

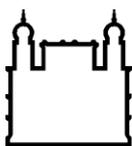
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação de Biologia Parasitária

**FREQUÊNCIA, FACTORES ASSOCIADOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM CRIANÇAS ATENDIDAS NA CIDADE DE
MAPUTO NO ÂMBITO DA VIGILÂNCIA NACIONAL DE DIARREIAS AGUDAS**

Hermínio Fernando Humberto Cossa

Maputo
Julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

HERMÍNIO FERNANDO HUMBERTO COSSA

**FREQUÊNCIA, FACTORES ASSOCIADOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM CRIANÇAS ATENDIDAS NA CIDADE DE
MAPUTO NO ÂMBITO DA VIGILÂNCIA NACIONAL DE DIARREIAS AGUDAS**

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biologia
Parasitária

Orientadores: Prof. Dra. Nilsa Olívia Razão de Deus
Prof. Dra. Alda Maria da Cruz

MAPUTO
Julho de 2017

Cossa, Hermínio Fernando Humberto .

Frequência, factores associados e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em crianças atendidas na cidade de Maputo no âmbito da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas / Hermínio Fernando Humberto Cossa. - Maputo, 2017.

xvi, 72 f.; il.

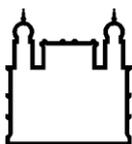
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientadora: Nilsa Olívia Razão de Deus.

Co-orientadora: Alda Maria da Cruz.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Cryptosporidium hominis*. 2. PCR-RFLP. 3. Crianças. 4. Diarreia aguda. 5. Maputo. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Hermínio Fernando Humberto Cossa

FREQUÊNCIA, FACTORES ASSOCIADOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM CRIANÇAS ATENDIDAS NA CIDADE DE MAPUTO NO ÂMBITO DA VIGILÂNCIA NACIONAL DE DIARREIAS AGUDAS

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Nilsa Olívia Razão de Deus

Prof. Dr. Alda Maria da Cruz

Aprovada em 12/Julho/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Manoel Barral Neto - Presidente (Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Bahia)

Prof. Dra. Tacilta Nhampossa - Vogal (Centro de Investigação em Saúde de Manhiça)

Prof. Dr. Emílio Valverde - Vogal (Universidade Eduardo Mondlane, Maputo)

Prof. Dra. Rosely Zancopé de Oliveira - Suplente (Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ/RJ)

Maputo, 12 de Julho de 2017

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha amada e atenciosa esposa Marcela Samuel Chibicane pelos momentos de ausência. Em memória à minha mãe Percina Amadeu Matsimbe e aos meus melhores amigos, formadores e pais Humberto José Fernando Manuel Cossa e Felizarda Alfredo Chaúque.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos são dirigidos:

À Deus, que me proporcionou, durante o árduo trabalho de campo, e ainda continua me proporcionando, vida, saúde e energia necessária para seguir em frente e realizar os meus sonhos.

Às minhas orientadoras Dra. Nilsa de Deus e Alda Maria Da-Cruz e co-orientadoras, Dra. Idalécia Cossa Moiane e Maria Fantinatti, eterna gratidão, admiração e respeito por tudo que me ensinaram, e cujo apoio e palavras de incentivo, me ajudaram a manter forte o espírito de trabalho, pesquisa e dedicação. Que a Graça de Deus esteja sempre com elas.

A todos os técnicos e funcionários do Laboratório de Parasitologia molecular, sector de parasitologia Intestinal e Vesical e Laboratório de Biologia Molecular, ambos no Instituto Nacional de Saúde pelo apoio material, pelas orientações, incentivo moral em cada etapa da minha formação e incontestável contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo do Macroprojecto de Doenças Gastrointestinais, em especial a equipe da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas (ViNaDiA) em Crianças que contribuíram incondicionalmente e com abnegação para a minha formação e concretização deste trabalho.

A todos os técnicos e funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Militar de Maputo, em especial ao dr. Carlos Tirroso (responsável pela secção de parasitologia), dr. Andarusse Sumail, dr Nelson Vilanculos, pelo apoio incondicional durante este trabalho.

A todos os técnicos e funcionários do Hospital Geral de Mavalane (HGM) e Hospital Geral José Macamo (HGJM), particularmente o Serviço de Pediatria e em especial enfermeira Aunésia Manunele, dra. Judite Saliência, dra. Virgínia, dra. Maria, enfermeira Mércia e enfermeira Elsa (todas do HGM) e à dra Olga Madede, Dra. Safrina, dra Elsa, enfermeiras Marcela Malate, Dina, Celeste e Dália (todas do HGM) pelo apoio material, moral e incentivo em cada etapa da minha formação e em especial durante a realização deste trabalho.

A todos os técnicos, funcionários, pesquisadores e estudantes do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas/Instituto Osvaldo Cruz (LIPMED)/IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro; em especial ao grupo de parasitoses intestinais (Luiz, Tiara, Filipe, Maria, Alda); ao Clébio, Raquel, Tainah, Andrea, Mariangela, e os

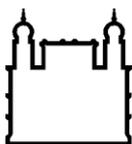
demais que não foram aqui mencionados, pelos momentos de aprendizado, apoio incondicional, incentivo, ajudando-me a superar todas dificuldades durante a minha pesquisa.

Agradeço a todos meus colegas da quarta (4^a) turma de Mestrado em Ciências de Saúde, obrigado pelo companheirismo, pela colaboração e cooperação ao longo da formação.

Ao meu pai, Humberto Cossa, minha mãe, Felizarda Chaúque e minha esposa, Marcela Chibicane, pelo apoio material e moral, incentivo e mais importante, a compreensão dos meus momentos de ausência em cada etapa da minha formação, incansáveis e sempre presentes nos momentos mais importantes e difíceis, aconselhando-me e minimizando as dificuldades.

Aos meus irmãos, Humberto Jr, Manuel, Helena e Joaquim; meus primos, Santos, Daniel, Cláudio, Nicolau, Lígia, Humberto, Hélder, e outros que aqui não mencionei, obrigado pela motivação e apoio que sempre me proporcionaram em todos os momentos da nossa convivência; pelo apoio moral e incentivo; pelo acompanhamento de todos passos durante a minha formação, pelos conselhos sinceros e apoio incondicional sobre a minha saúde.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos, que de forma directa ou indirecta contribuíram para a realização deste grande sonho que é a minha formação, em especial a realização deste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

FREQUÊNCIA, FACTORES ASSOCIADOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM CRIANÇAS ATENDIDAS NA CIDADE DE MAPUTO NO ÂMBITO DA VIGILÂNCIA NACIONAL DE DIARREIAS AGUDAS

RESUMO

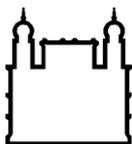
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Hermínio Fernando Humberto Cossa

Cryptosporidium é uma das causas mais importantes de diarreia em menores de 2 anos de idade, porém, pouco se sabe sobre a caracterização molecular de espécies de *Cryptosporidium* em Moçambique. Este estudo objectivou determinar a frequência, os factores associados e de espécies/genótipos de *Cryptosporidium* em crianças admitidas em dois hospitais públicos de Maputo, Moçambique no âmbito da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas. Foram estudados 319 pacientes de 0 a 60 meses de idade, admitidos por diarreia aguda, entre Abril de 2015 a Fevereiro de 2016 no Hospital Geral de Mavalane e José Macamo, em Maputo. As características clínico-epidemiológicas foram aferidas por questionário estruturado e as amostras fecais foram examinadas quanto à presença de oocistos de espécies de *Cryptosporidium* usando a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada. O ADN foi isolado de 192 amostras e analisadas usando técnica da Reacção em Cadeia de Polimerase (RCP) e “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) baseado no gene 18S ARN ribossomal (SSU rRNA) de *Cryptosporidium*. Ao todo, 57.7% (184/319) crianças eram do sexo masculino e a mediana da idade (Intervalo InterQuartil, IIQ) foi de 11.0 (7 a 15) meses. A frequência de detecção de oócitos de *Cryptosporidium* spp. por microscopia directa foi de 10.9% (35/319). A faixa etária, a falta de educação formal do cuidador e a dieta da criança à base de leite artificial constituíram significantes factores de risco para aquisição da infecção. O ADN de *Cryptosporidium* spp. foi detectado em 35.4% (68/192) por PCR convencional e destas, a infecção por *C. hominis* (93.1%, 27/29) foi a mais comum, seguida por *C.*

parvum genótipo bovino (3.45%, 1/29) e uma infecção mista com *C. hominis* e *C. parvum* genótipo bovino (3.45%, 1/29). Estes resultados sugerem que *C. hominis* é a maior causa da cryptosporidose em Maputo e mostram implicações importantes na saúde pública porque revela que ações de educação em saúde, melhoria das condições sanitárias e nutricionais podem reduzir de forma significativa a cryptosporidose em Maputo.

Palavras-chaves: *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum*, Crianças, Diarreia aguda, PCR-RFLP, Maputo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

FREQUENCY, ASSOCIATED FACTORS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. IN CHILDREN ATTENDED IN MAPUTO CITY IN THE CONTEXT OF NATIONAL SURVEILLANCE FOR ACUTE DIARRHEA

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITIC BIOLOGY

Hermínio Fernando Humberto Cossa

Cryptosporidium is one of the most important causes of diarrhea in children less than 2 years of age, but little is known about the molecular characterization of *Cryptosporidium* species in Mozambique. This study aimed to determine the frequency, associated factors and *Cryptosporidium* species in children admitted to two public hospitals in Maputo, Mozambique under the National Surveillance of Acute Diarrhea. We studied 319 patients 0-60 months old, admitted for acute diarrhea between April 2015 and February 2016 in Hospital Geral de Mavalane and José Macamo, in Maputo. Clinical and epidemiological characteristics were accessed using a structured questionnaire and stool samples were examined for the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts using Modified Ziehl-Neelsen staining technique. DNA was isolated from 192 samples and analyzed using Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) based on the *Cryptosporidium* 18S ribosomal RNA gene. Overall, 57.7% (184/319) were males and the median of age (InterQuartil Range, IQR) was 11.0 (7-15) months. *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in 10.97% (35/319) by direct microscopy. The caregiver's age range and the lack of formal education and the child diet based on artificial milk constituted significant risk factors for acquiring the infection. *Cryptosporidium* spp. DNA was recovered from 35.4% (68/192) by conventional PCR and *C. hominis* infection (93.1%, 27/29) was the most common, followed by *C. parvum* bovine genotype (3.4% 1/29) and a mixed infection with *C. hominis* and *C. parvum* bovine genotype (3.4%, 1/29). These results suggest that *C. hominis* is the major cause of cryptosporidiosis in Maputo and show important

implications for public health because it reveals that health education actions and improvements in sanitary and nutritional conditions can significantly reduce cryptosporidiosis in Maputo.

Keywords: *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum*, Children, Acute diarrhea, PCR-RFLP, Maputo.

Índice

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Nota introdutória.....	1
1.2 Mecanismos de transmissão e ciclo de vida do <i>Cryptosporidium</i> spp. 1	
1.2.1 Mecanismos de transmissão.....	2
1.2.2 Ciclo de vida.....	3
1.3 Epidemiologia.....	3
1.4 Ocorrência de criptosporidose em Moçambique	5
1.5 Apresentação clínica da criptosporidose	6
1.6 Diagnóstico	7
1.7 Tratamento e profilaxia.....	8
1.8 Factores de risco.....	9
1.9 Espécies de importância médica.....	10
2 JUSTIFICATIVA.....	12
3 OBJECTIVOS	13
3.1 Objectivo Geral.....	13
3.2 Objectivos específicos.....	13
4 METODOLOGIA	14
4.1 Aspectos éticos	14
4.2 Área de estudo	14
4.2.1 Hospital Geral José Macamo	14
4.2.2 Hospital Geral de Mavalane	16
4.3 População de estudo e tamanho amostral	17
4.4 Recolha de informação	17
4.4.1 Aferições antropométricas.....	18
4.4.2 Indicadores nutricionais	18
4.4.3 Informações e definições clínicas	19
4.5 Recolha, transporte e armazenamento das amostras.....	20
4.6 Processamento laboratorial das amostras	20
4.6.1 Pesquisa parasitológica por microscopia óptica.....	21
4.6.2 Detecção molecular e genotipagem.....	23

4.7	Tratamento de dados e análise estatística	26
5	RESULTADOS.....	28
5.1	Perfil do estudo	28
5.2	Características gerais da população de estudo	29
5.2.1	Características sociodemográficas	29
5.2.2	Tipo de água usada, alimentação e hábitos de higiene ambiental 30	
5.2.3	Apresentação clínica.....	31
5.3	Frequência, distribuição da criptosporidose pela microscopia óptica e factores associados pela análise univariada.	32
5.3.1	Características sociodemográficas	33
5.3.2	Exposição a água, alimentação e hábitos de higiene	35
5.3.3	Apresentação clínica.....	36
5.4	Factores de risco associados à infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. pela análise multivariada	37
5.5	Detecção e caracterização molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	39
5.5.1	Amplificação do gene SSU rRNA de <i>Cryptosporidium</i> spp.	39
5.5.2	Nested PCR e análise da RFLP.....	41
6	DISCUSSÃO.....	43
6.1	Características sociodemográficas das crianças.....	44
6.2	Exposição a água, alimentação e hábitos de higiene.....	45
6.3	Apresentação clínica	47
6.4	Detecção e caracterização molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	50
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	52
8	PERSPECTIVAS	53
9	CONCLUSÕES.....	54
10	RECOMENDAÇÕES	55
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	APÊNDICE	A
1	APÊNDICE A	A
2	APÊNDICE B	B
3	APÊNDICE C	C
4	APÊNDICE D.....	D
5	APÊNDICE E	E

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de transmissão e disseminação de *Cryptosporidium* spp. As espécies e genótipos mais frequentes em infecções humanas são indicados pelo tamanho da fonte..... 2
- Figura 2.** Ciclo de Vida de *Cryptosporidium* spp. Adaptado de Kosek et al. (2001). . 4
- Figura 3.** Mapa da Área de Saúde do Hospital Geral José Macamo (NEP/HGJM). 15
- Figura 4.** Mapa da Área de Saúde do Hospital Geral de Mavalane (NEP/HGM) 16
- Figura 5.** Procedimento para o processamento de amostra fecal pela técnica de Ritchie. A) Homogeneização; B) Filtração, C) Centrifugação e D) Visualização das quatro camadas. Figuras A, B e C (Originais, Hermínio Cossa) e Figura D (WHO, 1991). 21
- Figura 6.** Preparação de esfregaços em lâminas microscópicas com amostra fresca (A) e sedimento resultante da técnica de Ritchie (B). Figuras 5 A (Original, Hermínio Cossa) e Figura B (WHO, 1991) 22
- Figura 7.** Procedimento para a coloração de Ziehl-Neelsen modificado. A) Fixação com Metanol absoluto, B) coloração com Carbol-Fucsina a 1%, C) diferenciação com solução acido-álcool a 3% e D) contra-coloração com Verde Malaquita a 1%. (Original, Hermínio Cossa). 22
- Figura 8.** Identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. através da microscopia óptica: coloração de Ziehl-Neelsen modificado. Oocistos corados a vermelho claro. Oocistos maduros com esporozoítos discerníveis (seta amarela). **A)** Contra coloração com verde malaquita; **B)** contra coloração com azul-de-metileno. Ampliação 1000 vezes. Microscópio Óptico Composto, Olympus (original, Hermínio Cossa). 23
- Figura 9.** Fluxo do estudo mostrando o número de crianças com diarreia aguda incluídas e o número de amostras disponíveis para detecção e caracterização molecular. Z-N - Ziehl-Neelsen 28
- Figura 10.** Frequência geral de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (n=319). 32
- Figura 11.** Distribuição de casos de cryptosporidose nas duas unidades sanitárias (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016) (n=319). 32
- Figura 12.** Distribuição de casos de cryptosporidose por residência (distritos) (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016) (n=319). 33

- Figura 13.** Detecção molecular de *Cryptosporidium* spp. pela PCR convencional baseado no gene SSU rRNA. M, marcador molecular (100 pb). Linhas 2 e 9 são amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. (≈1733 a 1750 pb). Linhas 1, 3, 4, 5 e 6 são amostras negativas. Linha 7 *Giardia lamblia* (controlo negativo), Linha 8, controlo negativo (água destilada). 39
- Figura 14.** Frequência de detecção de ADN de *Cryptosporidium* spp. por PCR convencional em amostras fecais de crianças de 0 a 60 meses de idade admitidas em duas Unidades Sanitárias da Cidade de Maputo (n=192). 40
- Figura 15.** Distribuição da frequência de detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp. por PCR convencional em amostras fecais de crianças de 0 a 60 meses admitidas em duas Unidades Sanitárias da Cidade de Maputo (n=192). 40
- Figura 16.** Detecção específica de ADN de *Cryptosporidium* spp. por nested PCR. Amplificação de um fragmento de aproximadamente 826 to 864 pb do gene SSU rRNA. M, marcador molecular (100 pb). Linhas 1 a 8, amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. Linha 9, controlo negativo..... 41
- Figura 17.** Genotipagem e especiação de isolados de *Cryptosporidium* por RFLP baseado no gene SSU rRNA. A esquerda, digestão com *SspI* e a direita com *Asel*. M, marcador molecular (100 pb). Linhas 1, 2, 4, 5 e 6, *C. hominis*. Linha 3, *C. parvum* genótipo Bovino. Linha 7, infecção mista com *C. hominis* e *C. parvum* genótipo bovino..... 41
- Figura 18.** Frequência de espécies e genótipos identificados no presente estudo. 42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características sociodemográficas por unidade sanitária (Hospital Geral de Mavalane e José Macamo) de crianças de 0 a 60 meses com diarreia aguda recrutadas no âmbito da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças na cidade de Maputo, Moçambique, Abril de 2015 a Fevereiro de 2016. 29
- Tabela 2.** Características sociodemográficas (exposição a água e hábitos de higiene) por unidade sanitária (HGM e HGJM) de crianças de 0 a 60 meses com diarreia aguda recrutadas no âmbito da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças na cidade de Maputo, Moçambique, Abril de 2015 a Fevereiro de 2016. 30
- Tabela 3.** Características clínicas dos pacientes por unidade sanitária de crianças de 0 a 60 meses com diarreia aguda recrutadas para o estudo da Vigilância de Diarreias Agudas em Crianças em Maputo, Moçambique, Abril de 2015 a Fevereiro de 2016. 31
- Tabela 4.** Associação entre as características sociodemográficas dos pacientes e a infecção por espécies de *Cryptosporidium* em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no HG-Mavalane e HG-José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016). 34
- Tabela 5.** Associação entre a exposição a água, hábitos de higiene, dieta, estado nutricional e a e a criptosporidose em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no Hospital Geral Mavalane e Hospital Geral José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016). 35
- Tabela 6.** Co-morbidades associadas à criptosporidose em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no HG-Mavalane e HG-José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016). 36
- Tabela 7.** Sinais e sintomas associados à criptosporidose em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no HG-Mavalane e HG-José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016). 37
- Tabela 8.** Factores de risco para infecção por espécies de *Cryptosporidium* em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no Hospital Geral - Mavalane e Hospital Geral José Macamo, análise multivariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016). 38

Tabela 9. Sumário da taxa de detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. segundo o método aplicado no presente estudo.....	42
Tabela 10. Associação entre variáveis clínico-epidemiológicas dos pacientes (χ^2 , p).	A
Tabela 11. Distribuição das variáveis quantitativas categorizadas segundo a proveniência (Unidades Sanitárias).....	B
Tabela 12. Relação das espécies de animais e sua distribuição segundo a proveniência das crianças.	B
Tabela 13. Associação entre idade da criança e idade do cuidador com infecção por espécies de <i>Cryptosporidium</i> em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no HG-Mavalane e HG-José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016).	B
Tabela 14. Distribuição das crianças participantes no presente estudo, segundo o local de residência e Unidade Sanitária de hospitalização (Fisher's Exact Test = 294.069, $p < 0.00001$).	C
Tabela 15. Distribuição de casos analisados por PCR convencional para detecção de espécies de <i>Cryptosporidium</i>	D
Tabela 16. Distribuição de casos analisados por PCR convencional para detecção de espécies de <i>Cryptosporidium</i>	E

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nota introdutória

A criptosporidose é uma condição patológica causada pela infecção por um parasito protozoário enteropatogénico do género *Cryptosporidium*, que se apresenta comumente como síndrome gastro entérico, podendo infectar outros locais tais como o trato respiratório, principalmente em pacientes imunocomprometidos (1). *Cryptosporidium* foi classificado tradicionalmente como pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, família Cryptosporidiidae (2). Após a revisão da classificação dos Eucariotas (3,4), o género *Cryptosporidium* foi formalmente transferido da subclasse Coccidia, classe Coccidiomorpha para nova subclasse Cryptogregarina, dentro da classe Gregarinomorpha, sendo o único membro da Cryptogregarina (5).

