únicas que seria acoplada por carboxilação a uma sonda nucleotídica específica. Esta sonda nucleotídica seria hibridizada especificamente a um produto de PCR amplificado em reação prévia. Além da sonda, um dos iniciadores da reação de PCR seria biotinizado para futura marcação de intensidade por estreptavidina (TANIUCHI et al., 2012; LIU et al., 2011a, 2011b). Após a hibridização das microesferas com os produtos de PCR, o material obtido foi levado ao leitor do BioPlex 200 que detectou o DNA dos agentes infecciosos. Para a realização dos testes foram adicionados a cada reação dois controles negativos e um controle positivo para garantir a eficiência dos testes.

3.5 Leitura do Luminex

Dados do Luminex foram registrados como média de intensidade da fluorescência (MIF). É calculado o valor corrigido MIF (cMIF) a partir da normalização da retirada da fluorescência do background (controle negativo). Desta forma, tem-se $cMIF = [MIF (amostra) - MIF (background)] / MIF (background)$. Logo amostras com cMIF acima de 3 são

consideradas amostras positivas e amostras abaixo deste valor são consideradas negativas (TANIUCHI *et al.*, 2011).

3.6 Análises Estatística

O teste de Fisher foi empregado para comparar a proporção de ocorrência de uma variável entre os grupos através dos programas *Epi Info 7.0* (Center for Disease and Control, Estados Unidos) e *MedCalc* (MedCalc Software, Estados Unidos). Foi utilizado o intervalo de confiança de 95% e o teste foi considerado estatisticamente significativo com $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da população estudada

Baseando-se em trabalhos já publicados na literatura científica, percebe-se a escassez de informações concretas sobre a prevalência de parasitoses intestinais (CARVALHO et al, 2002) em diferentes regiões do Brasil, sobretudo na região do Semiárido Brasileiro, região a qual foi destinada este estudo.

Os poucos trabalhos publicados geralmente se restringem a amostras de bases populacionais mal definidas, como escolares que estão entre uma ampla faixa etária, usuários de serviços de saúde, alunos de escolas públicas (CASTRO et al, 2005) e comunidades urbanas carentes.

Durante o período de setembro de 2009 a março de 2010, 600 crianças na faixa etária entre dois e 36 meses foram incluídas no estudo, sendo 200 provenientes de área urbana de cada cidade estudada (Crato-CE, Picos-PI e Ouricuri-PE). Considerando as 600 fichas epidemiológicas preenchidas, 65,8% das crianças estudadas estavam na faixa etária entre 12 e 36 meses. Em relação ao sexo das crianças estudadas, 50,4% foram do sexo masculino e 49,6% do sexo feminino (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Distribuição da população de estudo de acordo com o sexo e a idade.

Parâmetros	Nº.	%
Sexo		
Masculino	302	50,4
Feminino	297	49,5
Não informado	1	0,1
Idade (meses)		
2 - 6	90	15
6 - 12	115	19,2
12 - 24	215	35,8
24 - 36	180	30
Total	600	100,0

Quando questionados sobre a ocorrência de três ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas, 297 (49,5%) do pais ou responsáveis responderam "sim" (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Distribuição da população de acordo com a ocorrência de três ou mais fezes nas últimas 24 horas.

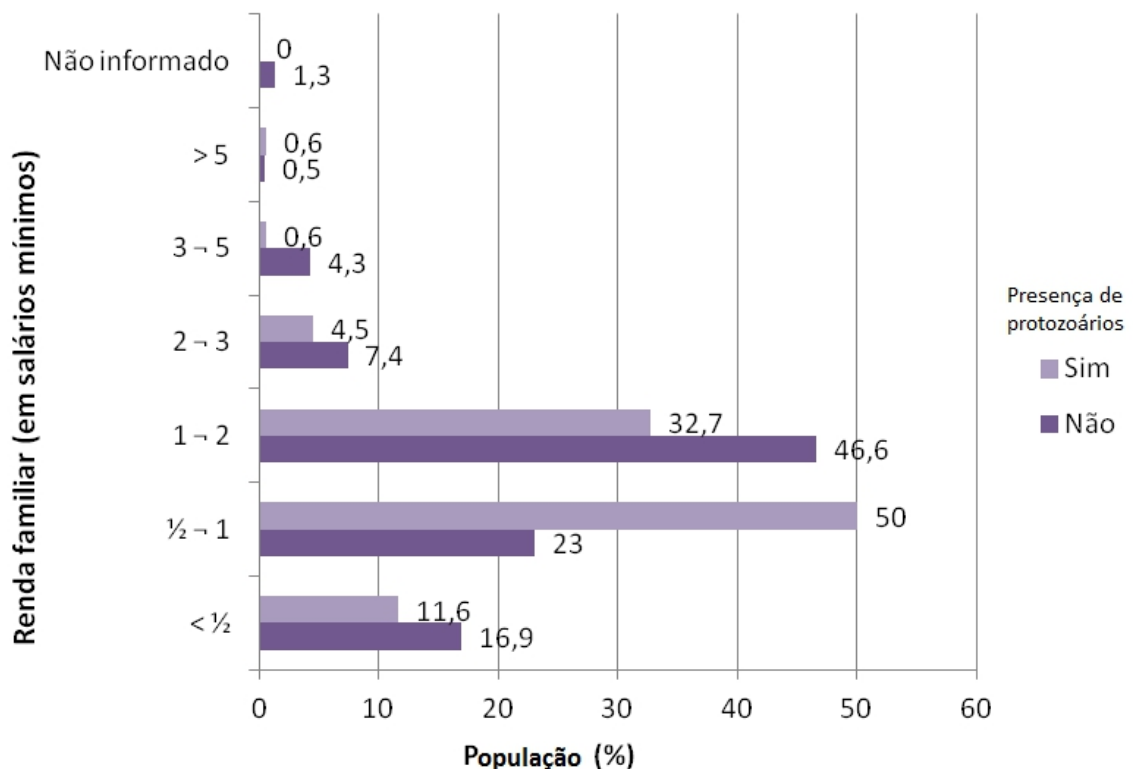
Ocorrência de 3 ou mais fezes líquidas em 24 horas	Nº	(%)
Sim	297	49,5
Não	303	50,5
Total	600	100,0

Considerando esse critério para a definição dos grupos a serem analisados, as crianças incluídas nesse estudo foram divididas em casos (297) e controles (303).