Segundo Ryan et al. (2016), as evidências na similaridade entre *Cryptosporidium* e Gregarins datam de 1978 e vários estudos mostram que, tal como Gregarins, espécies de *Cryptosporidium* têm a habilidade de completar o seu ciclo de vida na ausência de uma célula hospedeira (5–7). Estas observações sugerem uma revisão no conceito clássico de espécies de *Cryptosporidium* serem parasitos intracelulares, mas extracitoplasmáticos, obrigatórios (8).

Breve histórico sobre a criptosporidose por espécies de *Cryptosporidium* tem sido descrito não só em humanos, como também em vários animais vertebrados domésticos e selvagens, incluindo diversas espécies de mamíferos, anfíbios, répteis, aves e peixes (*C. molnari* e *C. scophthalmi*) (9). Originalmente descrito por Ernest Edward Tyzzer em 1907 na mucosa gástrica do rato comum (10), foi considerado como comensal até observar-se a sua associação com diarreia em perus (*C. meleagridis*) nos anos 50s, em surtos de larga escala em vitelos (*C. parvum*) em 1970 (2) e reconhecido como patógeno importante em humanos após reportar-se o primeiro caso de criptosporidose humana numa criança imunocompetente em 1976 (11).

1.2 Mecanismos de transmissão e ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp.

O ciclo de vida e os mecanismos de transmissão de espécies de *Cryptosporidium* são discutidos detalhadamente algures (8,12–14) e estão ilustrados na figura 1 e figura 2.

1.2.1 Mecanismos de transmissão

Porque *Cryptosporidium* spp. é um parasito de distribuição cosmopolita e o estágio responsável pela sua transmissão (oócistos) é omnipresente (ubíquo) no ambiente, a infecção pode ser adquirida através de vários mecanismos: contacto directo com pessoas infectadas (transmissão pessoa-para-pessoa ou antroponótica); contacto com animais (transmissão zoonótica) (figura 1), ingestão de alimentos e água contaminados (transmissão por águas e alimentos) (figura 2), por inalação de gotículas de expectoração contaminadas ou por de fômites (1,9,15–17).

Várias características biológicas conferem às espécies de *Cryptosporidium* uma alta capacidade de transmissibilidade e habilidade de causar surtos de larga escala: seus oócistos podem sobreviver no ambiente por vários meses; são de tamanho diminuto o que lhes permite serem transportados por longas distâncias pelo do ar; possui uma dose infectante (DI50) muito baixa ($DI50^1 = 10$ a 132 oócistos dependendo da espécie/genótipo), são duros e resistentes à maioria dos desinfectantes químicos incluindo o cloro (5,8,18).

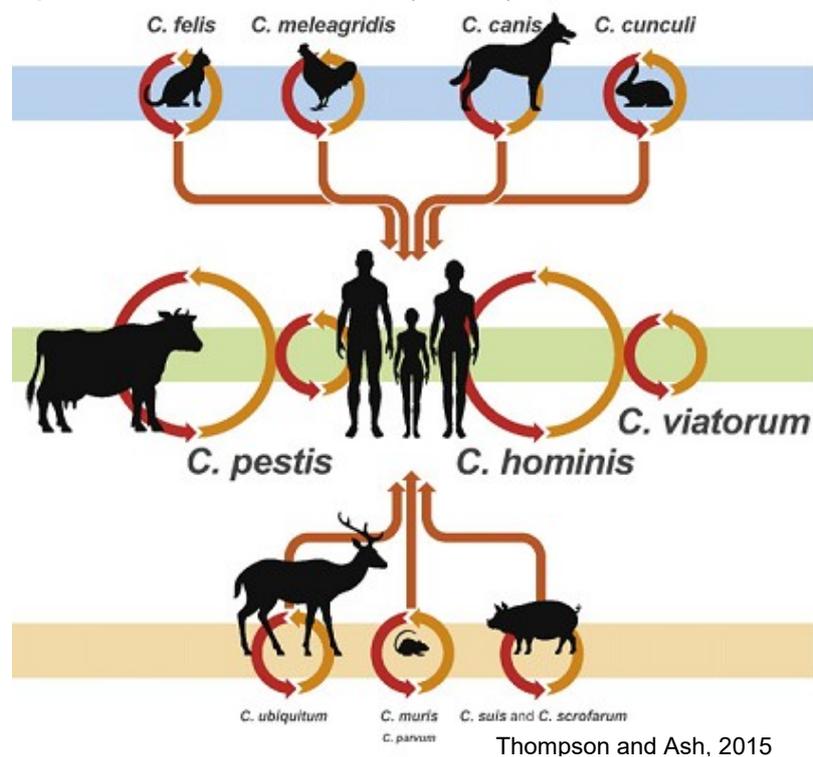


Figura 1. Mecanismo de transmissão e disseminação de *Cryptosporidium* spp. As espécies e genótipos mais frequentes em infecções humanas são indicados pelo tamanho da fonte.

¹ Dose necessária para causar uma infecção em 50% dos indivíduos.

1.2.2 Ciclo de vida

As espécies do género *Cryptosporidium* têm um ciclo de vida monoxénico, envolvendo estágio sexual e assexual; o estágio infectivo, o oócisto esporulado, é eliminado através das fezes de um hospedeiro infectado podendo contaminar, através de vários mecanismos, a água para o consumo, alimentos e possivelmente o ar (8). A revisão da literatura revela que este parasito tem sido isolado em uma vasta gama de espécies hospedeiras e em fontes de água para o consumo (tratadas e não tratadas), corpos de águas do subsolo e superficiais, águas residuais não tratadas e secundariamente tratadas, estuários e águas marinhas assim como solos superficiais e alimentos frescos (15), como resultante de contaminação por fezes humanas ou de origem animal, principalmente na zona rural (19,20).

Segundo Kosek et al. (2001) (figura 2), uma vez ingerido ou inalado pelo novo hospedeiro susceptível, a excitação de oócistos de *Cryptosporidium* ocorre no intestino delgado, libertando o esporozoítio. Segue um desenvolvimento intracelular, mas extracitoplasmático, para um estágio de trofozoito o qual prolifera num processo assexual produzindo vários tipos de merontes. Os merozoítos resultantes de merontes do tipo I invadem outras células epiteliais adjacentes e desenvolvem-se em merontes do tipo II ou completam outro ciclo do meronte do tipo I. Dos merontes do tipo II resultam merozoítos que se multiplicam sexualmente para gerar micro e macrogamontes. O microgamonte fertiliza o macrogamonte produzindo os zigotos, os quais vão tornar-se em duas populações de oócistos: oócitos com parede fina, os quais são a fonte de autoinfecções e oócistos de parede grossa, os quais são lançados para o ambiente pelas fezes, garantindo a continuidade de novas infecções (12).

1.3 Epidemiologia

Vários autores (21–23) suportam que *Cryptosporidium* spp. faz parte do complexo dos parasitos protozoários que tem importante papel etiológico de doenças diarreicas e com distribuição mundial, particularmente em países em desenvolvimento, onde a criptosporidose ocorre com mais frequência em crianças menores de 5 anos de idade, com frequências mais alta em crianças de 6 a 12 meses (24–26).

Cryptosporidium já foi implicado a vários surtos e casos esporádicos de gastroenterite aguda em humanos (27–29), incluindo o maior surto transmitido pela

água ocorrido no verão de 1993 em Milwaukee, Wisconsin, EUA, no qual foi estimado terem sido infectados cerca de 403.000 pessoas (30).

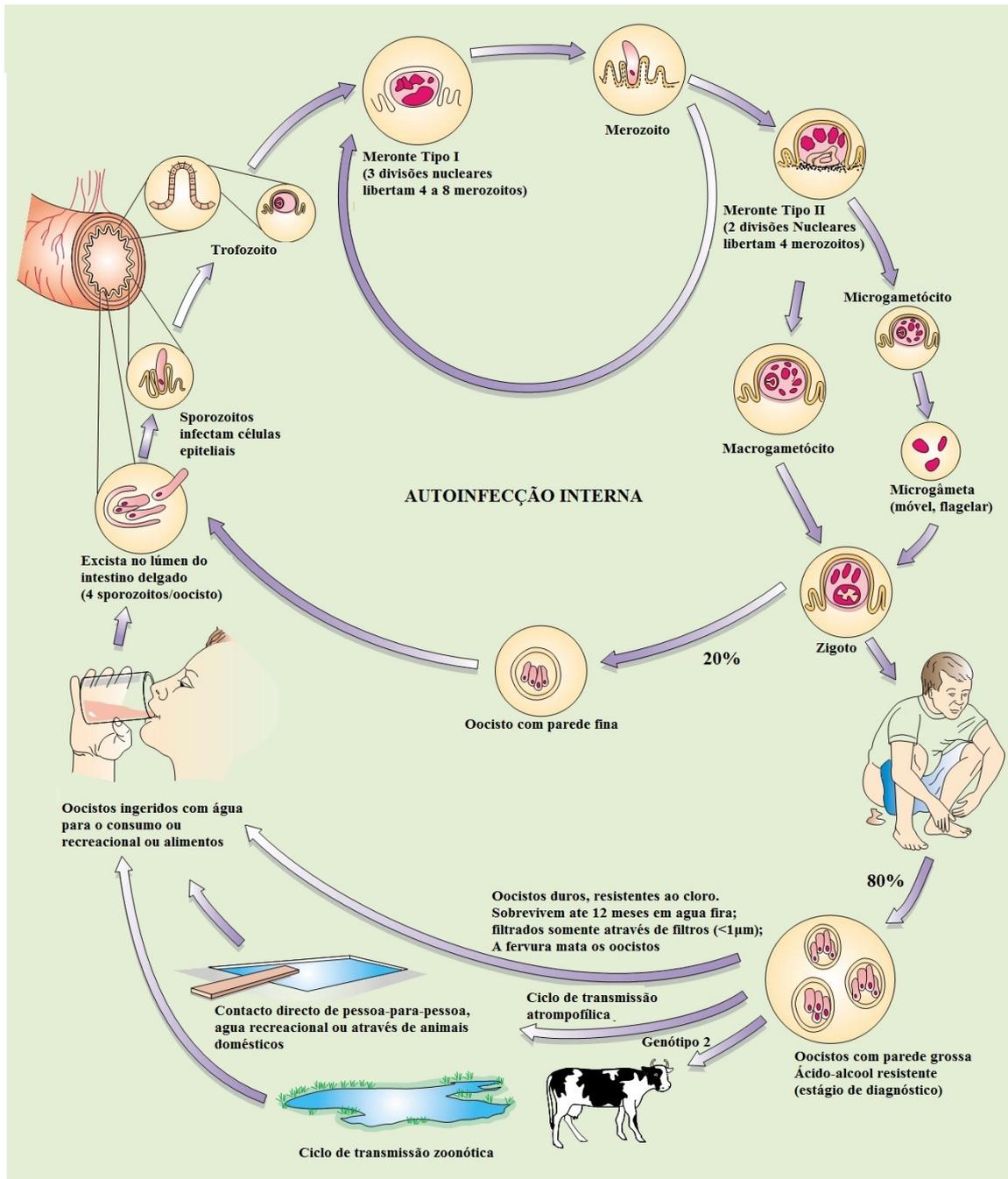


Figura 2. Ciclo de Vida de *Cryptosporidium* spp. Adaptado de Kosek et al. (2001).

Uma revisão sistemática da literatura sobre a carga global, novos métodos de diagnóstico, terapêuticos e alvos para vacina de *Cryptosporidium*, revelou que os primeiros estudos sugeriram que a prevalência de *Cryptosporidium* em países desenvolvidos era de 1.0% em indivíduos imunocompetentes e 5 a 10% em países em vias de desenvolvimento. Porém, com a introdução de técnicas moleculares (ex.

PCR) e imunoenzimáticos, estudos recentes sugerem que os estudos anteriores subestimaram a frequência da infecção, identificando *Cryptosporidium* em 15 a 25% de crianças com diarreia (24).

Em África, vários estudos têm sido desenvolvidos para estimar a prevalência da criptosporidose nos vários estratos populacionais. Um estudo de base hospitalar em Uganda mostrou maior frequência de infecção por espécies de *Cryptosporidium* em crianças diarreicas (25.0%) comparados com crianças sem diarreia (8.5%) (22); em Quênia, um estudo identificou oócistos de *Cryptosporidium* em 4.0% das crianças (31); na Etiópia, encontraram uma prevalência de 2.2%; enquanto na Tanzânia e Egito, a prevalência encontrada foi de 10.4% e 19.5% respectivamente (32,33).

Por causa da sua significância na saúde pública, implicações socioeconómicas e potencial contaminação intencional de fontes de água, *Cryptosporidium* spp. foi incluído na “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da Organização Mundial da Saúde (34) e é listado pela “Center for Disease Control and Prevention” (CDC) e pela “National Institutes of Health” (NIH) como um patógeno de categoria B para a bio defesa (35).

1.4 Ocorrência de criptosporidose em Moçambique

O primeiro caso relatado de infeção intestinal por *Cryptosporidium* spp. em pacientes com VIH/SIDA em Moçambique foi em 1999 por Clavero e colaboradores que detectaram oócistos de *Cryptosporidium* em fezes diarreicas dum paciente adulto admitido no Hospital El Carmelo (Chokwe, província de Gaza, Moçambique); o paciente apresentava um quadro clínico típico de um indivíduo imunodeficiente com múltiplas infecções (tuberculose pulmonar e malária) (36).

Oito anos depois, um estudo transversal de base hospitalar em crianças menores de 5 anos com diarreia, provenientes do sul de Moçambique, detectou infecção por espécies de *Cryptosporidium* em 0.6% de crianças menores de 2 anos de idade (37). Mais recentemente, foi demonstrada infecção por espécies de *Cryptosporidium* em 17.8% crianças com diarreia grave a moderada e em 9.4% de controlo assintomáticos ($p < 0.001$) (38). Adicionalmente, um estudo de vigilância de base hospitalar conduzido em Moçambique entre 2013 e 2015 encontrou *Cryptosporidium* spp. como o único parasito oportunístico com uma frequência de 34.0% em crianças menores de 14 anos (39).

Globalmente, *Cryptosporidium* spp. está sendo cada vez mais reconhecido como um patógeno importante causando diarreia e desordem nutricional significativas, com alto impacto na morbidade e mortalidade entre crianças em países em desenvolvimento (40,41). Achados do estudo multicêntrico (“Global Enteric Multicenter Study” - GEMS) sobre a carga e etiologia de doenças diarreicas na infância em países em desenvolvimento, mostraram que espécies de *Cryptosporidium* são, hoje em dia, uma das causas principais de diarreia moderada a severa, sendo o segundo depois de rotavírus em menores de 2 anos de idade (21).

1.5 Apresentação clínica da criptosporidiose

A infecção por *Cryptosporidium* spp. pode resultar numa vasta gama de manifestações clínicas, desde infecções assintomáticas e auto limitante em adultos e indivíduos imunocompetentes às infecções mais severas, crônicas e potencialmente fatais, maioritariamente em crianças menores de 2 anos e indivíduos imunodeficientes, como em casos de infecção por VIH. Em indivíduos com contagens de células T CD4 menores que 200 células/ μ L, a infecção pode atingir outros órgãos (pulmões, conjuntiva, dutos biliares e pancreáticos), com manifestações características.

A diarreia líquida é o sintoma mais frequente e pode ser acompanhada pela desidratação, perda de peso, dor abdominal, febre, náuseas e vômitos, variando em função da espécie responsável pela infecção (1,12,42–46). Resultado de um estudo transversal de base hospitalar em Kampala, Uganda, mostrou que a criptosporidiose estava associada a duração da diarreia, a malnutrição, ao desfecho não favorável e a alta taxa de mortalidade em crianças admitidas com diarreia por *Cryptosporidium* (22).

Vários estudos de caso-controlo mostram que a criptosporidiose respiratória pode ocorrer em crianças imunocompetentes, pois comparando-se com pacientes contróis sofrendo de diarreia por outras causas, os sintomas respiratórios ocorrem com mais frequências entre crianças com diarreia por *Cryptosporidium* (44,47).

Um estudo de corte em adultos imunocompetentes da cidade de Karachi (Paquistão) que se apresentavam com diarreia aguda constatou consistentemente, que a criptosporidiose estava associada a alta frequência de dejeções por dia, dor abdominal, vômitos, febre, fadiga e desidratação (42). Segundo alguns autores,

mesmo quando é assintomática, a infecção tem sido associada ao fraco crescimento e pode ter outros efeitos adversos no desenvolvimento da criança (24).

A malária é uma doença endémica em Moçambique e em outras regiões do mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais; os sintomas incluem, dentre outros, a febre, vômito e diarreia, podendo levar a perda de peso (48–51), tornando assim um indivíduo com malária mais susceptível a infecção por *Cryptosporidium* por desnutrição. Ao nosso conhecimento, não existem estudos publicados sobre a frequência de coinfeções entre espécies de *Cryptosporidium* e espécies de *Plasmodium*, embora estes sejam parasitos taxonomicamente relacionados (52).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico diferencial da criptosporidose, revisto pela Organização Internacional das Epizootias (OIE) (2016), inclui outros patógenos envolvidos na diarreia. Múltiplos patógenos podem estar presentes incluindo outros protozoários, além de rotavírus, coronavírus, estirpes patogénicas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

O diagnóstico da criptosporidose é feito pela demonstração de oócistos ou seus antígenos no exame de amostras fecais e os pacientes podem ser solicitados várias amostras durante vários dias porque a detecção de oócistos de *Cryptosporidium* pode ser difícil (53). *Cryptosporidium* pode ainda ser detectado no fluido intestinal, amostras de tecido obtidos por biópsia ou em material obtido do raspado da mucosa (54).