Na caracterização da população estudada, foram observados fatores socioeconômicos. O fator que apresentou diferenças significativas foi a renda familiar, uma vez que esta reflete

um índice de condição socioeconômica bastante sensível para detectar os efeitos da distribuição de parasitoses intestinais, apesar de não estar obrigatoriamente relacionada à falta de orientação sanitária. Dentre as 156 crianças que apresentaram a presença de pelo menos um parasita, 94,2% eram provenientes de famílias com renda de até dois salários mínimos (**Figura 6**). Para o cálculo da significância desse fator, foi criada a **Tabela 4** em que esses dados foram reagrupados entre crianças com renda mensal até dois salários mínimos e crianças com renda mensal acima de dois salários mínimos. Foi realizado, então, o Teste de Fisher ($p = 0,008$), em que pode-se comprovar a associação da presença de parasita com a renda familiar. No estudo de Heller (2004), ficou demonstrado que a renda familiar consiste em fator de proteção para as enteroparasitoses intestinais, em concordância com o autor, neste estudo observou-se o decrescente número de enteroparasitoses intestinais à medida que a renda familiar aumenta.

Figura 6 - Distribuição da população baseada na renda familiar em salários mínimos.



A população foi distribuída de acordo com sua renda familiar. As colunas em roxo escuro representam os percentuais da população que não apresentou protozoários, dentro daquele respectivo intervalo de renda familiar. As colunas em cor clara representam os percentuais da população que apresentou pelo menos um protozoário, dentro do respectivo intervalo de salários mínimos.

Tabela 4 – Distribuição da população segundo a renda familiar e a presença de parasitas.

Renda familiar (em salários mínimos)	Presença de parasitas		Total (%)
	Não (%)	Sim (%)	
Até 2	384 (86,5)	147 (94,2)	531 (88,5)
Acima de 2	60 (13,5)	9 (5,8)	69 (11,5)
Total	444 (74,0)	156 (26,0)	600 (100,0)

Para verificar a significância, foi realizado o Teste de Fisher, $p = 0,008$.

4.2 Caracterização da sub-população caso-controle

Entre as 297 crianças do grupo caso estudadas, 150 (50,5%) eram do sexo feminino. Os valores observados entre o grupo controle foram semelhantes aos já citados, com 51,2% sendo do sexo masculino (**Tabela 5**).

Em relação à idade das crianças analisadas, todos os grupos etários entre dois e 36 meses foram incluídos. A maior proporção de crianças foi observada na faixa etária entre 12 e 36 meses. Entre os casos, 64,7% das crianças tinham idade superior a 12 meses. No grupo controle esse percentual foi de 67% (**Tabela 5**).

Não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) na detecção de protozoários intestinais entre os sexos masculino (73%) e feminino (83%).

Tabela 5 - Caracterização da sub-população caso-controle segundo o sexo e a idade.

Parâmetros	Casos		Controles	
	Nº.	%	Nº.	%
Sexo				
Masculino	147	49,5	155	51,2
Feminino	150	50,5	147	48,5
Não informado	0	0,0	1	0,3
Idade (meses)				
2 - 6	46	15,5	44	14,5
6 - 12	59	19,8	56	18,5
12 - 24	108	36,4	107	35,3
24 - 36	84	28,3	96	31,7
Total	297	100,0	303	100,0

4.3 Caracterização das condições higiênico-sanitárias das crianças estudadas

Foram analisados, também, fatores de saneamento básico e as condições de higiene nas residências das crianças estudadas. Entre as 444 crianças nas quais não foram detectados os parasitas estudados, 419 (94,4%) possuíam água encanada (**Tabela 6**).

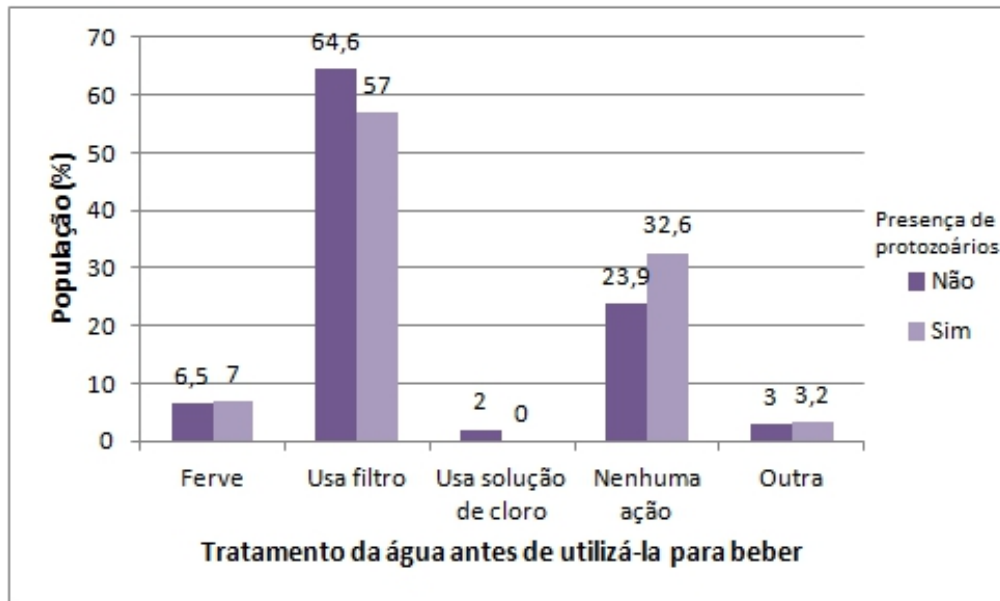
Para o quesito "o que faz antes de utilizar a água para beber", 287 (64,6%) das crianças sem parasitas eram provenientes de famílias que usavam filtro. Entre as 156 crianças diagnosticadas positivamente, um valor significativo de 51 (32,6%) respondeu que não realizavam nenhuma ação para tratar a água antes de beber, como pode ser visto na **Figura 7**. Para avaliar a significância desse resultado, a **Tabela 7** foi criada e os dados foram reorganizados entre tratamento da água antes de beber e a ausência de tratamento. A partir dessa nova tabela foi possível realizar o Teste de Fisher ($p = 0,027$), comprovando a significância da associação entre tratar a água antes de utilizá-la para beber e a presença de

parasita. Esse resultado pode estar relacionado com o tratamento convencional realizado pela rede de abastecimento de água do local que não inviabiliza os cistos de protozoários (HELLER et al., 2004).

Tabela 6 - Distribuição da população quanto à presença de parasitas e à origem da água de beber.

Origem da água de beber	Presença de parasitas		Total (%)
	Não (%)	Sim (%)	
1 - Água encanada	419 (94,4)	152 (97,5)	571 (95,2)
2 - Poço profundo	7 (1,6)	2 (1,3)	9 (1,5)
3 - Cacimba	1 (0,2)	0 (0,0)	1 (0,2)
4 - Carroça	4 (1,0)	0 (0,0)	4 (0,6)
6 - Cisterna	3 (0,6)	0 (0,0)	3 (0,5)
8 - Água mineral	8 (1,8)	1 (0,6)	9 (1,5)
9 - Não sabe	1 (0,2)	0 (0,0)	1 (0,2)
10 - Outra fonte	1 (0,2)	1 (0,6)	2 (0,3)
Total	444 (74,0)	156 (26,0)	600 (100)

Figura 7 - Distribuição da população em relação ao tipo de tratamento da água antes de utilizá-la para beber.



As colunas na cor roxo escuro representam o percentual da população estudada que não apresentaram protozoários. As colunas na cor clara representam o percentual das crianças que apresentaram pelo menos um protozoário.

Tabela 7 - Distribuição da população quanto à realização de tratamento da água antes de utilizá-la para beber e à presença de parasita.

O que faz antes de utilizar a água para beber	Presença de parasitas		Total (%)
	Não (%)	Sim (%)	
Tratamento	338 (76,1)	105 (67,3)	443 (73,8)
Sem tratamento	106 (23,9)	51 (32,7)	157 (26,2)
Total	444 (74,0)	156 (26,0)	600 (100,0)

Dentre as 156 crianças que apresentaram pelo menos um parasita, 51 (32,7%) não tratavam a água antes de utilizá-la para beber. Foi realizado o Teste de Fisher para avaliar a significância e foi encontrado um valor de $p = 0,027$.

Quanto ao quesito tipo de esgoto presente, não houve uma diferença significativa no percentual total de respostas para fossa (47,5%) e rede/esgoto público (47,3%) em suas residências, como pode ser visto na **Figura 8**. Esse percentual assemelhou-se a outros descritos na literatura (VASCONCELOS, 2011). Contudo, quando analisada a diferença da

presença de parasita para esses dois tipos de esgoto (**Tabela 8**), foi possível obter valores significativos (Teste de Fisher, $p = 0,000012$). Esse resultado apenas confirma os riscos do uso de fossas como sistema de esgoto, uma vez que estas não apresentam um tratamento completo como em uma estação de tratamento de esgotos, constituindo um tratamento primário de esgoto doméstico (AISSE, 2000). A presença de fossa indica um ambiente domiciliar desfavorável do ponto de vista do tratamento dos dejetos pelo aumento da probabilidade de contaminação dessas crianças, uma vez que a via fecal-oral é o principal meio de infecção dos parasitas aqui estudados (JOMBO et al., 2007).

Figura 8 - Distribuição da população de acordo com o tipo de esgoto presente na residência.

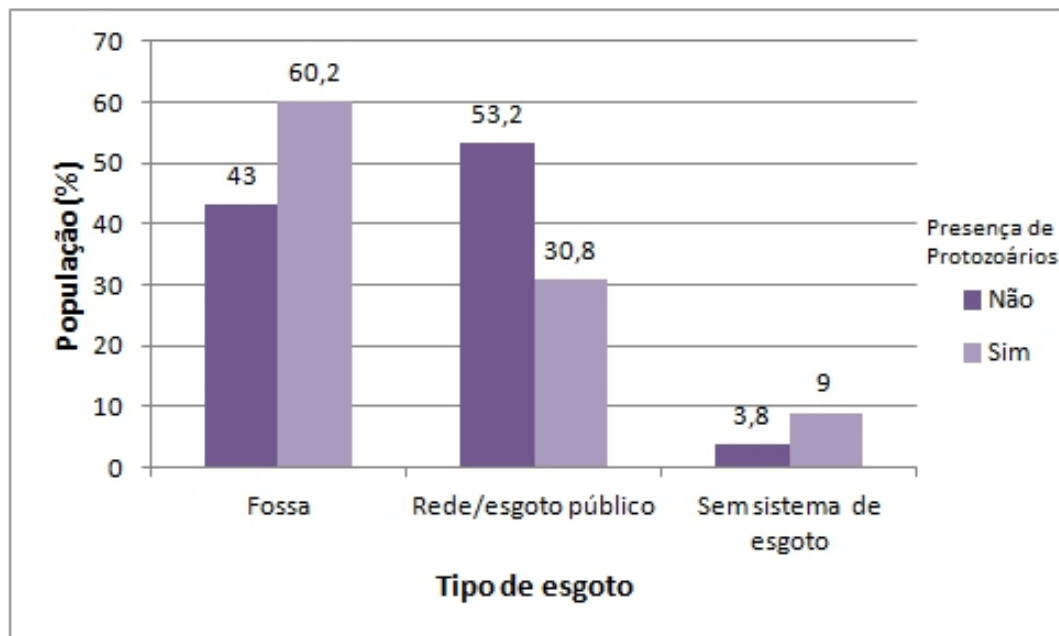


Tabela 8 - Distribuição da população que possui fossa ou rede/esgoto público em relação à presença de parasita.

Tipo de esgoto presente	Presença de parasitas		Total (%)
	Não (%)	Sim (%)	
Fossa	191 (44,7)	94 (66,2)	285 (50,1)
Rede/esgoto público	236 (55,3)	48 (33,8)	284 (49,9)
Total	427 (75,1)	142 (24,9)	569 (100,0)

Para verificar a significância da associação entre o tipo de esgoto presente na residência e a presença de pelo menos um parasita nas crianças estudadas, foi realizado o Teste de Fisher, $p = 0,000012$.