Frequentemente, as amostras fecais são examinadas microscopicamente usando diferentes técnicas tais como a convencional coloração diferencial de Ziehl-Neelsen modificado (mais comum), fenol auramina e testes imunológicos como o teste de fluorescência directa de anticorpos (TFDA) para detecção de antígenos de *Cryptosporidium* spp. Outros testes imunológicos disponíveis, tanto para detecção de antígenos de espécies de *Cryptosporidium* como anticorpos anti-*Cryptosporidium* spp., são os testes imunocromatográficos e ELISA (da língua inglesa Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Os testes serológicos não são apropriados para o diagnóstico mas podem ser usados para vigilância seroepidemiológica de exposição (2,55–59).

Os métodos moleculares tais como a reacção em cadeia de polimerase (PCR, do acrónimo polymerase chain reaction), baseados em vários marcadores genéticos (SSU² rRNA, 70 kDa “heat shock protein” (HSP70), “dihydrofolate reductase” (DHFR), “Actin”, *Cryptosporidium* “oocyst wall protein” (COWP), *Cryptosporidium* “thrombospondin-related adhesive protein-1” (TRAP C1) e glicoproteína 60 kDa (gp60), são cada vez mais utilizados em laboratórios de diagnóstico de referência, pois eles podem ser usados para identificar *Cryptosporidium* até ao nível da espécie (2,17,60).

O sequenciamento do gene SSU rRNA é a prática mais comum, mas o gene gp60 é o alvo genético comum para a subtipagem em investigações epidemiológicas de infecções por espécies de *Cryptosporidium*. Por outro lado, não existem técnicas disponíveis e reproduzíveis de cultura *in vitro* para amplificar o número de parasitos antes da sua identificação (2).

Testes para *Cryptosporidium* não são rotineiramente feitos na maioria dos laboratórios; assim sendo, os médicos devem requisitar a testagem específica para este parasito.

1.7 Tratamento e profilaxia

O tratamento da criptosporidiose é essencialmente sintomático e visa aliviar os efeitos da diarreia e desidratação. Em indivíduos imunocompetentes geralmente ocorre cura espontânea (54).

A diarreia pode ser gerida pela toma de muita água ou líquidos (reposição de fluidos e electrólitos) para prevenir a desidratação. Pessoas com saúde precária ou que tem o seu sistema imunológico enfraquecido estão em maior risco para uma doença mais severa e prolongada. Crianças menores e mulheres grávidas podem ser mais susceptíveis a desidratação resultante da diarreia e devem beber muita água ou líquidos quando doentes. A rápida perda de fluidos por diarreia pode ser potencialmente fatal, especialmente para bebés (54,61).

Medicamentos antidiarréicos podem ajudar a diminuir a diarreia, mas os médicos devem ser consultados antes de tais medicamentos serem tomados/administrados. Nitazoxanide foi aprovado pela “**Food and Drug Administration**” (FDA) para o tratamento da diarreia causada por *Cryptosporidium*

² SSU - da língua inglesa *Small Subunit*

em pessoas imunocompetentes e encontra-se disponível com prescrição médica. Contudo, a eficácia de nitazoxanide em indivíduos imunossuprimidos não é clara (52,54,61,62).

Para pessoas com o Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a terapia anti-retroviral que melhora o estado imunológico também irá diminuir ou eliminar os sintomas da criptosporidose. Contudo, mesmo que os sintomas desapareçam, a criptosporidose muitas vezes não é curável e os sintomas podem reaparecer se o estado imunológico piorar (62,63).

Segundo Striepen (2013) e Ali et al. (2014) estudos clínicos em Egito e Paquistão demonstraram que apenas crianças e adultos saudáveis sofrendo de diarreia causada por *Cryptosporidium* tem duas vezes mais a probabilidade de recuperação dentro de uma semana quando são administradas nitazoxanide, mas indivíduos mais vulneráveis a doença é potencialmente fatal e precisam de algum tratamento mais potente (42,52). Em Zâmbia, um estudo mostrou que os sintomas desapareceram em pouco menos de 25% de crianças malnutridas depois do tratamento com nitazoxanide. Por outro lado, a droga parece não ter nenhum efeito em crianças ou adultos cujo sistema imune estão suprimidos, principalmente pela infecção por VIH (52).

Não existe uma droga ou vacina efectiva para *Cryptosporidium* (61), por isso, a profilaxia e o controle da doença são feitos pela adoção de medidas que previnam ou evitem a contaminação do meio ambiente, água e alimentos com oócistos do parasito e o contato de pessoas suscetíveis com fontes de infecção (54).

O risco de infecção por *Cryptosporidium* pode ser reduzido evitando beber água de piscinas públicas e outros corpos de água recreacional, evitando entrar em contacto com animais domésticos e com pessoas que se sabe estarem infectadas por *Cryptosporidium*; adicionalmente, devem ser utilizadas fossas ou privadas, com proteção dos reservatórios de água para evitar a contaminação com fezes (54,62).

1.8 Factores de risco

A maior carga das doenças diarreicas decorrentes de infecções parasitárias, incluindo infecções por espécies de *Cryptosporidium*, ocorre nos países em desenvolvimento os quais possuem mais de 90% da carga das doenças associadas a água, más condições sanitárias e higiene; a carga é 240 vezes mais altas quando comparadas com regiões desenvolvidas (18,25,41,64); estimando-se que,

anualmente, cerca de 9.2% de mais de 7 milhões de crianças morrem antes dos 5 anos de idade por diarreia a nível mundial dos quais quase metade ocorre na África (65,66); sendo 16% das mortes ocorrendo na África subsaariana (67); onde as condições sanitárias são deploráveis, a maior parte a população consome água não tratada, há intenso contacto animal (68), maior taxa de deficiências nutricionais principalmente na infância e alta taxa de prevalência de VIH (46,69).

Um estudo feito no sul de Moçambique estimou que cerca de 16% das crianças seriam infectados por VIH após o parto devido à alta incidência da infecção por VIH na mulher (3.20% mulheres-ano) (70) o que conduz a mais agravamento das doenças diarreicas principalmente quando associadas a agentes enteropatogénicos (71) e contagem de células T CD4 abaixo de 200 células/ μ L por falta de tratamento anti-retroviral (72,73).

A revisão da literatura revela que vários estudos têm demonstrado a associação entre a criptosporidose com o consumo de água proveniente de fontes susceptíveis de contaminação com material fecal, tanto de origem humana como animal e que o controlo da contaminação das águas superficiais é tido como a primeira medida para reduzir a ocorrência de transmissão da criptosporidose através da água (8,29). Adicionalmente, as taxas de infecções e as *chances* de surgimento de surtos são reduzidos com o tratamento da água, especialmente por fervura e filtração (8,12). Segundo Ryan e colaboradores, a Organização Mundial da Saúde (OMS) categorizou *Cryptosporidium* como patógeno de referência para a qualidade de água para o consumo humano (5).

Outros factores que têm sido associados com a transmissão da criptosporidose são: a disponibilidade e ou uso de sanitários melhorados (74); disponibilidade de alimentos, dieta principalmente em crianças menores de 2 anos, pobreza, o número de indivíduos no agregado familiar e o rendimento do agregado familiar (22,55,75), presença e contacto com animais domésticos no domicílio (14,76–78) e a educação formal do indivíduo ou dos cuidadores legais de menores (22,68).

1.9 Espécies de importância médica

Embora mais de 20 espécies deste parasito coccidiano tenham sido descritas em vários hospedeiros animais incluindo o homem (79), com base nos hospedeiros animais de onde foram isolados, a especificidade do hospedeiro como critério para

definição de espécies parece ser frágil, pois algumas dessas ditas espécies não possuem tal especificidade. A definição de espécies e a identificação deste género está em constante mudança, resultante da adição de novas espécies descritas com base primariamente em critérios moleculares (2).

Mark Laxer (29) foi o primeiro, em 1991, a usar a técnica da PCR para a detecção de oócistos de *Cryptosporidium* e, embora a intenção não tenha sido a taxonomia, assinalou o início de uma nova era para o entendimento da taxonomia deste género.

As espécies e génotipos que predominantemente têm infectado os humanos têm sido identificados e revistos, os quais incluem *C. hominis* (anteriormente denominado *C. parvum* genótipo Humano, H ou Tipo 1) encontrado primariamente em humanos, *C. parvum* genótipo Bovino (genótipo C ou Tipo 2), *C. meleagridis* e *C. felis* (23,79,80).

Pelo menos oito das espécies válidas de *Cryptosporidium* (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* e *C. andersoni*) e sete de mais de 40 genótipos descritos (*C. hominis* monkey genotype, *C. parvum* genótipo mouse e o *C. cervine* (W4), chipmunk genotype I (W17), skunk, horse e genótipo rabbit) têm sido detectados em humanos (2,81). As espécies consideradas patogénicas para humanos incluem *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* e *Cryptosporidium* genótipo rabbit, sendo a maioria das infecções causadas por *C. parvum* e *C. hominis*, cuja frequência varia geograficamente. As infecções por espécies incomuns e genótipos ocorrem em ambas populações imunocompetentes e imunocomprometidos (9,17,60,81,82).

No continente Africano, em geral, e em especial a região da África subsaariana incluindo Moçambique, África do Sul e Tanzânia e no sul da Ásia, as espécies e genótipos predominantemente detectados são *C. hominis* e *C. parvum*; a última abrange subtipos antroponóticos e zoonóticos (18,25,26,32,33,75,83,84).

Dada a importância deste complexo de parasitos protozoários (*Cryptosporidium*) na saúde pública, viu-se a necessidade de realizar-se este estudo com o objectivo de trazer informações sobre a frequência, distribuição, potenciais factores de risco, co-morbidades, manifestações clínicas associadas à infecção e a caracterização molecular de espécies de *Cryptosporidium* em crianças menores de 5 anos de idade hospitalizadas por diarreia aguda no município e cidade de Maputo, Moçambique.

2 JUSTIFICATIVA

Cryptosporidium é o segundo agente etiológico atribuído a doenças diarreicas e a morte na infância, incluído na “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da Organização Mundial da Saúde, e listado pela “*Center for Disease Control and Prevention*” (CDC) e pela “*National Institutes of Health*” (NIH) como um patógeno de categoria B para a bio defesa. Sabe-se que *Cryptosporidium* constitui um complexo de parasitos protozoários cuja gravidade da infecção varia não só com factores inerentes ao hospedeiro humano como também com a espécie ou genótipo em causa.

Assim, tornou-se necessário conhecer o perfil clínico-epidemiológico de crianças admitidas por diarreia aguda e infectadas por este parasito, com recurso a técnicas clássicas para o diagnóstico da infecção (microscopia) e moleculares (PCR-RFLP) com base no gene SSU rRNA para identificar as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* circulantes para clarificar sobre qual população está infetada por qual espécie ou grupo genético de forma a identificar os mecanismos de transmissão para auxiliar na concepção de estratégias e implementação de métodos de prevenção grupo-específicos mais adequados.

Por outro lado, acreditamos que os achados deste estudo poderão contribuir de forma significativa na taxonomia do género *Cryptosporidium*, pois este tema continua sendo um desafio sério para os biólogos e epidemiologistas moleculares.

3 OBJECTIVOS

3.1 Objectivo Geral

- Determinar a frequência, os factores associados e caracterizar molecularmente espécies de *Cryptosporidium* em crianças admitidas em dois hospitais públicos na cidade de Maputo: José Macamo e Mavalane no âmbito do projeto Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças.

3.2 Objectivos específicos

- Determinar a frequência e distribuição da infecção por espécies de *Cryptosporidium*;
- Determinar os potenciais factores de risco associados às infecções por espécies de *Cryptosporidium*;
- Identificar as manifestações clínicas e co-morbidades associadas à infecção por espécies de *Cryptosporidium*;
- Detectar e fazer a caracterização molecular para identificar as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

Este é um sub-estudo do projecto “Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças (ViNaDiA)” (85), um sistema de vigilância de base hospitalar para as Gastroenterites Agudas (GEAs), aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS N° 348/CNBS/13) e teve a sua autorização administrativa dos hospitais sentinelas (Hospital Geral de Mavalane e Hospital Geral José Macamo). O consentimento informado e escrito foi obtido dos pais ou cuidadores legais de todas as crianças arroladas neste estudo antes do questionário e colheita das amostras. Apenas crianças cujos cuidadores legais que concordaram e assinaram o consentimento informado foram incluídas neste estudo e todos procedimentos foram feitos na presença dos cuidadores legais.

4.2 Área de estudo

O presente trabalho foi desenvolvido em dois hospitais públicos (Hospital Geral de Mavalane e Hospital Geral José Macamo), ambos de nível secundário localizados na cidade de Maputo, Moçambique. Estes hospitais foram definidos como hospitais sentinelas pelo “projecto mãe” (ViNaDiA) porque possuem ambulatório de pediatria geral, um serviço de internamento, atendem principalmente crianças residentes nos bairros adjacentes e alguns distritos; possuem também um sistema de recolha e armazenamento de fezes de forma adequada e em tempo hábil até que o teste seja realizado.

4.2.1 Hospital Geral José Macamo

4.2.1.1 Localização e área de saúde

Segundo o Núcleo de Estatística e Planificação (NEP) do Hospital Geral José Macamo (HJGM), então Hospital de São José de Lhanguene, o HGJM é uma unidade sanitária de nível secundário; que desempenha funções de nível superior (terciário). Localiza-se na Av. Organização da Unidade Africana (OUA) N° 1033, distrito municipal Ka-Nhlawankulo, bairro da Malanga, cidade de Maputo (25°56'53.5"S e 32°32'38.6"E).

É uma unidade sanitária de referência para nove (9) Centros de Saúde, dos quais 3 (três) centros de nível “A” e 6 (Seis) de nível “B” distribuídos em 24 bairros correspondentes a quatro zonas sanitárias. O hospital presta assistência aos

4.2.2 Hospital Geral de Mavalane

4.2.2.1 Localização e área de saúde

Segundo o Núcleo de Estatística e Planificação (NEP) do Hospital Geral de Mavalane (HGM), esta é uma unidade sanitária de nível secundário; localiza-se na Av. Das F.P.L.M, na cidade de Maputo (25°55'49.4"S e 32°35'09.8"E), ocupando uma área aproximada de 100314.22 m² (figura 4).

Ao todo, 14 unidades sanitárias fazem parte da rede sanitária de Mavalane nomeadamente: Centro de Saúde de Mavalane, 1 de Junho, Malhangalene, 1º de Maio, Polana Cimento, Polana Caniço, Albasine, Romão, Hulene, Pescadores, Chiango, Inhaca, Inguane e Muchina.

A área de Saúde do HGM tem uma superfície de 168.4 Km². Esta área é limitada pelo distrito de Marracuene no extremo Norte; a Sul é limitada pela Baía de Maputo e distrito municipal de KaMfumo, a Este pela Baía de Maputo e por último, a Oeste pelo Distrito Municipal Nhlamankulo e Kambucwane. É responsável pelos Distritos Urbanos KaMfumo, KaMaxakeni, KaMavota e KaNyaka com cerca de 11.580 Habitante por Unidade Sanitária.

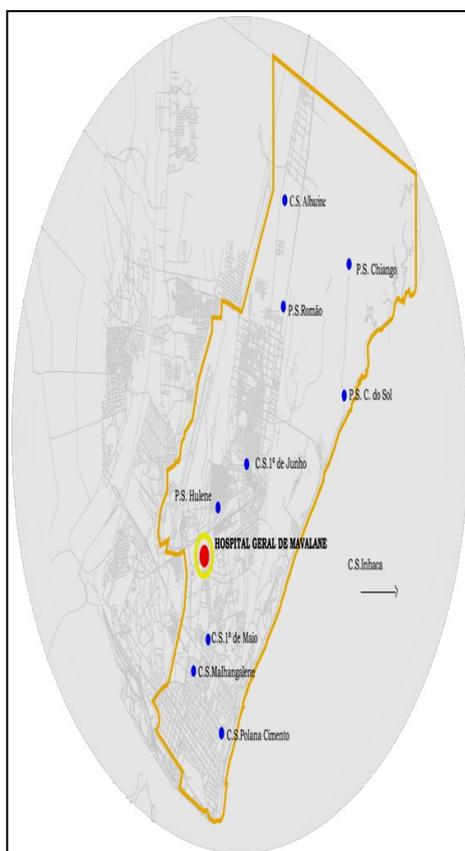


Figura 4. Mapa da Área de Saúde do Hospital Geral de Mavalane (NEP/HGM)

4.2.2.2 Caracterização das actividades

No ano de 2016 o hospital cobriu uma população estimada de 638.505 habitantes. Tem uma capacidade de internamento de 260 camas, distribuídas pelas seguintes enfermarias: Medicina – 73, Neonatologia - 8, Cirurgia – 10, Ginecologia e Obstetria – 66, Banco de Socorros – 35 e **Pediatria – 68**.

4.3 População de estudo e tamanho amostral

Este estudo foi conduzido usando amostras fecais e informações clínicas e epidemiológicas de crianças dos 0 a 60 meses recrutados no âmbito da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças entre Abril de 2015 a Fevereiro de 2016 em Maputo, Moçambique.

Todos casos incluídos foram crianças com idade compreendida entre 0 a 5 anos admitidas com um quadro de síndrome diarreico com duração de 14 dias ou menos, em dois hospitais públicos (Hospital Geral de Mavalane e José Macamo) definidos como hospitais sentinela na cidade de Maputo.

No presente estudo incluiu-se todos casos elegíveis e consecutivos durante o período de estudo. O tamanho de amostra mínimo calculado foi de 225 amostras; para o qual foi usada a fórmula para a determinação do tamanho da amostra para estudo de prevalência como é habitual noutros estudos transversais, onde foi assumido o intervalo de confiança (IC) de 95%, uma frequência esperada de 17.7% do agente etiológico de interesse neste estudo (*Cryptosporidium* spp.) segundo resultados dados anteriormente publicados (38) e um valor de precisão de 0.05.

4.4 Recolha de informação

A informação clínica, sociodemográfica, epidemiológica e as medidas antropométricas das crianças foram recolhidas por pessoal médico devidamente qualificado. Para tal, foi usado um questionário estruturado, recorreu-se ao processo clínico e ao cartão saúde da criança e todas medições foram feitas de acordo com os procedimentos nacionais.

O questionário incluiu informações demográficas sobre a criança, pais ou cuidadores legais e as condições sanitárias (idade e sexo da criança e do cuidador principal, tipo de alimento, fonte de água), dados epidemiológicos e de exposição, dados clínicos relacionados com a doença diarreica (vômito, febre, estado de

hidratação, estado serológico em relação a infecção por VIH, malária e sintomas respiratórios), incluindo dados antropométricos da criança.

4.4.1 Aferições antropométricas

Os dados antropométricos foram recolhidos de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (“*Training Course on Child Growth Assessment – The WHO Child Growth Standards: Module B: Measuring a Child’s Growth*”) disponível em <http://www.who.int/childgrowth/training/en/> (86). A massa corporal (peso) foi estimada usando uma balança electrónica (Seca GMBH & co., Hamburg, Germany) com capacidade máxima de 150 kg e uma precisão de 100 g. Todas as crianças foram pesadas com pouca roupa ou roupa muito leve e sem sapatos.