4.4 Prevalência de enteroparasitas na população

Como descrito nos itens 3.4 e 3.5 da Metodologia, o diagnóstico molecular de *E. histolytica*, *Cryptosporidium* sp, e *G. lamblia* foi baseado nos resultados do Multiplex-PCR analisados pela tecnologia xMAP através do uso do equipamento BioPlex 200, onde considerou-se diagnóstico positivo pela presença de pelo menos um dos genes alvos. Desse modo, obteve-se 444 amostras negativas para a presença de pelo menos um dos três enteroparasitas estudados, e 156 amostras positivas. Segundo os resultados obtidos, a taxa de infecção na população estudada foi de 26%. Comparando essa taxa com a de infecção de enteroparasitas encontrados em outras cidades do Brasil (MARQUES et al, 2005), incluindo algumas do Nordeste Brasileiro, admite-se que os resultados das cidades de Crato (CE), Ouricuri (PE) e Picos (PI) encontra-se dentro dos índices dos resultados de enteroparasitas do Brasil. Entre as 156 amostras com resultado positivo, 10 (6,4%) apresentaram a presença de *Entamoeba histolytica*, 24 (15,4%) foram positivas para *Cryptosporidium* sp, e 133 (85,3%) para *Giardia lamblia*; havendo casos onde crianças apresentavam o diagnóstico positivo para mais de um parasita (**Tabela 9**).

Para *E. histolytica*, foram obtidos resultados para 292 casos e 298 controles analisados. No grupo de casos, 4 (1,4%) foram positivos. Entre os controles, o percentual de positividade para esse enteroparasita foi de 5 (1,7%).

Em relação à presença de *Cryptosporidium* sp, um total de 290 casos e 297 controles apresentaram resultados. A positividade entre os casos foi de 8 (2,7%), enquanto entre os controles foi de 16 (5,4%).

Para o enteroparasita *G. lamblia*, foram obtidos resultados para 290 casos e 297 controles. Desses 290 casos, 80 (27,6%) apresentarem positividade. Entre os 297 controles, 53 (17,8%) foram positivos. A prevalência total encontrada para *G. lamblia* entre as 156 crianças com resultado positivo para a presença de pelo menos um dos parasitas estudados foi de 133 (85,3%). Esse valor engloba tanto as infecções monoparasitárias por *G. lamblia* quanto as poliparasitárias que envolveram a associação desse protozoário com *Cryptosporidium* sp. e/ou *E. histolytica*. Esse valor (85,3%) está de acordo com as taxas de prevalência relatadas para a região Nordeste (de 53,0 % a 89,9%), representando as mais elevadas quando comparadas às demais regiões do Brasil (MACEDO et al., 2003).

Observando a **Figura 9**, verifica-se a predominância do enteroparasita *G. lamblia* sobre os demais. A elevada prevalência desse protozoário pode ser explicada pela falta de indivíduos sintomáticos, porque liberam ativamente os cistos nas fezes, uma vez que não são tratados (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005), a resistência e a elevada infectividade dos cistos, visto que são liberados em grande número nas fezes.

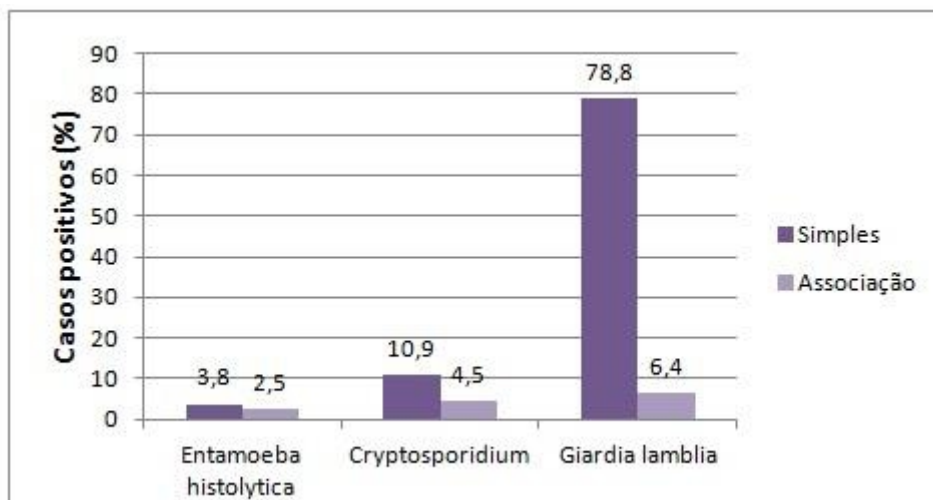
Dentre as 156 crianças infectadas com pelo menos um dos parasitas pesquisados, 146 (93,5%) apresentaram infecção simples e 10 (6,5%) associadas. Na **Figura 9**, podem ser observadas as prevalências das infecções simples e das associações, por espécie. O hospedeiro humano pode albergar diferentes espécies de enteroparasitas e o fato de o ambiente externo apresentar graus elevados de contaminação aumenta a probabilidade de infecções com poliparasitismo (MASCARINI, YOSHIDA, 1999). No estudo realizado, verificou-se o predomínio de infecções monoparasitárias.

Nas últimas décadas, têm-se registrado profundas mudanças na força de trabalho da população em diversas cidades, em função da maior urbanização. Isso se reflete no fato de que 95,2% das crianças possuem água encanada, o que contribui para a frequência de enteroparasitoses observadas, nestas crianças estudadas, ter ficado abaixo da observada em outros trabalhos, como a frequência de 19,7% para *E. histolytica* encontrada por COURA et al (1994).

Tabela 9 - Prevalências das infecções simples e das associações de protozoários intestinais na população positiva (n=156); e amostras negativas para todos os parasitas (n=444).

Presença de parasitas	Nº	(%)
Positivo para apenas um parasita		
<i>Entamoeba histolytica</i>	6	1
<i>Cryptosporidium spp</i>	17	2,8
<i>Giardia lamblia</i>	123	20,5
Positivo para associações		
<i>E. histolytica</i> + <i>Cryptosporidium spp</i>	0	0,0
<i>G. lamblia</i> + <i>E. histolytica</i>	3	0,5
<i>G. lamblia</i> + <i>Cryptosporidium spp</i>	6	1
<i>G. lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>Cryptosporidium spp</i>	1	0,2
Total	156	26,0
Negativo	444	74,0
Total	600	100,0

Figura 9 - Prevalências das infecções simples e associações, por espécie de protozoários intestinais, na população.