Para crianças abaixo dos 24 meses ou com uma altura menor que 87 cm foram medidos os comprimentos na posição horizontal usando uma fita métrica não elástica ou uma prancha de madeira ajustável (ShorrBoard™, Shorr Productions, Marviane, USA. Shotley Bridge Place), ambos com uma escala com uma precisão de 0.1 cm e comprimento máximo de 150 cm. Nos casos em que as crianças tinham idade acima de 24 meses ou com uma altura igual ou superior a 87 cm as suas alturas foram medidas de pé usando um altímetro acoplado a uma balança manual (AE ADAM, Modelo: MDW-160M) com uma escala de precisão de 0.1 cm e sempre que uma criança com estas características não pudesse ficar em pé, a sua altura foi medida na posição horizontal conforme descrito para crianças menores de 24 meses.

A idade (em meses completados) foi estimada subtraindo a data da entrevista/arrolamento e do nascimento (obtido no cartão de saúde ou por declaração do/a guardião legal) e dividindo o resultado por 30.4375 conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde.

4.4.2 Indicadores nutricionais

No presente estudo, foram usados índices antropométricos como indicadores nutricionais da criança, em conformidade com as directrizes nacionais para vigilâncias nutricionais e da OMS. Z-scores do peso-para-altura (WLZ), peso-para-idade (WAZ) e altura-para-idade (HAZ) foram calculados para cada criança incluída durante o período de estudo, usando o programa WHO Anthro v3.2.2 (disponível em <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>) (86).

As crianças foram categorizadas como tendo um estado nutricional normal para todos os parâmetros (WLZ, HAZ e WAZ), com valores de z-scores superiores a -1SD, ou malnutrição moderada para casos com valores de z-score inferiores a -3SD e não superiores a -2SD (<-2SD e >-3SD) e malnutrição severa para valores de z-scores inferiores ou igual a -3 SD (\leq 3SD), segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (“Training Course on Child Growth Assessment – The WHO Child Growth Standards: Module C: Interpreting Growth Indicators”) disponível em <http://www.who.int/childgrowth/training/en/> (87).

Quanto ao estado nutricional geral foi considerada desnutrida a criança com pelo menos dois (2) tipos de desnutrição com base nos indicadores nutricionais acima descritos. Para tal, foram seleccionadas apenas crianças com informação completa sobre os três indicadores nutricionais.

4.4.3 Informações e definições clínicas

A diarreia aguda foi definida como sendo três ou mais dejectões nas últimas 24 horas, de consistência mole ou aquosa e com duração não superior a 14 dias (38). A criança foi considerada desidratada quando se apresentava com olhos mais encovados do que o normal, com perda do turgor para pele, letárgica ou com avidez a água.

No presente estudo, o nível académico do cuidador da criança foi estratificado em dois grupos: sem educação formal (que compreendem aqueles que não estudaram ou não completaram o ensino primário) ou com alguma educação formal (que compreendem aquelas que completaram pelo menos o ensino primário). A fonte de água foi categorizada em dois grupos: os que tem a água canalizada no pátio da casa (domicílio) incluindo dentro da casa e os que usam outras fontes de água tais como água da casa do vizinho, fontenária pública, furo ou bomba, poço, fonte natural, água da chuva, fornecida por vendedores informais, água engarrafada, tanques de camiões, rios ou lagos.

As condições sanitárias da habitação incluíram: ter um sistema de fossa séptica e ter latrina simples tradicional. Para o contacto animal, o tipo de animal foi categorizado em dois grupos: mamíferos (compreendendo animais como gato, boi, cabrito, cão, porco) e aves (galinha, pato, pombo).

Toda a informação relativa às manifestações clínicas dos participantes, incluindo sintomas e co-morbidades, foi recolhida a partir do processo clínico. As

afecções respiratórias foram definidas como todo caso que apresentasse pelo menos um distúrbio do trato respiratório incluindo tosse, bronquite, infeções das vias respiratórias superiores (IVRS), pneumonia, broncopneumonia (BPN). Todos os casos admitidos foram colhido sangue venoso em tubos com EDTA e solicitados exames de hemograma completo, teste para despiste de infecção por espécies de *Plasmodium* (Malária), exames de bioquímica e, sempre que houvesse suspeita, foi incluída a testagem serológica para o despiste da infecção pelo Vírus de Imunodeficiência Humana (VIH), esses exames foram realizados no laboratório local e o resultado disponível no processo clínico.

Adicionalmente, todos os casos que não tinham informações sobre o estado serológico em relação a infecção pelo VIH no processo clínico foram colhidos sangue capilar e seco em papel de filtro (DBS Kit Collection, Lasec SA) e posteriormente transportado para o laboratório de Imunologia e Isolamento Viral do Instituto Nacional de Saúde (Maputo, Moçambique) para o diagnóstico usando técnicas da PCR.

4.5 Recolha, transporte e armazenamento das amostras

Foram colhidas amostras fecais únicas de pelo menos 10 mL directamente das fraldas das crianças e colocadas em frascos estéreis sem preservantes. Sempre que o cuidador legal reportasse diarreia líquida, usou-se fralda não absorvente (plástica) para melhor colheita da amostra. A maioria dos casos (>95%) foi feita a colheita na enfermaria de pediatria que no serviço de internamento de curta duração (ICD) e preferencialmente no primeiro dia do internamento.

Os frascos foram identificados com um número de estudo (sequencial para cada hospital sentinela) e conservadas numa caixa térmica com acumuladores de gelo (temperatura aproximadamente entre 2 a 8°C) durante o transporte até ao laboratório de parasitologia molecular, sector de parasitologia intestinal e visceral do Instituto Nacional de Saúde (INS), Maputo – Moçambique, onde foram temporariamente armazenadas entre 2 a 8°C.

4.6 Processamento laboratorial das amostras

Uma vez no laboratório, as amostras foram separadas em duas alíquotas para posterior pesquisa de parasitos: a primeira armazenada a -80°C para pesquisa usando técnicas moleculares e a segunda a -20°C para pesquisa parasitológica por microscopia directa.

Os testes laboratoriais foram realizados no laboratório de parasitologia molecular, sector de parasitologia intestinal e visceral do Instituto Nacional de Saúde, (Maputo-Moçambique), onde foi feita a pesquisa parasitária através da microscopia óptica e no LIPMED onde foi feita a detecção e caracterização molecular.

Uma alíquota de fezes (aproximadamente 0.5 mL) foi enviada ao Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED) do Instituto Osvaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ - Brasil) em gelo seco para a detecção e caracterização molecular de oócistos de *Cryptosporidium* spp.

4.6.1 Pesquisa parasitológica por microscopia óptica

No laboratório, as amostras foram processadas de acordo com os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) previamente estabelecidos para a visualização microscópica de oócistos das espécies de *Cryptosporidium*, tendo sido o exame de natureza qualitativa.

Para tal, uma alíquota de cada amostra foi processada usando a técnica de concentração por centrifugação formol-éter (método de Ritchie) como previamente descrito (59); brevemente homogeneizou-se uma porção de cerca de 1 a 1,5g de fezes em 10 mL de formol a 10% num tubo de centrifugação, filtrou-se através de duas dobras de gaze directamente para outro tubo de centrifugação de 15 mL, adicionou-se, sempre que necessário, formol a 10% até perfazer 7 mL ao filtrado e adicionou-se 3 mL de Éter-dietílico, tapou-se firmemente e agitou-se vigorosamente por 30 segundos; em seguida centrifugou-se a 2.500 rotações por minuto (rpm) (aproximadamente 500 g) por 5 minutos (figura 5).



Figura 5. Procedimento para o processamento de amostra fecal pela técnica de Ritchie. A) Homogeneização; B) Filtração, C) Centrifugação e D) Visualização das quatro camadas. Figuras A, B e C (Originais, Hermínio Cossa) e Figura D (WHO, 1991).

Decantou-se as três (3) camadas superiores (Éter-dietílico, detritos alimentares e gordura e formol). Adicionou-se 1 a 3 gotas de formol a 10% sobre o sedimento.

Foram preparados dois esfregaços numa lâmina microscópica, um com uma pequena porção de amostra fecal fresca e outro com uma a duas gotas do sedimento resultante do processo de concentração pelo método de Ritchie (Figura 6); deixou-se secar a temperatura ambiente e foi corada pelo método de Ziehl-Neelsen modificado para a detecção microscópica de oócistos de *Cryptosporidium* spp. como descrito anteriormente (59); resumidamente, o esfregaço foi fixado durante 5 minutos em metanol a 96%, corado com carbol-fucsina a 1% durante 20 minutos, diferenciado com ácido hidrocloreto a 3% em etanol (96.0% PA) (ácido-álcool), contra corado com verde malaquita a 1% por 3 minutos, lavou-se com água corrente e deixou-se secar ao ar (figura 7).

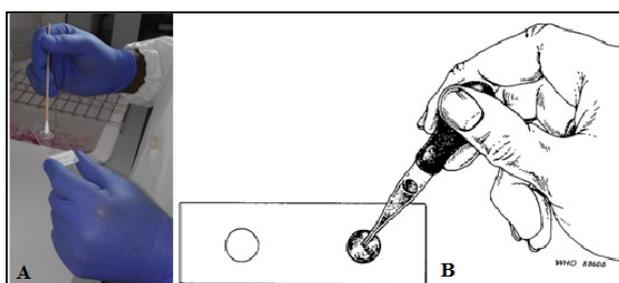


Figura 6. Preparação de esfregaços em lâminas microscópicas com amostra fresca (A) e sedimento resultante da técnica de Ritchie (B). Figuras 5 A (Original, Hermínio Cossa) e Figura B (WHO, 1991)

Os esfregaços foram sistematicamente examinados ao microscópio óptico de modo a cobrir toda a extensão, primeiro com a objectiva de menor ampliação (40x) e confirmada a presença de Oócitos de espécies de *Cryptosporidium* com a objectiva de 100x. Para controlo de qualidade, todas as preparações foram observadas por dois microscopistas.



Figura 7. Procedimento para a coloração de Ziehl-Neelsen modificado. A) Fixação com Metanol absoluto, B) coloração com Carbol-Fucsina a 1%, C) diferenciação com solução ácido-álcool a 3% e D) contra-coloração com Verde Malaquita a 1%. (Original, Hermínio Cossa).

Os oocistos foram identificados observado as características específicas tais como tamanho (4 – 6 μm), ácido-álcool resistentes (cor vermelha a rosa) com grânulos pretos (esporozoítos discerníveis em oocistos maduros) (figura 8) descritos no Manual de bancada para o diagnóstico de parasitos intestinais, publicado pela Organização Mundial da Saúde (88).

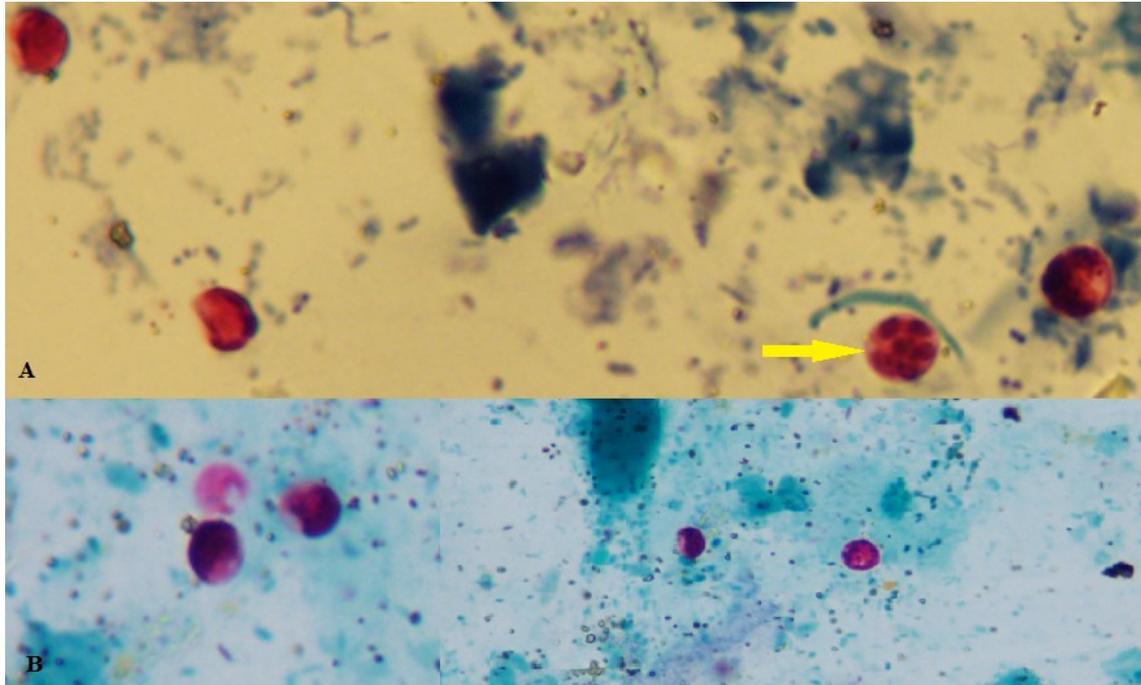


Figura 8. Identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. através da microscopia óptica: coloração de Ziehl-Neelsen modificado. Oocistos corados a vermelho claro. Oocistos maduros com esporozoítos discerníveis (seta amarela). **A)** Contra coloração com verde malaquita; **B)** contra coloração com azul-de-metileno. Ampliação 1000 vezes. Microscópio Óptico Composto, Olympus (original, Hermínio Cossa).

4.6.2 Detecção molecular e genotipagem

4.6.2.1 Escolha do alvo genético e ferramentas de diagnóstico

O presente trabalho foi desenvolvido como um sub-estudo do projecto “Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças” como já foi referido anteriormente, no qual o gene alvo escolhido foi SSU rRNA porque este gene encontra-se bem descrito e é usado por vários autores para caracterização de espécies de *Cryptosporidium* pois apresenta múltiplas cópias com regiões semi-conservadas e regiões híper-variáveis que facilitaram o desenho de iniciadores (*primers*) específicos para o género. (22,22,23,28,33,81,89–95).

Adicionalmente, ferramentas tais como a PCR com alvo num fragmento de aproximadamente 830 pares de base (pb) deste gene e o uso de enzimas de restrição Sspl e Vspl/Asel para genotipagem (RFLP) são usados com frequência, sendo reportados em mais de 60% de publicações (60). Deste modo, otimizamos protocolos com base nestas ferramentas para caracterização molecular de espécies de *Cryptosporidium* em nossas amostras no presente estudo.

4.6.2.2 Extração e purificação do ADN

O ADN foi extraído e purificado usando o Kit QIAamp ADN Stool Mini (Qiagen, Hilden, Germany) segundo as recomendações do fabricante, porém com as seguintes modificações: a temperatura de lise de oocistos foi aumentada para 95 °C e o ADN foi eluído em 100 µL. O ADN purificado foi armazenado a -20 °C até ao momento do uso.

4.6.2.3 Amplificação do gene SSU rRNA

Todas amostras foram submetidas a amplificação de toda a extensão do gene SSU rRNA através da reacção em cadeia de polimerase (PCR) convencional usando iniciadores 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTC-3' e 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG-3' anteriormente descritos (92). A mistura da PCR conteve Tampão (-MgCl₂) numa concentração final de 1x, 5 mM de MgCl₂, 200 mM de cada Desoxirribonucleotídeo Fosfatado (dNTP's), 1.0 U de *Taq* ADN polimerase (todos da Invitrogen Life Technologies, São Paulo, SP-Brasil), 100 nM de cada iniciador (Exxtend, SP-Brasil) e 2.5 µL de amostra de ADN num volume final de 25 µL da reacção. As condições da PCR foram idênticas às previamente descritas (92,93), excepto que a hibridização dos iniciadores foi a 61°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os seguintes parâmetros da PCR foram otimizados: concentração de MgCl₂, de *Taq* ADN polimerase e temperatura de anelamento. ADN obtido de cultura de trofozoitos purificados de *Giardia lamblia* e água tipo 1 sem adição de ADN foram usados, respectivamente, como controle negativo e um controle de contaminações dos reagentes da PCR (branco da reacção) foi incluído em cada reacção.

4.6.2.4 Amplificação de fragmento do gene SSU rRNA para caracterização molecular

Todas amostras positivas para amplificação de todo gene SSU rRNA foram submetidas a nested PCR no qual um segmento de aproximadamente 1325 pares de bases (pb) do gene SSU rRNA foi amplificado usando iniciadores anteriormente descritos (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' e 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3') (23,93).

Resumidamente, a PCR primária conteve tampão (-MgCl₂) numa concentração final de 1x; 6 mM de MgCl₂, 2.5 U de *Taq* ADN Polimerase, 200 µM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, SP-Brasil), 500 nM de cada iniciador (Exxtend, SP-Brasil), e 2 µL de amostra de ADN num volume total de 50 µL da mistura da reação. A amplificação foi executada num total de 35 ciclos cada um consistindo em 94°C por 45 segundos de desnaturação, 58°C por 45 segundos de hibridização e 72°C por 1 minuto de alongamento, com uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Foi realizada uma PCR secundária para amplificação de um fragmento de aproximadamente 826 a 864 pb utilizando 0.5 µL do produto da primeira PCR diluído na proporção de 1:20 ou 1 µL do produto não diluído, usando os iniciadores 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' e 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' (93). A mistura da PCR foi similar à anterior, exceptuando que a concentração de MgCl₂ foi de 3 mM, 100 nM de cada iniciador e 1.0 U de *Taq* ADN Polimerase. A amplificação foi executada num total de 25 ciclos cada um consistindo em 94°C por 45 segundos de desnaturação, 59°C por 30 segundos de hibridização e 72°C por 45 segundos de alongamento, com uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Todas amplificações foram feitas usando o Termociclador Mastercycler® gradient de 96 poços (Eppendorf AG, Hamburg-Germany).

4.6.2.5 Análise dos padrões dos fragmentos após digestão enzimática de ADN (RFLP)

Para a análise dos fragmentos resultantes da digestão enzimática, 20 µL do produto da segunda PCR foi digerido num total de 50 µL da mistura da reacção, consistindo em 10 U da enzima SspI (New England BioLabs® inc. Beverly, Mass) para o diagnóstico da espécie e 10 U de AseI (New England BioLabs® inc. Beverly, Mass) para a genotipagem de espécies de *Cryptosporidium* e 5 µL do tampão da respectiva enzima de restrição a 37°C por 1 hora. A reacção foi parada a 65°C por 20 minutos conforme as recomendações do fabricante.

4.6.2.6 Electroforese

Os fragmentos amplificados e fragmentos digeridos separados através da electroforese em gel de agarose (Invitrogen Life Technologies, Auckland, New Zealand) a 1.5% e 2.0% respectivamente e visualizados num transluminador (Bio-Rad, Milan Italy) sob luz Ultravioleta após coloração com GelRed a 3x (Biotium, Glowing Products for Science™, Hayward) segundo as instruções do fabricante.