5 Conclusão

Diante os resultados observados, conclui-se que a tecnologia xMAP pode ser utilizada no diagnóstico de protozoários presentes em amostras de fezes, em decorrência da sua especificidade e sensibilidade.

Dentre os parasitas estudados, *Giardia lamblia* apresentou a maior frequência, tanto em infecções monoparasitárias quanto em infecções com poliparasitismo.

Através dos valores obtidos, também pode-se concluir que, de modo geral, a prevalência de protozoários nas crianças analisadas foi baixa se comparada a estudos anteriores, representando uma queda no número de infecções por esses protozoários. Isso pode estar relacionado a fatores como o consumo de água tratada pela maior parte da população estudada e a presença de rede de esgoto. Desse modo, observa-se a existência de uma relação direta entre a frequência de enteroparasitoses nas crianças e ao fator socioeconômico renda familiar, e a fatores higiênico-sanitários como: a origem da água de beber, tratamento realizado antes de utilizar a água para beber e o tipo de saneamento presente nas residências.

Estudos a respeito de possíveis mecanismos genéticos relacionados à infecção por esses parasitas poderão fornecer informações para possíveis intervenções terapêuticas ou preventivas.

REFERÊNCIAS

ADAM, R. D. Biology of Giardia lamblia. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n. 3, p. 447-475, 2001.

AISSE, M. M. Sistemas econômicos de tratamento de esgotos sanitários. In **Sistemas econômicos de tratamento de esgotos sanitários**. ABES, 2000.

CARVALHO, O. S.; GUERRA, H. L.; CAMPOS, Y. Y.; CALDEIRA, R. L.; MASSARA, C. L. Prevalência de helmintos intestinais e três mesorregiões do estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 601-607, 2002.

CASTRO, T. G.; NOVAES, J. F.; SILVA, M. R.; COSTA, N. M. B.; FRANCESCHINI, S. C. C.; TINÔCO, A. L. A.; LEAL, P. F. G. Caracterização do consumo alimentar, ambiente socioeconômico e estado nutricional de pré-escolares de creches municipais. **Revista Nutrição**, v. 8, n.3, p. 321-330, 2005.

Comissão Nacional sobre Determinantes Sociais da Saúde. As causas sociais das iniquidades em saúde no Brasil: relatório final da Comissão Nacional sobre Determinantes sociais da saúde. Rio de Janeiro, RJ: Fiocruz; 2008.

COURA, J. R.; WILLCOX, H. P. F.; TAVARES, A. M.; PAIVA, D. D.; FERNANDES, O.; RADA, E. L. J. C.; NOGUEIRA, M. L. C. Aspectos Epidemiológicos, Sociais e Sanitários de uma Área no Rio Negro, Estado do Amazonas, com especial referência às parasitoses intestinais à infecção chagástica. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, suppl. 2, p. 327-336, 1994.

EISENBERG, J. N.; LEI, X.; HUBBARD, A. H.; BROOKHART, M. A.; COLFORD, J. M. The role of disease transmission and conferred immunity in outbreaks: analysis of the 1993 Cryptosporidium outbreak in Milwaukee, Wisconsin. **American journal of epidemiology**, v. 161, n. 1, p. 62-72, 2005.

FARTHING, M. J. Giardiasis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v 25, n. 3, p. 493-515, 1996.

FARTHING, M. J. Acute diarrhea: pathophysiology. In: Gracey, M., Walker-Smith, J. A. Diarrheal disease in perspective. In **Diarrheal diseases**, v. 38, p. 1-11, 1997.

FAYER, R., MORGAN, U., UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12, p. 1305-1322, 2000.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 7, p. 931-943, 2003.

FREITAS, M. B.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. D. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, n. 3, 651-60, Rio de Janeiro, 2001.

GONÇALVES, E. M. N.; SILVA, A. J.; EDUARDO, M. B. P.; UEMURA, I. H.; MOURA, I. N. S.; CASTILHO, V. L. P. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, n. 2, p. 119-126, 2006.

GUERRANT, R. L.; KOSEK, M.; LIMA, A. A.; LORNTZ, B.; GUYATT, H. L. Updating the DALYs for diarrhoeal disease. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 191-193, 2002.

GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B.; MOORE, S. R.; ORIÁ, M. O.; LIMA, A. A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutrition reviews**, v. 66, n. 9, p. 487-505, 2008.

HELLER, L.; BASTOS, R. K. X.; VIEIRA, M. B. C. M. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana, **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 2, p. 79-92, 2004.

JOMBO, G. T.; EGAH, D. Z.; AKOSU, J. T. Intestinal parasitism, potable water availability and methods of sewage disposal in three communities in Benue State, Nigeria: a survey.

Annals of African Medicine, v. 6, n. 1, p. 17-21, 2007.

LIMA, I. F. N. Genes codificadores de fatores de virulência, inflamação e avaliação nutricional da infecção intestinal associada com *Escherichia coli* enteroagregativa em crianças de Fortaleza, Ceará, Brasil, 2008.

KING, B. J.; HOEFEL, D.; DAMINATO, D. P.; FANOK, S.; MONIS, P. T. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1311-1323, 2008.

LIU, J.; GRATZ, J.; MARO, A.; KUMBURU, H.; KIBIKI, G.; TANIUCHI, M.; HOUPPT, E. R. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 1, p. 98-103, 2011.

LIU, J.; KIBIKI, G.; MARO, V.; MARO, A.; KUMBURU, H.; SWAI, N.; HOUPPT, E. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. **Journal of Clinical Virology**, v. 50, n. 4, p. 308-313, 2011.

MACEDO, H. W., et al. Parasitoses intestinais em região semi-árida do nordeste do Brasil: resultados preliminares distintos das prevalências esperadas. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 19, p 667-670, 2003.

MARQUES, T.; BANDEIRA, S. M.; MARINHO, C. Q. Prevalência de enteroparasitoses em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 60, n. 1-2, p. 78-81, 2005.

MASCARINI, L. M., YOSHIDA, E. L. A. Prevalência de parasitas intestinais, com ênfase em *Cryptosporidium* sp, em creche municipal de Botucatu-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA. XVI. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia**, p. 176, 1999.

MORGAN-RYAN, U. M.; FALL, A.; WARD, L. A.; HIJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, n.6, p. 433-440, 2002.

MOTTA, M. E. F. A.; SILVA, Gisélia Alves Pontes da. Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife , v. 2, n. 2, 2002 .