4.7 Tratamento de dados e análise estatística

Todos dados foram introduzidos no programa Microsoft Office Excel 2007 para Windows (Microsoft) e posteriormente exportadas para o programa estatístico SPSS na sua versão 19.0 (IBM Company®, USA) e BioEstat v. 5.0 (Belém-Pará-Brasil).

Para descrever a população de estudo, as variáveis categóricas são descritas como frequências e percentagens e as contínuas como medianas com intervalos interquartis (IQRs) por não seguirem uma distribuição normal.

O grau de associação entre a infecção, os factores de risco e apresentação clínica foi determinado calculando a razão de Odds (*Odds Ratio*) (OR) e os respectivos intervalos de confiança (IC) a 95% e um valor de p menor que 0.05 ($p < 0.05$) foi considerado significativo.

O teste não paramétrico de igualdade das medianas (Wilcoxon Rank-Sum (Mann-Whitney U) foi usado para comparar as medianas entre os diferentes grupos. Para determinar a significância das associações na análise univariada das variáveis categóricas foi usado teste Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou o teste Exacto de Fisher quando a frequência esperada numa célula fosse menor que 5. Os valores

em falta (*missing values*) foram excluídos das análises, deste modo, os denominadores de algumas comparações diferem entre si.

Todas análises foram bilaterais e as inferências foram feitas a um nível de significância de 0.05 com intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram resumidos em tabelas de frequências, gráficos de barras e circulares.

A análise estatística foi feita com base no resultado do exame microscópio directo, pois, embora a microscopia seja menos sensível e específico na detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, é o método ouro padrão estabelecido em Moçambique, detectando casos com infecção activa.

Primeiro foi feita a análise univariada usando a regressão logística onde foram incluídas todas variáveis (características sociodemográficas da criança, incluindo informações do agregado familiar e condições de residência, de exposição a água e hábitos de higiene; alimentação, estado nutricional e apresentação clínica).

Variáveis como a faixa etária da criança, faixa etária do cuidador da criança, educação formal do cuidador, tipo de sanitários, alimentação, desidratação, estado nutricional e afeções respiratórias foram incluídas na nossa análise multivariada

Antes da análise multivariada, primeiro nós investigamos se existia uma alguma associação entre as variáveis (categóricas) (vide Apêndice A, tabela 10). O grau de associação foi quantificado usando χ^2 de Pearson, pois todas variáveis eram categóricas.

Com base nas associações/interações observadas entre as variáveis, cada variável foi analisada em modelos multivariados separados tendo em conta o grupo/conjunto de variáveis a elas associadas ($p < 0.05$) ou com indício de associação ($p \leq 0.20$) para controlar os factores de confusão (vide Apêndice A, tabela 10). Em todos modelos foi incluído o teste Hosmer and Lemeshow para o ajustamento dos dados e o modelo foi aceite sempre que o valor de p fosse maior que 0.05. Todas análises foram feitas após o procedimento da limpeza de dados.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil do estudo

A figura 9 representa o desenho do estudo. Durante o período do estudo (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016) um total de 336 crianças admitidas por diarreia aguda nos hospitais gerais de Mavalane e José Macamo, foram convidadas a participar do estudo. Destas, 3.3% (11/336) eram maiores de 60 meses, 0.3% (1/336) tinha o formulário parcialmente preenchido, 1.2% (4/336) não forneceram amostra fecal; sendo o restante 95.2% (320/336) constituído por crianças que forneceram amostra fecal e responderam ao questionário. Destas, uma amostra (1/320, 0.31%) foi descartada devida a deterioração por má conservação, resultando num total de 99.6% (319/320) amostras submetidas ao exame microscópico e incluídos na análise estatística. Destas, 61.1% (196/319) tiveram amostra suficiente para testagem molecular, dos quais 98.5% (192/196) ADN foi purificado e testado com sucesso.

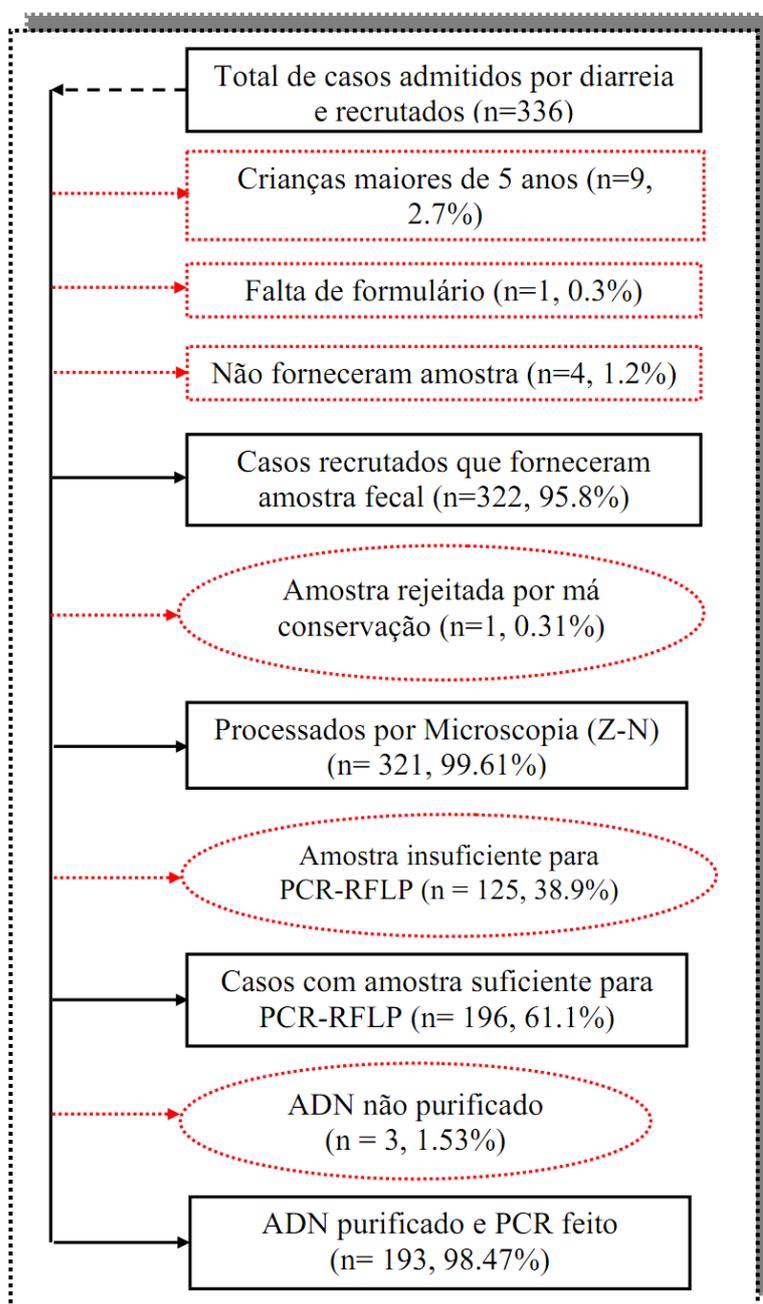


Figura 9. Fluxo do estudo mostrando o número de crianças com diarreia aguda incluídas e o número de amostras disponíveis para detecção e caracterização molecular. Z-N - Ziehl-Neelsen

5.2 Características gerais da população de estudo

Ao todo, foram analisadas 319 amostras fecais de pacientes com idade compreendida entre 0 a 60 meses, dos quais 48.9% (156/319) eram provenientes do Hospital Geral de Mavalane (HGM) e 51.1% (163/319) do Hospital Geral José Macamo (HGJM).

5.2.1 Características sociodemográficas

A distribuição de frequências das características sociodemográficas das crianças participantes segundo a proveniência (Unidade Sanitária) está representada na tabela 1. Das 319 crianças, 57.7% (184/319) era do sexo masculino; a mediana da idade (Intervalo InterQuartil - IIQ) foi de 11 meses (7-15) (vide Apêndice B; tabela 11) dos quais 40.8% (130/319) tinham entre 7 a 12 meses de idade.

Tabela 1. Características sociodemográficas por unidade sanitária (Hospital Geral de Mavalane e José Macamo) de crianças de 0 a 60 meses com diarreia aguda recrutadas no âmbito da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças na cidade de Maputo, Moçambique, Abril de 2015 a Fevereiro de 2016.

Características dos pacientes	Total % (n)	Proveniência		Valor de p
		HG-Mavalane % (n)	HG-José Macamo % (n)	
Género				
Feminino	42.3 (135)	42.2 (57)	57.8 (78)	0.04
Masculino	57.7 (184)	53.8 (99)	46.2 (85)	
Faixa etária da criança				
0 - 6 Meses	19.7 (63)	47.6 (30)	52.4 (33)	0.87
7 – 12 Meses	40.8 (130)	48.5 (63)	51.5 (67)	
13 – 18 Meses	25.4 (81)	49.4 (40)	50.6 (41)	
19 – 24 Meses	9.4 (30)	56.7 (17)	43.3 (13)	
25 - 60 Meses	4.7 (15)	40.0 (6.0)	60.0 (9.0)	
Faixa etária do cuidador				
≤ 20 Anos	18.6 (57)	52.6 (30)	47.4 (27)	0.34
21 - 26 Anos	35.9 (110)	49.1 (54)	50.9 (56)	
27 - 32 Anos	24.8 (76)	42.1 (32)	57.9 (44)	
≥ 33 Anos	20.6 (63)	57.1 (36)	42.9 (27)	
Educação formal				
Sim ^a	58.2 (185)	42.2 (78)	57.8 (107)	0.01
Não ^b	41.8 (133)	57.9 (77)	42.1 (56)	

n – número de participantes, **HG** – Hospital Geral, **p** – valor de p pelo teste χ^2 de Pearson, ^a Tem no mínimo o nível secundário ou ensino técnico; ^b Não estudou ou frequentou a escola até ao nível primário.

O cuidador principal da criança tinha idade entre 15 a 66 anos, mediana (IIQ) 25.5 (21–31) anos (vide Apêndice B; tabela 11) e quando categorizado, observou-se

que 35.9% (110/306) tinham idade compreendida entre 21 a 26 anos. Mais que a metade dos cuidadores 58.2% (185/318) responderam que tinham alguma formação formal no momento do inquérito (tabela 1).

5.2.2 Tipo de água usada, alimentação e hábitos de higiene ambiental

A maior parte das crianças vivia em famílias com água canalizada no pátio da casa 85.8% (273/318) ($p=0.01$). Mais que a metade 61.8% (191/309) respondeu possuir uma casa de banho provida de fossa séptica, sendo os restantes 38.2% (118/309) com latrinas como forma de despejo dos dejectos; 38.9% (124/319) dos cuidadores responderam que a criança teria tido contacto com uma ou mais espécies de animais domésticos, tendo sido mais frequente 63.7% (79/124) contacto com mamíferos (tabela 2), incluindo cão 23.4% (29/124), gato 59.7% (74/124), porco 3.2% (4/124), cabrito 2.4% (3/124), boi 1.6% (2/124) e coelho 0.8% (1/124) (vide Apêndice B, tabela 12).

Tabela 2. Características sociodemográficas (exposição a água e hábitos de higiene) por unidade sanitária (HGM e HGJM) de crianças de 0 a 60 meses com diarreia aguda recrutadas no âmbito da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças na cidade de Maputo, Moçambique, Abril de 2015 a Fevereiro de 2016.

Características dos pacientes	Total % (n)	Proveniência		Valor de p
		HG-Mavalane n (%)	HG-José Macamo n (%)	
Fonte de água				
Canalizada	85.8 (273)	52.0 (142)	48.0 (131)	0.01
Outras Fontes	14.2 (45)	31.1 (14)	68.9 (31)	
Alimentação				
Leite Materno	29.6 (94)	77.7 (73)	22.3 (21)	0.00
Leite Artificial	8.8 (28)	28.6 (8)	71.4 (20)	
Outros alimentos	61.6 (196)	38.3 (75)	61.7 (121)	
Sanitários				
Com fossa séptica	61.8 (191)	41.9 (80)	58.1 (111)	0.0
Latrina	38.2 (118)	59.3 (70)	40.7 (48)	
Contacto Animal				
Não	61.1 (195)	47.7 (93)	52.3 (102)	0.59
Sim	38.9 (124)	50.8 (63)	49.2 (61)	
Tipo de Animal				
Mamífero ^a	63.7 (79)	41.8 (33)	58.2 (46)	0.03
Mamífero e Aves	15.3 (19)	63.2 (12)	36.8 (7)	
Aves ^b	21.0 (26)	69.2 (18)	30.8 (8)	

^aCão, gato, porco, cabrito, boi; ^bPato, galinha, pombo.

O aleitamento materno mostrou-se sendo uma prática menos comum 29.6% (94/318) quando comparada com crianças que alimentavam-se de outros tipos de alimentos 61.6% (196/318) na sua dieta.

5.2.3 Apresentação clínica

A tabela 3 mostra a distribuição das características clínicas das crianças (co-morbidades e sintomas). Das 151 crianças com informação completa para os três indicadores nutricionais usados no presente estudo, 52.3% (79/151) das crianças sofria de algum grau de malnutrição (moderada ou severa). As co-morbidades apresentadas pelas crianças encontravam-se igualmente distribuídas entre as duas unidades sanitárias excepto as afecções do trato respiratório 8.4% (25/298), as quais incluem tosse, bronquite, infeções das vias respiratórias superiores (IVRS), pneumonia e broncopneumonia (BPN). A infecção por VIH e por *Plasmodium* spp. (malária) foi detectada em 19.62% (41/209) e 6.0% (18/300) respectivamente.

Tabela 3. Características clínicas dos pacientes por unidade sanitária de crianças de 0 a 60 meses com diarreia aguda recrutadas para o estudo da Vigilância de Diarreias Agudas em Crianças em Maputo, Moçambique, Abril de 2015 a Fevereiro de 2016.

Características dos pacientes	Total % (n/N)	Proveniência		Valor de p
		HG - Mavalane % (n)	HG - José Macamo % (n)	
Estado nutricional				
Normal	47.7 (72/151)	52.8 (38)	47.2 (34)	0.38
Desnutridos	52.3 (79/151)	45.6 (36)	54.4 (43)	
VIH				
Positivo	19.6 (41/209)	53.7 (22)	46.3 (19)	0.94
<i>Plasmodium</i> spp. (malária)				
Positivo	6.0 (18/300)	33.3 (6)	66.7 (12)	0.18
Afecções respiratórias				
Sim	8.4 (25/298)	20.0 (5)	80.0 (20)	0.00
Vômito				
Sim	50.8 (161/317)	29.2 (47)	70.8 (114)	0.00
Febre				
Sim	28.6 (91/318)	8.8 (8)	91.2 (83)	0.00
Desidratação				
Sim	53.8 (171/318)	30.4 (52)	69.6 (119)	0.00

n – número de participantes, N – tamanho amostral, HG – Hospital Geral, p – valor de p pelo teste χ^2 de Pearson

A frequência dos sintomas: vômito (50.8%; 161/317), febre (28.6%, 91/318) e desidratação 53.8% (171/318), apresentados pelas crianças mostrou-se significativa e desigualmente distribuída entre os dois Hospitais, dos quais o HGJM registou

maior número de crianças com vômitos 70.8% (114/161), febre 91.2% (83/91) e crianças desidratadas 69.6% (119/171) ($p=0.00$) (tabela 3).

5.3 Frequência, distribuição da criptosporidose pela microscopia óptica e factores associados pela análise univariada.

No presente estudo, a frequência geral de detecção de oócistos de *Cryptosporidium* spp. por microscopia directa entre as crianças que participaram deste estudo foi de 10.9% (35/319) (figura 10). A frequência de detecção de oócistos de *Cryptosporidium* spp. foi similar nas duas unidades sanitárias ($\chi^2=2.18$, $p = 0.14$) (figura 11).

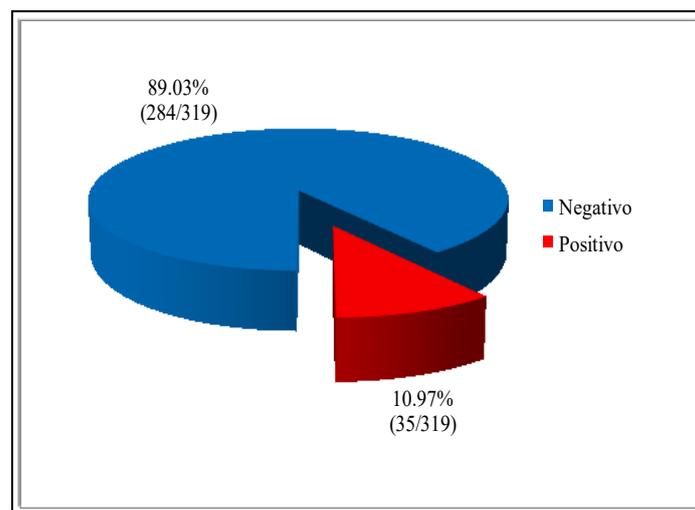


Figura 10. Frequência geral de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (n=319).

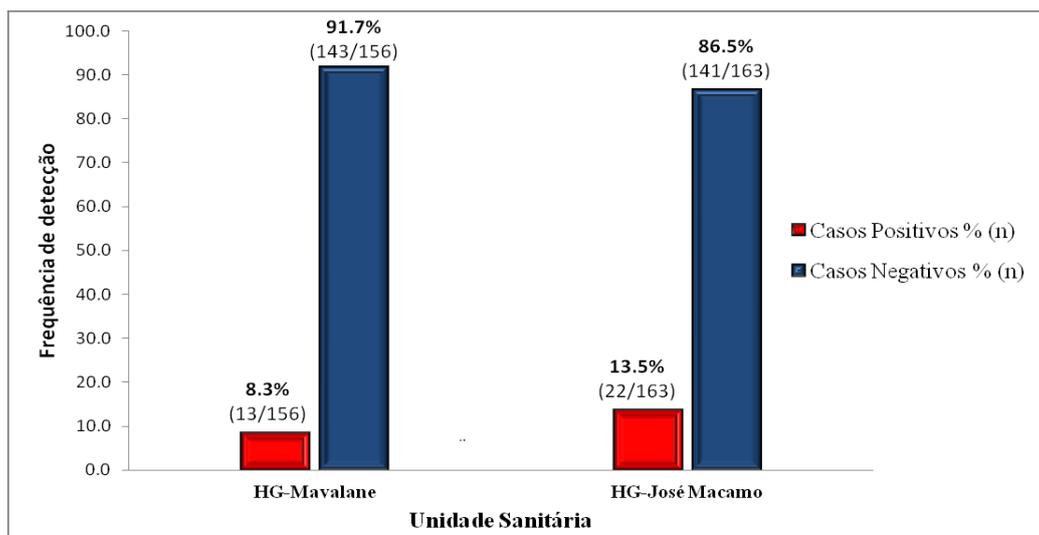


Figura 11. Distribuição de casos de cryptosporidose nas duas unidades sanitárias (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016) (n=319).

A figura 12 mostra a distribuição de casos de infecção por *Cryptosporidium* spp. segundo a residência (Distrito) da criança a qual foi similar entre os distritos (Fisher's Exact Test = 13.10, $p=0.09$).

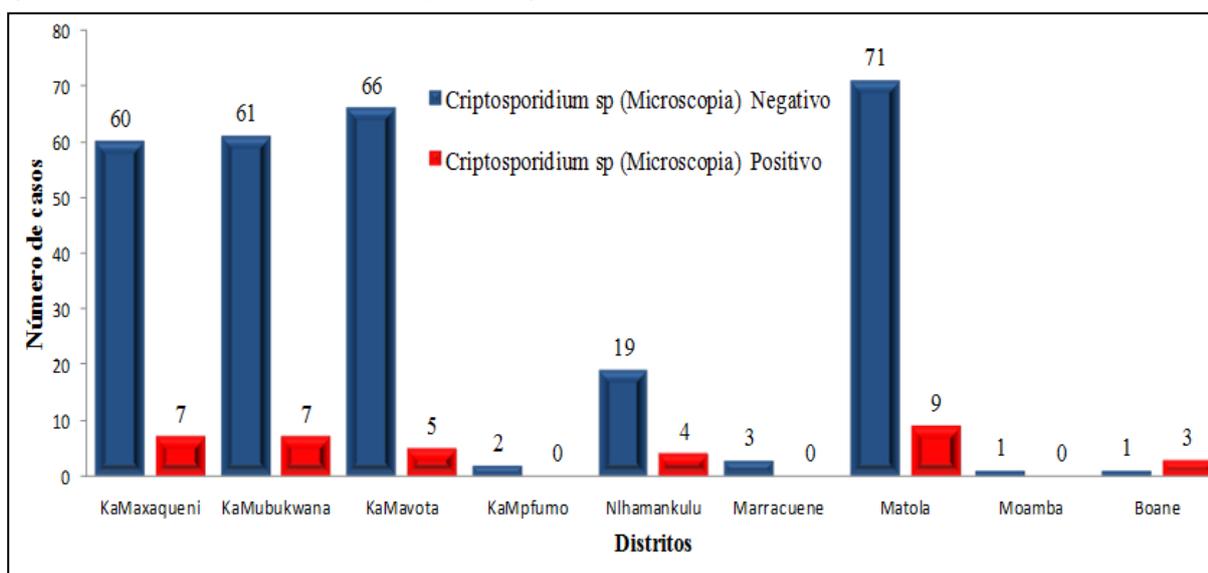


Figura 12. Distribuição de casos de cryptosporidose por residência (distritos) (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016) (n=319).

5.3.1 Características sociodemográficas

As estimativas de frequência de detecção de oócistos de *Cryptosporidium* spp. específicas para cada variável demográfica e social, incluindo o género e a faixa etária da criança, faixa etária e educação do cuidador estão representadas na Tabela 4.

A cryptosporidose foi mais frequente entre crianças do sexo feminino 11.9% (16/135), com uma tendência de aumentar com a idade da criança. A estratificação mostrou uma variação de 11.5% em crianças mais novas (7 a 12 meses) a 20.0% em crianças mais velhas (25 a 60 meses).

A frequência da cryptosporidose teve uma tendência decrescente com a idade do cuidador da criança (5.3% para cada aumento em um ano) e quando estratificado, a taxa de infecção foi mais alta entre crianças cujos cuidadores tinham idade igual ou menor de 20 anos 17.5% (10/57). Crianças cujos cuidadores não tinham educação formal tiveram maior taxa de infecção 14.3% (19/133) quando comparadas com aquelas cujos cuidadores tinham alguma educação formal 8.6% (16/185) (tabela 4).

A tabela 4 mostra ainda que a faixa etária da criança e do cuidador constituíram factores de risco associados a infecção. Primeiro nós encontramos que

o risco de aquisição de criptosporidose aumentou em 3.2% a cada aumento em 1 mês na idade da criança, Coeficiente B (Coef B) 0.032, erro padrão (EP) 0.018 (vide Apêndice B, tabela 13).

Tabela 4. Associação entre as características sociodemográficas dos pacientes e a infecção por espécies de *Cryptosporidium* em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no HG-Mavalane e HG-José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016).

Características	<i>Cryptosporidium</i> spp. % (n)	ORb (IC 95%)	Valor de p
Género			
Feminino	11.9 (16/135)	Referência	
Masculino	10.3 (19/184)	0.86 (0.42-1.73)	0.67
Faixa etária da criança			
≤ 6 Meses	1.6 (1/63)	Referência	
7 – 12 Meses	11.5 (15/130)	8.09 (1.04-62.67)	0.05
13 – 18 Meses	16.0 (13/81)	11.85 (1.51-93.27)	0.02
19 – 24 Meses	10.0 (3/30)	6.89 (0.69-69.25)	0.10
25 - 60 Meses	20.0 (3/15)	15.50 (1.48-161.89)	0.02
Faixa etária do cuidador			
≤ 20 Anos	17.5 (10/57)	4.26 (1.11-16.34)	0.04
21 - 26 Anos	8.2 (9/110)	1.78 (0.46-6.84)	0.40
27 - 32 Anos	13.2 (10/76)	3.03 (0.79-11.54)	0.10
≥ 33 Anos	4.8 (3/63)	Referência	
Educação formal do cuidador			
Sim	8.6 (16/185)	Referência	
Não	14.3 (19/133)	1.76 (0.87-3.57)	0.12

ORb - Odds ratio bruto; IC95% - Intervalo de Confiança a 95%. n – número de participantes.

A análise por faixa etária (tabela 4) mostrou que crianças com idade entre 7 a 12, 13 a 18 e 25 a 60 meses estavam com mais *chance* de estarem infectadas com espécies de *Cryptosporidium* comparadas com as mais novas (0 a 6 meses de idade), sendo a faixa de 25 a 60 meses com a maior *chance* de infecção, Odds ratio bruto (ORb) 15.50; IC95% 1.48-161.89 ($p=0.02$).

Por outro lado, o risco diminuiu em 5.4% a cada aumento em 1 ano de idade do cuidador da criança, Coef B (EP) 0.054 (0.029) (vide Apêndice B, tabela 13). A análise estratificada da idade do cuidador revelou que crianças cujos cuidadores tinham idade não superior a 20 anos (ORb 4.26; IC95% 1.11-16.34, $p=0.04$) tiveram maior risco de aquisição de criptosporidose quando comparadas com as crianças cujos cuidadores tinham idade não inferior a 33 anos (tabela 4).

A análise univariada não mostrou associação estatisticamente significativa entre o género da criança, a educação do cuidador e a criptosporidose (tabela 4).

5.3.2 Exposição a água, alimentação e hábitos de higiene

A

tabela 5 mostra que a criptosporidose foi mais frequente entre crianças cujas famílias não tinham água canalizada no pátio da casa 17.8% (8/45), cuja dieta era composta por diversos tipos de alimentos 13.8% (27/196), que usavam latrinas tradicionais para o despojo de dejectos no domicílio 14.4% (17/118), com animais domésticos cuja criança teve contacto com pelo menos um tipo de animal 12.1% (15/124), incluindo mamíferos e aves 26.3% (5/19).

Tabela 5. Associação entre a exposição a água, hábitos de higiene, dieta, estado nutricional e a e a criptosporidose em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no Hospital Geral Mavalane e Hospital Geral José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016).

Características	<i>Cryptosporidium</i> spp. % (n)	ORb (IC 95%)	Valor de p
Fonte de água			
Canalizada no pátio	9.9 (27/273)	Referência	
Outras fontes	17.8 (8/45)	1.97 (0.83-4.66)	0.12
Alimentação			
Leite materno	5.3 (5/94)	Referência	
Leite artificial	10.7 (3/28)	2.14 (0.48-9.56)	0.32
Outros alimentos	13.8 (27/196)	2.69 (1.06-7.64)	0.04
Sanitários			
Fossa séptica	9.40 (18/191)	Referência	
Latrina	14.4 (17/118)	1.62 (0.80-3.28)	0.18
Contacto Animal			
Não	10.3 (20/195)	Referência	
Sim	12.1 (15/124)	1.20 (0.59-2.45)	0.61
Tipo de Animal			
Sem contacto	10.3 (20/195)	Referência	
Mamífero	10.1 (8/794)	0.99 (0.42-2.34)	0.97
Mamífero e aves	26.3 (5/19)	3.13 (1.02-9.59)	0.05
Aves	7.7 (2/26)	0.73 (0.16-3.32)	0.68

ORb - Odds ratio bruto; IC 95% - Intervalo de Confiança a 95%, n – número de participantes.

A análise univariada revelou que, crianças que não tinham água canalizada no pátio da casa (ORb=1.97), viviam em famílias que usavam latrinas tradicionais (ORb=1.62) e tiveram contacto com animais (ORb=1.20) tinham mais *chances* de serem infectadas por espécies de *Cryptosporidium*; porém essa associação não foi estatisticamente significativa ($p>0.05$); mas ter uma dieta composta por diversos tipos de alimentos e contacto concomitante com mamíferos e aves no domicílio

constituíram significativos factores de risco para a aquisição da infecção (ORb 2.69; IC95% 1.06-7.64, $p=0.04$) e (ORb 3.13; IC95% 1.02-9.59, $p=0.046$) respectivamente (tabela 5).

5.3.3 Apresentação clínica

5.3.3.1 Co-morbididades

A tabela 6 mostra que a criptosporidose foi mais comum entre crianças com pelo menos duas formas de malnutrição (desnutrição grave ou moderada) 15,2% (12/79 casos), infectadas por VIH 9,8% (4/41), com infecção por *Plasmodium* spp. (malária) 11,1% (2/18) e com pelo menos um tipo de afecções do trato respiratório (ATR) 24% (6/25).

Tabela 6. Co-morbididades associadas à criptosporidose em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no HG-Mavalane e HG-José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016).

Co-morbidades	<i>Cryptosporidium</i> spp. % (n)	ORb (CI 95%)	Valor de p
Estado Nutricional			
Normal	6.9 (5/72)	Referência	
Desnutridos	15.2 (12/79)	2.40 (0.80-7.19)	0.12
VIH			
Negativo	9.5 (16/168)	Referência	
Positivo	9.8 (4/41)	1.03 (0.32-3.25)	0.97
Malária			
Não	10.6 (30/282)	Referência	
Sim	11.1 (2/18)	1.05 (0.23-4.79)	0.95
Afecções respiratórias			
Não	9.5 (26/273)	Referência	
Sim	24.0 (6/25)	3.00 (1.10-8.18)	0.03

ORb - Odds ratio bruto; IC95% - Intervalo de Confiança a 95%

A análise univariada no presente estudo revelou que a infecção por espécies de *Cryptosporidium* não foi significativamente influenciada pelo estado nutricional da criança ($p=0.12$), infecção por VIH ($p=0.96$) e infecção por *Plasmodium* spp. ($p=0.95$), mas crianças com afecções respiratórias mostraram maior chance de aquisição da criptosporidose quando comparadas com crianças sem afecções de ordem respiratória (ORb=3.0; 1.10-8.18, $p=0.03$) (tabela 6).

5.3.3.2 Sintomas

Participantes que relataram ter tido pelo menos um episódio de vômitos 11.2% (18/161), febre 13.2% (12/91) nas últimas 24 horas antecedentes ao inquérito e crianças clinicamente desidratadas 15.2% (26/171) tiveram maior frequência de infecção por espécies de *Cryptosporidium* (tabela 7).

Tabela 7. Sinais e sintomas associados à criptosporidose em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no HG-Mavalane e HG-José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016).

Sintomas	<i>Cryptosporidium</i> spp. % (n)	ORb (CI 95%)	Valor de p
Vômito			
Não	10.3 (16/156)	Referência	
Sim	11.2 (18/161)	1.10 (0.54-2.25)	0.79
Febre			
Não	10.1 (23/227)	Referência	
Sim	13.2 (12/91)	1.35 (0.64-2.84)	0.43
Desidratação			
Não	6.1 (9/147)	Referência	
Sim	15.2 (26/171)	2.75 (1.24-6.08)	0.01

ORb - Odds ratio bruto; **IC95%** - Intervalo de Confiança a 95%

Em relação aos sintomas, a análise univariada mostrou que infecção não foi significativamente associada a vômitos e febre, mas uma forte associação entre a infecção por espécies de *Cryptosporidium* e o estado de hidratação (desidratação) dos pacientes (ORb=2.75; 1.24-6.08, $p=0.01$) (tabela 7).

5.4 Factores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. pela análise multivariada

Os factores de risco para a infecção por espécies de *Cryptosporidium* pela análise multivariada estão ilustrados na tabela 8. O modelo multivariado mostrou que o risco de aquisição da criptosporidose reduziu ligeira e significativamente com a faixa etária do cuidador da criança. Quando comparadas com crianças cujos cuidadores tinham idade não inferior a 33 anos, os cuidadores as faixas etárias mais novas, ≤ 20 anos e 27 a 32 anos, ofereceram maiores *chances* de aquisição da criptosporidose: ORa=10.03; IC95% 2.18-46.25, $p=0.003$ e ORa=4.98; IC95% 1.21-20.40, $p=0.03$, respectivamente.

Conforme esperado, ser cuidador sem educação formal (ORa=2.8, CI95% 1.15-6.84, $p=0.02$) constituiu um factor de estatisticamente significante para a

aquisição da criptosporidose. Adicionalmente, o nosso modelo multivariado revelou que pacientes com uma dieta composta pelo leite artificial tinham maior risco de aquisição da infecção (ORa=8.80; 1.33-58.03, $p=0.02$) e embora ainda positiva, o risco de aquisição da infecção em crianças cuja dieta era composta por outros alimentos perdeu a significância estatística (ORa=2.73; 0.80-9.33) (tabela 8).

Tabela 8. Factores de risco para infecção por espécies de *Cryptosporidium* em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no Hospital Geral -Mavalane e Hospital Geral José Macamo, análise multivariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016).

Características dos pacientes	ORa (IC 95%)	Valor de p
Faixa etária da criança		
≤ 6 Meses	Referência	
7 – 12 Meses	2.55 (0.21-30.62)	0.46
13 – 18 Meses	1.58 (0.13-18.56)	0.72
19 – 24 Meses	1.07 (0.04-28.21)	0.97
25 - 60 Meses	8.36 (0.40-174.02)	0.17
Faixa etária do cuidador		
≤ 20 Anos	10.03 (2.18-46.25)	0.003
21 - 26 Anos	3.22 (0.759-13.67)	0.11
27 - 32 Anos	4.98 (1.21-20.40)	0.03
≥ 33 Anos	Referência	
Educação formal do cuidador		
Sim	Referência	
Não	2.8 (1.15-6.84)	0.02
Fonte de água		
Canalizada no pátio	Referência	
Outras fontes	1.67 (0.69-4.0)	0.25
Alimentação		
Leite materno	Referência	
Leite artificial	8.78 (1.33-58.03)	0.02
Outros alimentos	2.73 (0.80-9.33)	0.11
Sanitários (latrina)	1.29 (0.58-2.87)	0.53
Estado nutricional (desnutridos)	2.18 (0.70-6.74)	0.18
Afecções respiratórias (sim)	3.88 (1.25-12.01)	0.02
Desidratação (sim)	3.52 (0.91-13.66)	0.07

ORa - Odds ratio ajustado; IC95% - Intervalo de Confiança a 95%

Quando ajustado com potenciais confundidores, a *chance* de uma criança apresentando-se com pelo menos uma forma de afecção respiratório, estar infectada por espécies de *Cryptosporidium* foi 3.9 vezes mais alta (ORa=3.88; 1.25-12.01; $p=0.02$) quando comparada com crianças sem afecções respiratórias. Por outro lado, a *chance* de uma criança desidratada estar infectada com espécies de

Cryptosporidium aumentou de 2.7 (tabela 7) para 3.5 (tabela 8) vezes mais alta quando foi ajustada com potências factores de confusão, mas a significância estatística desapareceu permanecendo no limiar (ORa 3.52; IC95% 0.91-13.66; $p=0.07$).

Por último, o nosso modelo multivariado não mostrou associação significativa entre a infecção por espécies de *Cryptosporidium* com a faixa etária da criança, fonte de água, tipo de sanitários e estado nutricional da criança (tabela 8).

5.5 Detecção e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp.

No presente estudo, das 319 amostras fecais testadas por microscopia directa, 192 amostras, incluindo 13.5% (26/192) amostras positivas microscopicamente, foram analisadas por meio da técnica da PCR convencional para detecção de ADN de espécies de *Cryptosporidium* tendo como alvo o gene SSU rRNA. Não houve diferença estatisticamente significativa no perfil clínico-epidemiológico entre os casos com e sem testes moleculares (Apêndice D, tabela 15 e Apêndice E, tabela 16).

5.5.1 Amplificação do gene SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp.

Todo o gene SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp. foi amplificado, um fragmento de aproximadamente 1.733 a 1.750 pares de base (pb) (figura 13), em 35.4% (68/192) (figura 14) amostras, incluindo 22 dentre as amostras positivas e 46 dentre as amostras negativas para a presença do parasito ao microscópio óptico; o nosso protocolo não foi capaz de amplificar 4 amostras que foram positivas por microscopia.

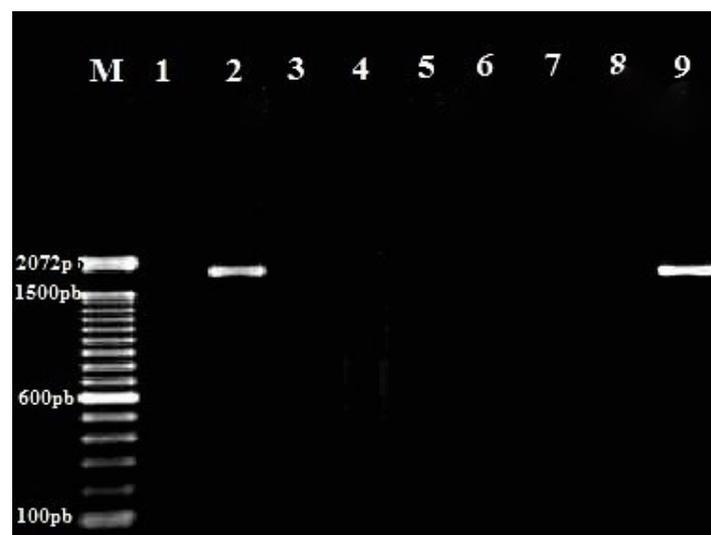


Figura 13. Detecção molecular de *Cryptosporidium* spp. pela PCR convencional baseado no gene SSU rRNA. **M**, marcador molecular (100 pb). Linhas 2 e 9 são amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. (≈ 1733 a 1750 pb). Linhas 1, 3, 4, 5 e 6 são amostras negativas. Linha 7 *Giardia lamblia* (controlo negativo), Linha 8, controlo negativo (água destilada).