NASH, T. E. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 585-590, 2002.

NASH, T. E., WELLER, P. F. Protozoal intestinal infections and trichomoniasis. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, p. 1202-1205, 1997.

NETO, V. A.; AMATO, V. S.; GRYSCHKEK, R. C. B.; TUON, F. F. **Parasitologia: uma abordagem clínica**. Elsevier, 2008.

PAWLOWSKI, S. W.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1874-1886, 2009.

PEREIRA, J. T.; COSTA, A. O.; de OLIVEIRA SILVA, M. B.; SCHUCHARD, W.; OSAKI, S. C.; de CASTRO, E. A.; SOCCOL, V. T. Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Parana State, Southern Brazil. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 151, n. 2-3, p. 464-473, 2008.

PREIDIS, G. A.; HILL, C.; GUERRANT, R. L.; RAMAKRISHNA, B. S.; TANNOCK, G. W.; VERSALOVIC, J. Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 8, 2011.

QUE, X.; REED, S. L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, p. 1089-1094, 2000.

QUE, X.; REED, S. L. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. **Parasitology Today**, v. 13, p. 190-194, 1997.

ROSSLE, N. F.; LATIF, B. Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 11, p. 916-924, 2013.

RYAN, U. M.; MONIS, P.; ENEMARK, H. L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; et al. *Cryptosporidium suis* n. sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v. 90: 769-773, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)**. Cold Spring Harbor, New York, v. 999, 2001.

SOGAYAR, M. I. T. L.; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**, 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu, cap. 14, p. 121-126, 2005.

SHERRY, A. D., DAN, L. Technology and Applications for Biological Analysis in China. **Asian Biotech**, v. 14, n. 10, 2010.

STANLEY, S. L.; JR. Amoebiasis. **Lancet**, v. 361, p. 1925-1034, 2003.

TAMBURRINI, A.; TOSINI, F.; LA ROSA, G.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. Identification and characterization of three antigenic proteins from *Cryptosporidium parvum* sporozoites using a DNA library expressing poly-histidine tagged peptides. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 12, p. 1925-1933, 1999.

TANIUCHI, M.; WALTERS, C. C.; GRATZ, J.; MARO, A.; KUMBURU, H.; SERICHANTALERGS, O.; HOUP, E. R. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 73, n. 2, p. 121-128, 2012.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4: 1047-1058, 2002.

UNICEF, Improving Child Nutrition: The Achievable Imperatives for Global Progress. New York: United Nations Children's Fund; 2013.

VASCONCELOS, I. A. B. et al. Prevalência de parasitoses intestinais entre crianças de 4-12 anos no Crato, estado do Ceará, um problema recorrente de saúde pública. Fortaleza (CE, Brasil). **Acta scientiarum Health sciences**, Maringá, v. 33, n.1, p. 35-41, 2011.

WALSH, J. A.; RAVDIN, J. I. Prevalence of Entamoeba histolytica infection. **Amebiasis; human infection by Entamoeba histolytica**, p. 93-105, 1988.

ZANCUL, M. de S. Água e Saúde. **Revista Eletrônica de Ciências**, n. 32, São Carlos, abril 2006.

ZLOBL, T. L. Amebiasis. **Primary care update for Ob/Gyns**, v. 8, n. 2, p. 65-68, 2001.

ANEXO 1 - Protocolo COMEPE nº 238/05

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 338/09

Fortaleza, 20 de novembro de 2009

Protocolo COMEPE nº 238/05

Pesquisador responsável: Aldo Ângelo Moreira Lima

Deptº./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC

Título do Projeto: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil - Subprojeto 2A"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou a realização do subprojeto 2A na reunião do dia 19 de novembro de 2009 nas cidades de Crato, Picos, Cajazeiras, Sousa, Limoeiro e Pacajus cujas declarações de anuência foram apresentadas.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro.

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

*Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil
(Semi-Árido Brasileiro: Objetivos 2a e 2c)*

Nome do Participante _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando sua criança para participar de uma pesquisa de genética para infecções gastrointestinais e impedimento de crescimento e desenvolvimento. Este estudo é uma parceria entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade da Virgínia, nos Estados Unidos. Amostras de fezes, dados antropométricos e dados sócio-culturais serão coletados e examinados. Faremos testes de DNA nas amostras coletadas para ver as características hereditárias que podem previamente produzir infecções gastrointestinais ou impedimento do crescimento e desenvolvimento.

O objetivo deste estudo é aprender sobre a tendência para infecções gastrointestinais e seus efeitos no desenvolvimento. O objetivo do teste genético é identificar os fatores que contribuem para o desenvolvimento de certas doenças.

Para participar deste estudo você deve concordar com os termos aqui expostos.

O que estamos tentando descobrir:

Sua criança foi selecionada porque mora numa cidade situada na região do semi-árido brasileiro e está na faixa etária entre 2 e 36 meses, além de não apresentar sintoma diarréico nos últimos 15 dias antes da coleta das amostras.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o impacto das doenças diarréicas em crianças de comunidades carentes de Fortaleza. Os estudos realizados permitiram a associação entre as diarréias persistentes e algumas infecções entéricas específicas com a ruptura da barreira intestinal, provocando alterações na sua função absorptiva e predispondo crianças a uma maior carga diarréica. Observamos que a ocorrência de doenças diarréicas nos dois primeiros anos de vida e a presença de determinados patógenos entéricos, podem influenciar no crescimento linear da criança. Episódios de diarréia persistente nos dois primeiros anos de vida mostraram ter associação com um déficit de crescimento de 1,5 a 4cm aos 4 a 6 anos de idade nessas crianças. Além disso, a idade de início da criança na escola e a idade por ano escolar são significativamente atrasadas pelas doenças diarréicas ocorridas no início da infância.

Na busca por alternativas para a diminuição do impacto causado pelas doenças diarréicas causadas por vírus, bactérias ou parasitas, observamos a grande eficiência da solução de re-hidratação oral baseada em glutamina quando comparada à tradicional solução à base de glicose. Além disso, temos testado a influência da suplementação de micronutrientes, como zinco, vitamina A e arginina, na dieta de crianças susceptíveis às doenças diarréicas, observando a redução no número de crianças doentes.