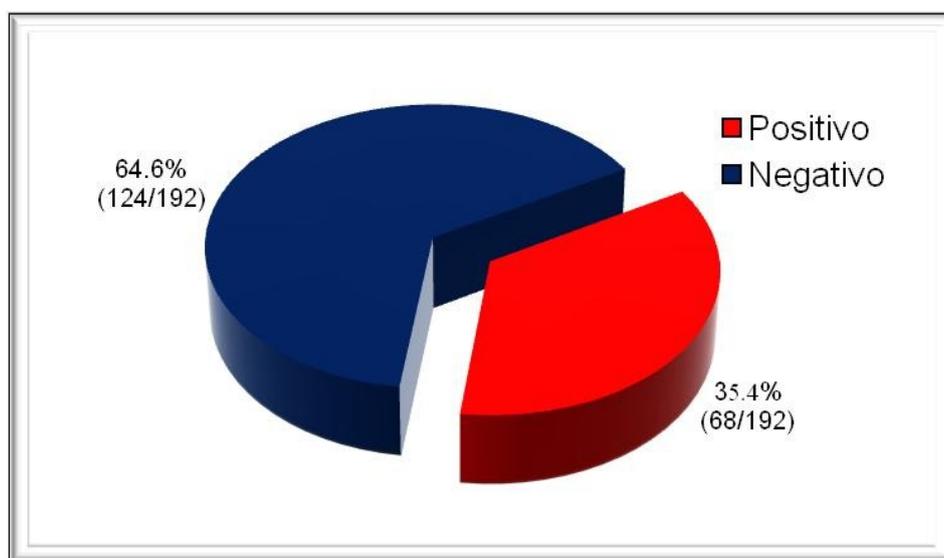


Figura 14. Frequência de detecção de ADN de *Cryptosporidium* spp. por PCR convencional em amostras fecais de crianças de 0 a 60 meses de idade admitidas em duas Unidades Sanitárias da Cidade de Maputo (n=192).

Como ilustra a figura 15, a frequência de detecção de *Cryptosporidium* spp. por PCR convencional foi similar nas duas Unidades Sanitárias: 37.1% vs 33.7% ($\chi^2=0.247$, $p=0.619$) para Hospital Geral de Mavalane vs Hospital Geral José Macamo, respectivamente.

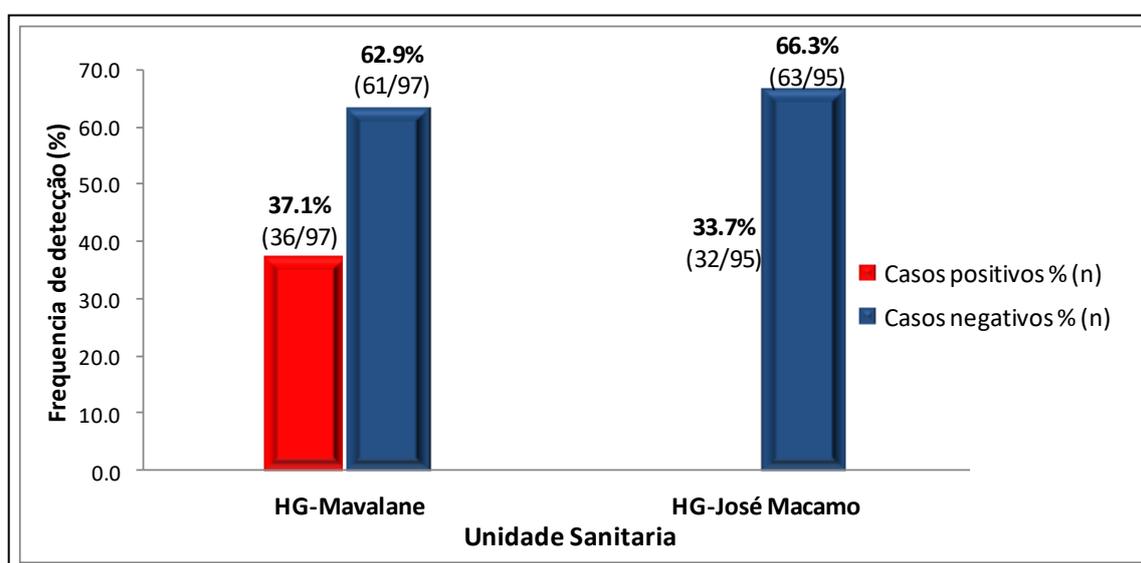


Figura 15. Distribuição da frequência de detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp. por PCR convencional em amostras fecais de crianças de 0 a 60 meses admitidas em duas Unidades Sanitárias da Cidade de Maputo (n=192).

5.5.2 Nested PCR e análise da RFLP

A identificação de espécie/genótipo de *Cryptosporidium* foi realizada pela técnica de Nested PCR, seguida de análise de RFLP com base na região mais polimórfica do gene SSU rRNA. Um fragmento de aproximadamente 826 a 864 pb (figura 16) foi amplificado em 42,7% (29/68) amostras. A análise da RFLP mostrou que das 29 amostras que amplificaram com sucesso pela Nested PCR, a infecção por *C. hominis* (93.1%, 27/29) foi a mais comum, seguida por *C. parvum* genótipo bovino (3.45%, 1/29) e uma infecção mista com *C. hominis* e *C. parvum* genótipo bovino (3,5%, 1/29) (figura 17 e figura 18) também foi detectado.

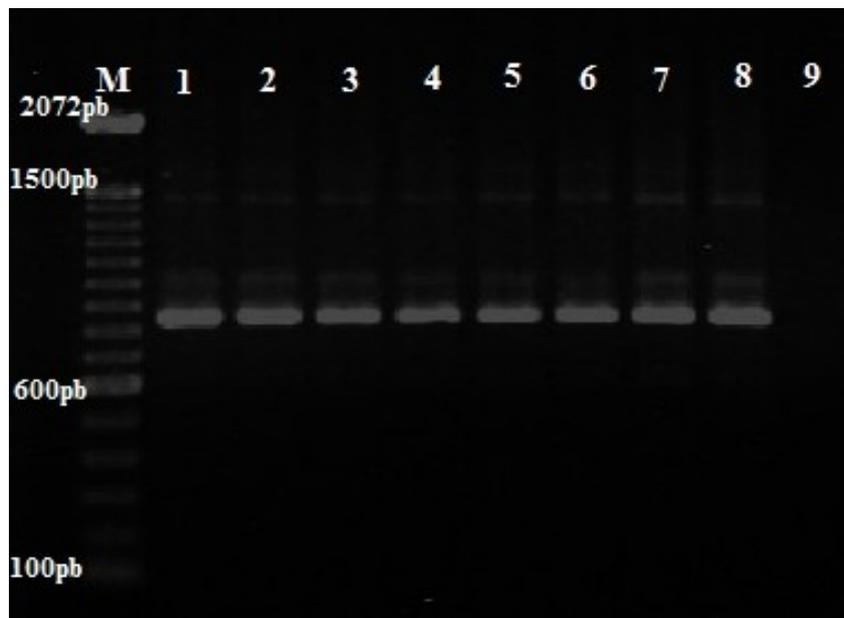


Figura 16. Detecção específica de ADN de *Cryptosporidium* spp. por nested PCR. Amplificação de um fragmento de aproximadamente 826 to 864 pb do gene SSU rRNA. M, marcador molecular (100 pb). Linhas 1 a 8, amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. Linha 9, controlo negativo.

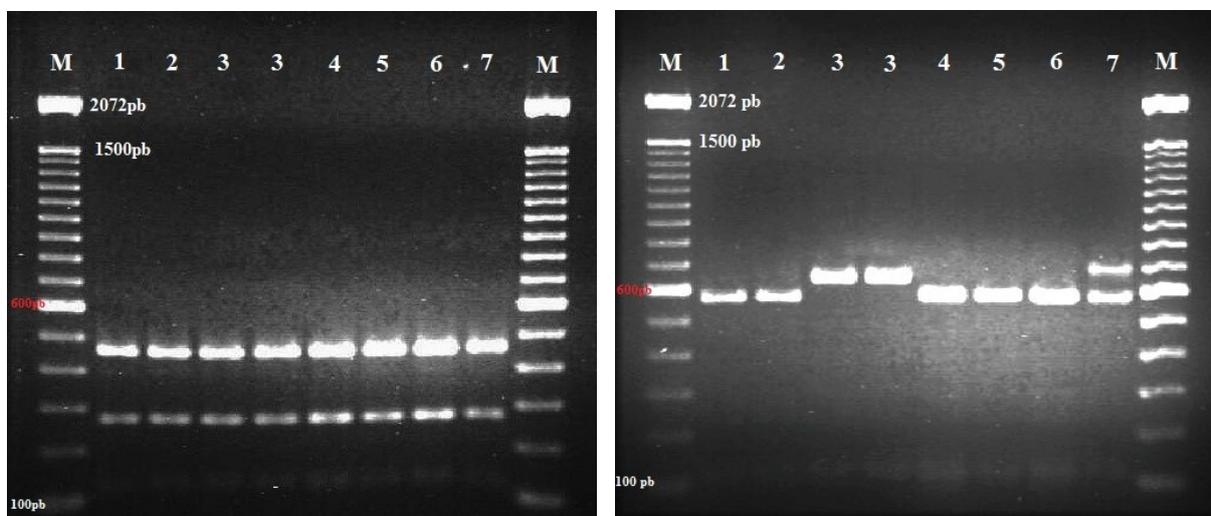


Figura 17. Genotipagem e especiação de isolados de *Cryptosporidium* por RFLP baseado no gene SSU rRNA. A esquerda, digestão com *SspI* e a direita com *AseI*. M, marcador molecular (100 pb). Linhas 1, 2, 4, 5 e 6, *C. hominis*. Linha 3, *C. parvum* genótipo Bovino. Linha 7, infecção mista com *C. hominis* e *C. parvum* genótipo bovino.

As espécies/genótipos das restantes 39 amostras (57.4%) permaneceram indeterminadas (figura 18) porque o nosso protocolo não foi capaz de amplificá-las e consequentemente genotipá-las e quando consideramos o resultado das duas técnicas (microscopia-positiva ou PCR convencional-positiva), a frequência de detecção de espécies de *Cryptosporidium* aumenta de 10.9% (35/319) para 25.4% (81/319) (tabela 9).

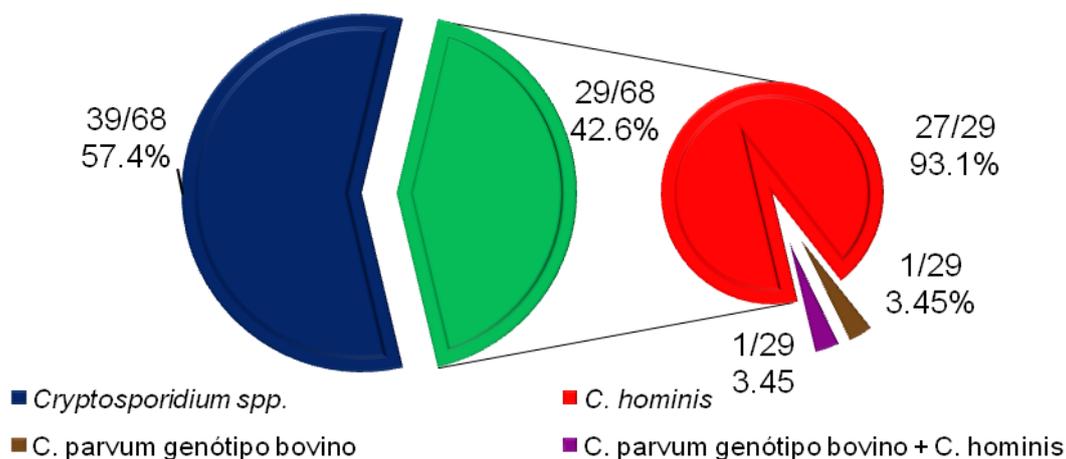


Figura 18. Frequência de espécies e genótipos identificados no presente estudo.

Tabela 9. Sumário da taxa de detecção de oócistos de *Cryptosporidium* spp. segundo o método aplicado no presente estudo.

Métodos aplicados	Positivo	Negativo	Genotipados	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	
Microscopia	35 (10,9)	284 (89,0)	NA	319
PCR	68 (35,4)	124 (64,6)	29 (15,1)	192
Apenas microscopia	13 (4,10)	306 (95,9)	NA	319
Apenas PCR	46 (14,4)	273 (85,6)	7 (2,2)	319
Microscopia ou PCR	81 (25,4)	238 (76,6)	29 (9,1)*	319

NA - Não aplicável; *Apenas para positivos por PCR, n – número de participantes

6 DISCUSSÃO

A epidemiologia da criptosporidose em Moçambique ainda é pouco conhecida. No presente estudo determinou-se, a frequência e as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* entre crianças dos 0 a 60 meses admitidas com diarreia aguda em dois hospitais públicos da cidade de Maputo, Sul de Moçambique, os quais eram maioritariamente 71.5% (228/319) provenientes da zona suburbana da cidade de Maputo (vide Apêndice C, tabela 14). Foram colectadas 319 amostras fecais de igual número de crianças entre Abril de 2015 a Fevereiro de 2016 e analisadas através da microscopia e técnicas moleculares (PCR-RFLP) para a presença de oócistos de *Cryptosporidium* spp.

No presente estudo, o exame microscópico mostrou que 10.97% (35/319) das crianças estavam infectadas por espécies de *Cryptosporidium*. Este resultado é similar ao reportado no sul de Moçambique (Manhiça) (38,84), que estimaram uma prevalência de 12.15% e 11.2% respectivamente, mesmo usando uma técnica diferente deste estudo (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) (Microscopia). Por outro lado, a frequência encontrada no presente estudo foi mais alta em relação ao reportado em Moçambique por Mandomando e colaboradores em 2007, os quais reportaram uma frequência de 0.6% entre crianças menores de 5 anos admitidas num hospital rural em Manhiça (37) e dos achados reportados em Nairobi (Kenia) e Gana, onde estudos de base hospitalar reportaram prevalências de 8.9% em crianças de 0 a 60 meses (69) e 5.2% em crianças menores de 14 anos (96) respectivamente.

Becker e colaboradores (2015), usando dados da “*National Health and Nutritional Examination Survey*” (NHANES), um estudo conduzido pela “*National Center for Health Statistics*” (NCHS) entre 1999 e 2000 nos Estados Unidos, estimaram uma seroprevalência de 21.2% em amostras de soro de 4359 indivíduos de 6 a 49 anos de idade (55) e Thivierge e colaboradores (2016), usando amostras fecais de 283 indivíduos de 1 mês a 88 anos (mediana de 34 anos) de idade apresentando-se com diarreia em Quebec, Canada, encontraram uma prevalência de 18,0% através da microscopia, sendo 6.7% a prevalência encontrada em crianças menores de 5 anos (28).

Esta diferença na frequência da infecção pode ser devida a diferença no desenho do estudo, a população alvo, o tamanho da amostra, os métodos/técnicas

de diagnósticos usados, diferenças socioeconómicas, demográficas, geográficas e higieno-sanitárias nas diferentes áreas de estudos.

6.1 Características sociodemográficas das crianças

No presente estudo descrevemos a distribuição da frequência da criptosporidose tendo em conta aspectos demográficos, sociais e clínicos e quantificamos o grau de associação entre estes factores e a infecção. Nós encontramos que o risco de infecção foi 1.5 vezes mais alta entre crianças do sexo feminino quando comparada com a sua contra parte masculina, mas as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (feminino e masculino: 11.9% e 10.3%, respectivamente) ($p=0.67$). Esse resultado é similar ao reportado por vários autores, tanto em pesquisas de infecções por parasitos intestinais no geral (69,97–100) como na criptosporidose em particular (22,31,40,101); independentemente do desenho do estudo, ferramenta de diagnóstico usado e população alvo de estudo.

Cryptosporidium spp. partilha muitos aspectos do seu ciclo de vida com outros parasitos intestinais (12,102) colocando tanto o género masculino como o feminino em similar grau de risco de aquisição da infecção por enteroparasitos. Contrariamente ao reportado por Tumwine et al (2003), Gatei et al (2006) e Osman et al (2016) (22,31,40), a frequência da criptosporidose no presente estudo foi mais alta em crianças do sexo feminino, provavelmente porque a desidratação foi estatisticamente mais frequente em crianças do sexo feminino (61.2%, 82/134) em relação as crianças do sexo masculino (48.4%, 89/184) ($p=0.024$).

Em nosso modelo bivariado, a criptosporidose mostrou uma associação positiva com a idade, com crianças na faixa etária de 7 a 12, 13 a 18 e 25 a 60 meses apresentando um risco de infecção de 8.1, 11.9 e 15.5 vezes mais alto, respectivamente, quando comparados com os mais novos (0 a 6 meses), porém a significância desapareceu quando ajustado com potenciais factores de confusão. Resultados similares foram reportados por Mbae et al (2013) em Quênia (69), porém eles observaram uma associação inversa em crianças maiores de 24 meses. No entanto, um estudo caso-controlo conduzido por Tellevik et al (2015), em Dar es Salaam, Tanzânia (33), reportou uma associação inversa entre a criptosporidose e a faixa etária, segundo os quais crianças dos 7 a 12 meses tiveram maior risco de

infecção, porém sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos etários.

A alta frequência de criptosporidose observado entre crianças maiores de 6 meses de idade no presente estudo pode ser devida a forte associação observada entre a faixa etária e a dieta da criança ($p < 0.0001$), pois a introdução de diversos alimentos e a interrupção do aleitamento materno exclusivo inicia desde cedo, sendo a maioria das crianças maiores de 6 meses privados do leite materno, aumentando assim o risco de infecções parasitárias, incluindo infecção por espécies de *Cryptosporidium*. Adicionalmente, crianças mais velhas tendem a entrar mais em contacto com o solo e animais, explorando o ambiente domiciliar e peri domiciliar desde cedo antes da sua capacidade imunitária estar completa e matura, tornando-os mais susceptíveis.

Nós observamos uma associação positiva e estatisticamente significativa entre a criptosporidose e a faixa etária do cuidador. Nossos achados mostram que crianças cujos cuidadores tinham idade menor ou igual a 20 anos e entre 27 e 32 anos, o risco de infecção foi estimado em 8.9 e 4.4, respectivamente, quando comparadas com aquelas que estavam ao cuidado de pessoas com 33 anos ou mais. Embora nossos dados revelem que a escolaridade do cuidador decresce significativamente com a idade do mesmo, estes achados podem ser explicados, provavelmente porque pessoas mais velhas têm mais experiência no cuidado de saúde infantil que as mais novas.

Quando analisamos a questão educacional, encontramos que a educação formal do cuidador conferiu uma proteção para a aquisição da criptosporidose em cerca de 64.3%, o que era de esperar pois, estudos mostram que crianças que estão ao cuidado de pessoas com alguma educação formal têm menor risco de aquisição de certas infecções (33,55,103). Adicionalmente, no presente trabalho observou-se que quase todas crianças eram cuidadas pelos seus progenitores (92.1%, 292/319), maioritariamente com alguma formação formal (60.3%, 176/292), facto que pode ter contribuído bastante na redução do risco (38).

6.2 Exposição a água, alimentação e hábitos de higiene

Observou-se que crianças cujas famílias não tinham água canalizada no domicílio apresentavam maior frequência da criptosporidose e o nosso modelo multivariado mostrou uma associação positiva (ORa=1.665; $p=0.254$) entre a

aquisição da infecção e não ter água canalizada no domicílio. A revisão da literatura revela que a maioria dos surtos da criptosporidose a nível mundial, incluindo na Europa e Estados Unidos, tem sido através de fontes públicas de água principalmente quando contaminado com material fecal contendo oócistos de *Cryptosporidium* (12) embora o tratamento da água ofereça alguma proteção significativa contra a infecção por *Cryptosporidium* spp. (OR=0.83; 0.70-0.98) (74).