Estes estudos têm sido realizados em duas comunidades carentes de Fortaleza: Parque Universitário e Gonçalves Dias, ambas situadas em Fortaleza e próximas à Faculdade de Medicina. Acompanhando os quadros diarréicos dessas duas comunidades ao longo dos últimos 20 anos, observamos que mesmo nas crianças que não apresentam diarréia como sintoma, ainda existe uma alta prevalência de inflamação intestinal e de enteropatógenos que podem oportunamente causar as doenças diarréicas quando as defesas imunológicas são reduzidas. Isso vem acontecendo principalmente em virtude de condições higiênic-sanitárias insatisfatórias e da carência de uma dieta nutricional balanceada.

Para que possamos realmente avaliar o impacto lesivo da presença destes agentes infecciosos, principalmente quando não há diarréia, se faz necessária a avaliação destes agentes em crianças que não residem nessas comunidades. Os resultados deste estudo para os participantes serão mensurados em termos de conhecimento do risco para as doenças diarréicas. A sociedade em geral se beneficia de qualquer redução nestas doenças da pobreza.

O que acontecerá:

Existem duas partes para este estudo:


1. Um profissional de saúde (enfermeira e/ou agente de saúde) coletará uma amostra de fezes e um pouco de saliva, através de um bochecho, de sua criança;
2. Um questionário será aplicado para coletar informações sócio-ambientais;
3. Medidas antropométricas serão também verificadas e registradas em um formulário;
4. As amostras serão enviadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas para realizar testes específicos para este estudo. As amostras de fezes serão avaliadas através de métodos e técnicas de biologia molecular para a detecção de bactérias que prejudicam o intestino;
5. Suas amostras ficarão armazenadas por 5 anos após o final do estudo para futuras validações dos testes.

Benefícios:

A detecção de helmintos e protozoários, através do exame parasitológico de fezes, ou de crescimento de bactéria reconhecidamente prejudicial ao intestino será informada aos responsáveis e uma indicação de tratamento será indicada pelo médico pediatra responsável pelo estudo.

Versão: 06.04.2009

(Versão: 001)


Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

Página 1 de 2

Riscos:

Não existem riscos físicos, sociais ou psicológicos neste estudo.

Confidencialidade:

A confidencialidade e a privacidade dos dados de sua criança serão resguardadas, segundo normas éticas brasileiras.

Responsabilidade em Caso de Danos:

Se seu filho apresentar qualquer dano como resultado direto do estudo, você deverá entrar em contato com o Dr. Aldo Lima no fone: 3366 8437 para receber a terapia necessária. Qualquer dano resultante de sua participação será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e assistência integral que você passa a ter direito ao assinar este formulário de consentimento e entrar na pesquisa, pois todo dano mediante o estudo é de inteira responsabilidade do pesquisador.

Para quem ligar:

Se você tem: (1) alguma questão sobre o estudo, por favor ligue para Dr Aldo A.M. Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (Tel.: 3366 8445); (2) alguma questão sobre seus direitos como participante de um estudo, por favor ligue para Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), Tel.: 3366.8346, ou peça a alguém do estudo para ajudar você a contatar com as pessoas citadas acima.

Direito de desistir:

A participação de sua criança neste estudo é completamente voluntária. Você é livre para retirá-la do estudo a qualquer momento sem prejuízos. Apenas avise a um dos membros da equipe.

Nome do Sujeito
(Se < 18 anos)

Pai ou Guardião Legal
(NOME LETRA FORMA)

Pai ou Guardião Legal
(ASSINATURA)


dd/ mm/ ano

Assinatura da Testemunha

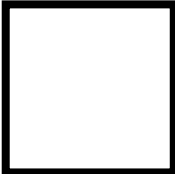
dd/ mm/ ano

Assinatura do Membro da Pesquisa

dd/ mm/ ano


Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

Anexo 3 - Formulário Etiologia de Diarreia do Semi-Árido

FORMULÁRIO			
ETIOLOGIA DE DIARREIA DO SEMI-ÁRIDO			
Caso não exista resposta para alguma pergunta, escreva ND como resposta.			
#	Questão	Código	Resposta
01	Data da Aplicação do Questionário	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre a criança:			
02	Data de nascimento	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
03	Sexo	1=masculino; 2=feminino	<input type="checkbox"/>
04	Alimentação da criança	1=amamentação exclusiva; 2=amamentação não-exclusiva; 3=não amamenta mais; 4=nunca foi amamentada; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
05	Se a resposta anterior for 3 (não amamenta mais), por quanto tempo a criança foi amamentada?	meses	<input type="text"/> <input type="text"/>
Antropometria:			
06	Peso	kg	<input type="text"/> <input type="text"/> , <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>

07	Altura	cm	<input type="text"/> <input type="text"/> , <input type="text"/> <input type="text"/>
08	Circunferência da cabeça	cm	<input type="text"/> <input type="text"/> , <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre o responsável:			
09	Grau de parentesco com a criança	1=mãe; 2=pai; 3=avó (ô); 4=vizinha(o); 5=tia (o), 6=outro	<input type="text"/>
10	Caso a resposta à questão anterior seja 6 (outro parentesco), favor especificar.		_____
11	Idade da mãe da criança	anos	<input type="text"/> <input type="text"/>
12	Grau de escolaridade da mãe	1= não estudou; 2=primário incompleto; 3=primário completo; 4=secundário incompleto; 5=secundário completo, 6=superior incompleto; 7=superior completo; 9=não sabe	<input type="text"/>
13	Idade da primeira gestação	anos	<input type="text"/> <input type="text"/>
Condições sócio-econômicas e higiênico-sanitárias da família da criança:			
14	Qual o tipo de casa em que a criança vive?	1=taipa; 2=alvenaria; 3=mista; 4=outra; 9=não sabe	<input type="text"/>
15	Caso a resposta à questão anterior seja 4 (outro tipo de habitação), favor especificar.		_____

16	Número total de cômodos/compartimentos da casa		<input type="text"/> <input type="text"/>
17	Número total de habitantes da casa (crianças e adultos)		<input type="text"/> <input type="text"/>
18	Número de habitantes da casa menores de 5 anos		<input type="text"/> <input type="text"/>
19	Renda familiar (em salários mínimos)	1= < ½ ; 2= ½ a ≤1; 3=1 a ≤2; 4=2 a ≤3; 5=3 a ≤5; 6= >5; 9=não sabe	<input type="text"/>
20	A água de beber da casa é proveniente de	1= água encanada; 2=poço profundo; 3=cacimba; 4=carroça; 5=rio/açude; 6=cisterna; 7=carro pipa; 8=água mineral; 9=não sabe; 10=outra fonte	<input type="text"/>
21	Caso a resposta à questão anterior seja 10 (outra fonte de água), favor especificar.		<hr/>
22	O que faz antes de utilizar a água para beber?	1= ferve; 2=usa filtro; 3=usa solução de cloro; 4=nenhuma ação; 5=outra; 9=não sabe	<input type="text"/>
23	Caso a resposta à questão anterior seja 5 (outra ação), favor especificar.		<hr/>

24	Tipo de esgotamento sanitário da casa	1=fossa; 2=rede/esgoto público (sanear); 3=sem sistema de esgoto	<input type="checkbox"/>
25	Há sanitário dentro da casa?	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
26	Existe água corrente e sabão para lavar as mãos perto do sanitário?	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
27	Com qual frequência água corrente e sabão são utilizados para lavar as mãos?	1=sempre; 2=frequentemente; 3=poucas vezes; 4=raramente; 5=nunca; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
28	Crianças menores de 5 anos defecam no chão da casa/quintal?	1=sempre; 2=frequentemente; 3=poucas vezes; 4=não ou raramente, 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
29	Animais costumam ficar dentro de casa ou ao redor (no quintal)?	1=sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
30	Caso a resposta à questão anterior seja 1 (sim), favor especificar qual(is) animal(is).		<hr/>
Condições clínicas da criança			
31	Sua criança apresentou 3 ou mais fezes líquidas nas	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>

	últimas 24 horas? (CASO A RESPOSTA SEJA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 38)		
32	Caso a resposta à questão anterior seja 1 (sim), favor especificar a quantos dias a criança vem apresentando diarreia.		<input type="text"/> <input type="text"/>
33	Quantas evacuações em 24 horas? (Maior número recordado)		<input type="text"/> <input type="text"/>
34	Sinais/sintomas observados pelo guardião ou reportados pela criança:		
34.1	Dor abdominal	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
34.2	Vômito		<input type="checkbox"/>
34.3	Muco nas fezes		<input type="checkbox"/>
34.4	Sangue nas fezes		<input type="checkbox"/>
34.5	Fraqueza		<input type="checkbox"/>
34.6	Inquietação		<input type="checkbox"/>
34.7	Tosse ou sintomas respiratórios		<input type="checkbox"/>
34.8	Desidratação (Entrevistador, favor se reportar à tabela 1, em anexo, para classificação de desidratação ao final do questionário)	1=moderada; 2=grave; 7=grau não identificado; 8=não está desidratada; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
34.9	Febre	1= sim;	<input type="checkbox"/>

		2=não; 9=não sabe	
34.9.1	Caso tenha realizado medida com termômetro, informe a maior medida recordada.	Medida em °C (ou ND)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> ,
34.10	Outros sintomas ou doenças concomitantes	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
35	Caso a resposta à questão 34.10 seja 1 (sim), favor especificar.		<hr/> <hr/> <hr/>
36	A criança recebeu algum tratamento durante a diarreia?	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
37	Caso a resposta à questão 36 seja 1 (sim), favor especificar.		<hr/> <hr/> <hr/>
38	Sua criança apresentou diarreia nos últimos 14 dias?	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
Situação vacinal da criança			
39. A criança recebeu as seguintes vacinas? 1= sim; 2=não; 9=não sabe			

39.1	BCG (ao nascer, contra formas graves de tuberculose)	<input type="checkbox"/> ao nascer			
39.2	SRC (sarampo, rubéola, caxumba, 12 meses)	<input type="checkbox"/> 12 meses			
39.3	Hepatite B (ao nascer, reforços em 1 e 6 meses)	<input type="checkbox"/> 1 mês	<input type="checkbox"/> 6 meses		
39.4	VORH (vacina oral contra rotavírus humano; 2 e 4 meses)	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses		
39.5	Hib (meningite e outras infecções causadas pelo <i>Haemophilus influenzae</i> tipo B; 2, 4 e 6 meses)	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	
39.6	DPT: "Tríplice" (difteria, tétano, coqueluche: 2, 4, 6 e 15 meses)	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 15 meses
39.7	VOP: "Gotinha" (vacina oral contra pólio; 2, 4, 6 e 15 meses)	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 15 meses

Questões para o entrevistador			
40	Foi coletada amostra de fezes?	1= sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
41	Foi coletada amostra de saliva?	1= sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
42	A criança foi classificada como caso ou controle?	1= caso; 2=controle	<input type="checkbox"/>

Entrevistador: _____

Assinatura: _____

--	--	--	--	--	--

ANEXO

Tabela 1: Classificação dos graus de desidratação

PERGUNTAS	RESPOSTAS*		
	A	B	C
Diarréias	Até 4 dejeções líquidas/dia <input type="checkbox"/>	De 4 a 10 dejeções líquidas/dia <input type="checkbox"/>	+ de 10 dejeções líquidas/dia <input type="checkbox"/>
Vômitos	Ausente <input type="checkbox"/>	Pouca quantidade <input type="checkbox"/>	Muito frequente <input type="checkbox"/>
Sede	Normal <input type="checkbox"/>	Aumentada <input type="checkbox"/>	Não pode beber <input type="checkbox"/>
Urina	Normal <input type="checkbox"/>	Pouca, escura <input type="checkbox"/>	Nenhuma em 6h <input type="checkbox"/>
Olhos	Normais <input type="checkbox"/>	Fundos <input type="checkbox"/>	Muito fundos <input type="checkbox"/>
Boca e Língua	Molhadas <input type="checkbox"/>	Secas <input type="checkbox"/>	Ressecadas <input type="checkbox"/>
Pele	Pressionada, volta ao normal <input type="checkbox"/>	Pressionada, volta lentamente <input type="checkbox"/>	Pressionada, volta muito lentamente <input type="checkbox"/>
Desidratação	Caso apresente estes sintomas:	Caso apresente dois ou mais destes sintomas	Caso apresente dois ou mais destes sintomas
	NÃO	SIM, MODERADA	SIM, GRAVE

*As respostas A, B e C correspondem a intensidades crescentes dos sinais e sintomas de desidratação.