Segundo Koseck et al (2001), a fervura pode ser uma boa estratégia mas a água não fervida continua sendo largamente usada para lavagem de alimentos frescos e para escovar os dentes (12) e vários estudos ambientais têm reportado altas frequências de detecção de espécies de *Cryptosporidium* em lagos, água das chuvas e da rede pública porque os oócistos são resistentes a clorização (16,104,105) tornando o controlo desta infecção um interminável desafio principalmente quando as condições socioeconómicas são deficitárias.

Primeiramente nós observamos que a criptosporidose foi mais comum em crianças cuja dieta era composta por vários tipos de alimentos e privados do leite materno (13.8%), apresentando estes maior risco quando comparados com crianças que tinham aleitamento materno exclusivo (5.3%) (ORa=2.685, $p=0.038$); porém, quando ajustado com potências factores de confusão, esta categoria perdeu a significância estatística, mas crianças com aleitamento artificial tiveram um risco de aquisição da infecção de 8.8 vezes ($p=0.024$). Estes resultados são similares aos demonstrados por Tumwine et al (2003) os quais reportaram maior prevalência e risco infecções por *Cryptosporidium* spp. entre crianças que não faziam aleitamento materno (29.0%) contra aquelas que faziam aleitamento (26.4%), mas a diferença por eles observada não foi estatisticamente significativa ($p=0.217$) (22).

A diferença observada na frequência da criptosporidose em relação a dieta da criança no presente estudo, resulta provavelmente, da introdução de outros alimentos na dieta da criança desde cedo, visto que 70.4% (224/318) das crianças, das quais 34.9% (22/63) menores de 6 meses, estavam privados do aleitamento materno, podendo ter contribuído significativamente para alta taxa de exposição, baixa imunidade e alta taxa de desnutrição (52.3%, 79/151), conforme observado neste estudo, aumentando deste modo o risco de aquisição de infecções intestinais associadas a doenças diarreicas. Lembramos que Duedu et al (2014) mostrou o papel de vegetais frescos na transmissão da criptosporidose, com 16% de vegetais contaminados por oócistos de *Cryptosporidium* spp. (15).

Nos países subdesenvolvidos (38) as doenças diarreicas comumente atingem sua incidência máxima no segundo ano de vida, sobrepondo com a prática inadequada da desmamentação para a introdução precoce de alimentos externos e inadequados a idade da criança, factores que interagem com exposição ainda maior dos pupilos aos alimentos contaminados, falta de sanitários melhorados, pobre higiene pessoal e doméstico.

Surpreendentemente, não encontramos associação significativa entre a criptosporidose e a forma de despojo de dejectos bem como com o contacto animal. Este achado é similar aos achados reportados por um estudo de revisão sistemática e meta-análise, o qual reportou que a disponibilidade ou uso de sanitários melhorados não estava significativamente associada a infecção por *Cryptosporidium* spp. (OR=0.68, 0.17-2.68) (74) e vai de acordo com Tellevik e colegas (2015), os quais não encontraram associação significativa entre a infecção por espécies de *Cryptosporidium* com o contacto com animais (ORa=1.7, $p=0.43$) (33).

Por outro lado, a nossa análise bivariada mostrou que a estratificação do contacto animal em tipo de animal revelou maior risco (ORb=3.125, $p=0.046$) entre crianças que tiveram contacto concomitante com mamíferos e aves. O contacto com várias espécies de animais aumenta o risco de infecção por parasitos intestinais incluindo espécies de *Cryptosporidium*, visto que é um parasito com alto potencial zoonótico como já foi demonstrado por vários estudos (17,68,76,77,104,106).

6.3 Apresentação clínica

Embora não se tenha observado associação estatisticamente significativa entre criptosporidose e o estado nutricional dos pacientes (ORa=2.178, $p=0.177$), a alta frequência da criptosporidose em crianças desnutridas (15.2%, 12/79) pode ser explicada pelo facto de que 52.5% (32/61) ($p=0.926$) de crianças malnutridas no presente estudo estavam ao cuidado de pessoas sem educação formal e 52.9% (54/102) ($p=0.018$) sem aleitamento materno, pois está bem estabelecido que a educação maternal tem um efeito positivo na nutrição da criança em países em desenvolvimento porque na escola, as raparigas podem adquirir habilidades que no futuro são usados para acederem serviços de saúde modernos e compreenderem mensagens de saúde (103).

Por outro lado, Mor e Tzipori (2008) defendem que a criptosporidose está implicada com a diarreia e malnutrição em crianças mais novas nos países em

desenvolvimento mas os aspectos imunológicos que aumentam o risco de infecção em malnutridos ainda não estão bem definidos (25); porém sabe-se que capacidade defensiva do hospedeiro encontra-se alterada em condições de desnutrição pois a malnutrição (grave) impede o bom funcionamento do sistema imune e reduz a resistência contra infecções porque todas células de defesa do organismo incluindo seus produtos dependem das vias metabólicas que usam vários nutrientes para sua acção (107).

A frequência da infecção por espécies de *Cryptosporidium* entre pacientes VIH-positivos e VIH-negativos foi similar (9.8% vs 9.5%, $p=0.964$). Contrariamente ao observado no presente estudo, Mbae e colegas (2013) reportaram maior frequência de criptosporidose e um risco de infecção de até 3 vezes maior em crianças VIH-positivas quando comparadas com crianças VIH-negativas ($p<0.001$) (69); adicionalmente, Adamu et al (2013) reportaram prevalência significativamente mais elevada de criptosporidose em pacientes VIH-positivos que não estavam em Terapia Anti-retroviral com valores de células T CD4 abaixo de 200 células/ μ L (71).

A frequência de casos VIH-positivos no presente estudo (12.9%, 41/209) pode estar subestimada porque nem todos casos tinham informação sobre o estado serológico em relação ao VIH no processo clínico; adicionalmente, não temos informação sobre o grau de imunossupressão (contagem de células T CD4) dos casos VIH-positivos, mas nossos dados mostram que 87.5% (14/16) dos pacientes VIH-positivos apresentavam algum grau de desnutrição ($p=0.003$) e não faziam o aleitamento materno (aleitamento artificial e dieta diversificada) (87.8%, 31/41) ($p=0.027$), o que limita assim a interpretação das diferenças observadas; por outro lado, lembramos que a disponibilidade da Terapia Anti-retroviral imediatamente após o diagnóstico na infância é capaz de restaurar a capacidade imunológica destes pacientes e controlar infecções oportunistas como a infecção por *Cryptosporidium* spp. (1,108), isso pode ajudar a entender os nossos achados.

Dezanove casos não tiveram informação em relação a infecção por *Plasmodium* spp. A frequência de casos de malária no presente estudo foi de 6.0% (18/300) e destes apenas 2 casos (11.1%, 2/18) estavam co infectados por espécies de *Cryptosporidium*, esta frequência foi ligeiramente superior àquela observada entre casos sem malária (10.6%; 30/282) mas a diferença não foi estatisticamente significativa.

O impacto da malária na criptosporidose ainda não foi investigado em Moçambique, embora seja uma região com alta frequência da malária, VIH e malnutrição, que afecta principalmente crianças menores de 5 anos de idade (37,38,48,70,109) limitando assim a interpretação dos achados neste estudo. Embora tenha sido observado que 61.1% (11/18) de casos com malária eram menores de 12 meses e 58.3% (7/12) estavam desnutridos, 72.2% (13/18) relataram terem tido vômitos, 50.0% (9/18) com febre nas últimas 24 horas e desidratadas, todos receberam tratamento antibiótico e anti malárico antes da colheita da amostra, o que pode explicar estes resultados.

A frequência de criptosporidose foi mais alta entre pacientes que apresentaram pelo menos uma forma de afecção respiratória. A *chance* de infecção por *Cryptosporidium* spp. entre pacientes com afecções respiratórias aumentou de 3.0 para 3.9 quando foi ajustado com potenciais confundidores (ORa=3.876; 1.251-12.012, $p=0.019$). Evidências mostram que crianças com diarreia por *Cryptosporidium* têm mais *chances* de apresentarem sintomas respiratórios que crianças com diarreia por outros agentes etiológicos, sugerindo que a infecção respiratória por *Cryptosporidium* pode ser comum em pacientes imunocompetentes (44,47).

A alta frequência da criptosporidose entre crianças com sintomas respiratórios relatado no presente estudo pode se explicar pelo facto de a maioria deles 61.1% (11/18) estarem desnutridos no momento do inquérito e 5 estavam infectados por VIH, conferindo a este grupo um certo grau de imunodepressão, tornando-os mais susceptíveis à colonização do trato respiratório. A revisão da literatura revela que a criptosporidose respiratória ocorre principalmente em indivíduos com imunossupressão como uma complicação no último estágio da doença e evidências mostram que podem adquirir a infecção por inalação de gotículas de expectoração ou por contacto com fômites contendo oócistos do parasito (1).

A literatura aponta para além da diarreia, a anorexia, dor abdominal, febre e vômitos como os principais sintomas que mais acometem pacientes sofrendo de criptosporidose (12), tornando-se este quadro mais crónico e severo com a imunossupressão do hospedeiro, mas autolimitante a imunocompetentes (25,102).

Nós não encontramos associação significativa entre vômitos, febre e a infecção por espécies de *Cryptosporidium*, porém, a análise univariada mostrou que

criptosporidose foi significativamente mais comum em crianças desidratadas (15.2%, 26/171) quando comparada com crianças normalmente hidratadas (6.1%, 9/147) (ORa=2.749; 1.244-6.076, $p=0.012$). No modelo multivariado, as *chances* de uma criança, apresentando-se desidratada, estar infectada foi 4 vezes mais alta quando comparada com a sua contra parte (ORa=3.518; 0.906-13.663, $p=0.069$). A desidratação é uma consequência directa da perda de água principalmente por vômito e diarreia, os quais são por sua vez consequência da infecção (simples ou combinada). Crianças desidratadas tendem a perder peso e ficam imunologicamente fracas por perda de nutrientes importantes para o pleno funcionamento do sistema imunológico. Ali e colaboradores (2014) encontraram resultados similares em adultos imunocompetentes no Paquistão onde observaram forte associação com desidratação devida a alta frequência de vômitos e dejectões (42).

6.4 Detecção e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp.

Este é o primeiro estudo sobre a caracterização molecular de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* no município e cidade de Maputo. A identidade das espécies e caracterização dos genótipos de *Cryptosporidium* foi feita a partir de amostras fecais, combinando a técnica convencional (microscopia directa) e a técnica da PCR-RFLP baseado no gene SSU rRNA. Como era de esperar, a taxa de detecção foi mais alta quando usamos a técnica da PCR pois é mais sensível quando comparada com a microscopia, podendo detectar até cerca de 5×10^{-5} ng de ADN purificado de *Cryptosporidium* por reacção, correspondendo a aproximadamente um oócito (24,110,111).

As causas possíveis na falha de amplificação em 4 amostras inicialmente positivas por microscopia são várias; incluindo razões relacionadas ao protocolo da PCR, tais como inibição da reacção por impurezas presentes nas amostras e co purificadas com o ADN alvo. Outras podem estar ligadas ao procedimento da extração, como isolamento ou purificação ineficiente ou degradação de ADN alvo resultante de congelamento e descongelamento accidental das amostras durante o armazenamento (23,112).

Entre as 68 amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. por PCR convencional, vinte e nove amostras foram genotipadas com sucesso, das quais 27 (93.1%) foram positivas para *C. hominis*, 1 (3.45%) para *C. parvum* genótipo bovino

e uma infecção mista com *C. hominis* e *C. parvum* genótipo bovino (3.45%). À semelhança dos nossos achados, Sow et al (2016), usando a técnica da PCR em tempo real (RT-PCR, do acrónimo Real Time Polymerase Chain Reaction) em 3809 amostras de crianças menores de 24 meses com diarreia grave a moderada que participaram do GEMS (Global Enteric Multicenter Study), detectaram 77.8% de *C. hominis* e 9.9% de *C. parvum* entre os casos. A maioria (92%) dos isolados de *C. parvum* eram genótipos antroponóticos, dos quais 5 casos provenientes de Moçambique; os mesmos detectaram infecção mista por *C. parvum* e *C. hominis* em 1.2% e *C. meleagridis* em 0.6% das amostras positivas e espécies/genótipos de 35 amostras permaneceram indeterminadas (84).

Por outro lado, Tellevik e colegas (2015) detectaram *C. hominis* em 84,7% e *C. parvum* em 7,6% em 131 amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. em crianças menores de 24 meses de idade na Tanzânia (33). Em Quênia, um estudo de base hospitalar reportou 87% dos isolados de *Cryptosporidium* eram *C. hominis*, 9.0% eram *C. parvum* e 4.0% eram *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* e *C. muris* (31). Mais recentemente, no sul de Moçambique, um estudo de base hospitalar realizado em pacientes VIH-positivos com e sem tuberculose pulmonar, reportou que todos casos positivos (8.1%; 8/99) foram por *C. hominis* (108).

O achado deste estudo não difere do que era de esperar e é consistente com a revisão de estudos originais, os quais revelam que a infecção humana tem sido observada com mais de 15 espécies, mas a maioria das infecções tem sido mundialmente atribuída a *C. hominis* e *C. parvum* (17,24,60,81).

Dentre os pacientes que tiveram as vinte e nove amostras genotipadas, 16 (57.2%) relataram ter tido contacto com pelo menos um animal, incluindo 9 com mamíferos, 5 com mamíferos e aves, e 2 apenas com aves; todas amostras foram identificadas como *C. hominis*, excepto uma identificada como *C. parvum* genótipo bovino, o qual relatou contacto com gatos (mamífero).

Nosso protocolo não conseguiu determinar a espécie ou genótipo em 39 (57.4%) amostras positivas pela PCR convencional. Este resultado percentual é superior aos reportados por Tellevik et al. (2015) e Sow et al. (2016), os quais não conseguiram determinar a espécie de *Cryptosporidium* em 35 (10.5%) e 10 (7.6%) amostras positivas, respectivamente (33,84).

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Como acontece em todos os estudos, nós encontramos várias limitações no presente trabalho que precisam ser consideradas na interpretação dos resultados:

- 1) O nosso grupo amostral estava desigualmente distribuído nas categorias das variáveis estudadas;
- 2) A falta de informações nos processos clínicos limita a análise de dados, tornado o denominador não comum em várias análises estatísticas reduzindo assim a robustez dos mesmos;
- 3) Nós testamos amostras fecais em colheitas únicas para a detecção de espécies de *Cryptosporidium*, o que pode ter subestimado a frequência, pois um diagnóstico laboratorial de parasitos intestinais, incluindo *Cryptosporidium*, requer exame de pelo menos três amostras fecais colectados em vários dias;
- 4) Sendo um estudo de transversal de base hospitalar com amostragem não probabilística (casualística), este estudo tem a limitação de não poder traçar conclusões na casualidade de associações dos diferentes factores com a infecção por *Cryptosporidium* spp. e os resultados não podem ser extrapolados para a população no geral.

As amostras fecais examinadas neste trabalho foram colhidas após o início do tratamento “paliativo”, incluindo a reidratação oral e intravenosa, antibioterapia e terapia antiparasitária, podendo ter havido interferência destas drogas na detecção parasitária. Isso também resultou na obtenção de amostras com pouco volume, limitando deste modo múltiplas testagens em caso de necessidade de confirmação do resultado e como consequência, mais de 20% das amostras inicialmente positivas por microscopia óptica não foram incluídas nos testes moleculares.

Usamos apenas um locus genético, o que pode ter tornado nosso protocolo menos sensível e ou específico; adicionalmente, esse facto não permitiu subtipar os isolados obtidos, limitando assim a interpretação epidemiológica/clínica dos achados.

8 PERSPECTIVAS

Esta pesquisa levanta ideias interessantes de futuros trabalhos e linhas de pesquisa que possam enriquecer e ou ajudar a esclarecer os achados aqui obtidos, como por exemplo o uso simultâneo de vários marcadores genéticos para a detecção, genotipagem e subtipagem de isolados de espécies de *Cryptosporidium*; não só porque esta técnica aumenta a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, mas também vai ajudar na interpretação clínica e epidemiológica dos nossos achados.

Adicionalmente, pensa-se também em sequenciar e fazer uma análise filogenética deste parasito o que contribuiria de forma significativa no entendimento taxonómico, como também poderá esclarecer aspectos epidemiológicos (transmissão/disseminação) de *Cryptosporidium*.

9 CONCLUSÕES

Este estudo mostra que frequência de infecções por espécies de *Cryptosporidium* entre crianças hospitalizadas por diarreia aguda nos dois hospitais públicos da cidade de Maputo é alta.

Factores associados a infecção por espécies de *Cryptosporidium* são a faixa etária do cuidador da criança, a educação formal do cuidador da criança e a dieta da criança.

As afecções respiratórias são co-morbididades associadas a ocorrência das infecções por espécies de *Cryptosporidium* em crianças com diarreia.

A infecção foi causada maioritariamente por *C. hominis* e isto sugere predomínio de transmissão antroponótica.

10 RECOMENDAÇÕES

Adoção de estratégias preventivas com alvo na educação e melhoramento de higiene pessoal e nutricional para crianças pode reduzir em até mais de 60% de casos de infecções por espécies de *Cryptosporidium*.

Inclusão do teste de *Cryptosporidium* spp. em exame (de rotina) parasitológico de fezes para a detecção de oócistos em laboratórios clínicos de hospitais públicos, com especial atenção para crianças com diarreia aguda.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sponseller JK, Griffiths JK, Tzipori S. The Evolution of respiratory cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):575–86.
2. Organização Internacional das Epizootias. Cryptosporidiosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (Terrestrial Manual) [Internet]. 8th ed. World Organisation for Animal Health; 2016. p. 1192–215. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.04_CRYPT O.pdf
3. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012;59(5):429–514.
4. Cavalier-Smith T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of sporozoa. *Eur J Protistol.* 2014;50(5):472–95.
5. Ryan U, Papparini A, Monis P, Hijjawi N. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: what are the implications for the water industry? *Water Res.* 2016;105:305–13.
6. Clode PL, Koh WH, Thompson RCA. Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*? *Trends Parasitol.* 2015;31(12):614–24.
7. Rosales MJ, Cordon GP, Moreno MS, Sánchez CM, Mascaró C. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Trop.* 2005;95(1):74–8.
8. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* 2000;30(12):1305–1322.
9. Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* 2010;124(1):90–7.
10. Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Exp Biol Med.* 1907;5(1):12–13.
11. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology.* 1976;70(4):592–8.
12. Kosek M, Alcantara C, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: an update. *Infect Dis.* 2001;1:262–9.

13. Ryan U, Hijjawi N. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int J Parasitol.* 2015;45(6):367–73.
14. Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect Genet Evol.* 2016;40:315–23.
15. Duedu KO, Yarnie EA, Tetteh-Quarcoo PB, Attah SK, Donkor ES, Ayeh-Kumi PF. A comparative survey of the prevalence of human parasites found in fresh vegetables sold in supermarkets and open-aired markets in Accra, Ghana. *BMC Res Notes.* 2014;7(1):836.
16. Jiang J, Alderisio KA, Xiao L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(8):4446–54.
17. Xiao L, Ryan UM. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17(5):483–490.
18. Desai NT, Sarkar R, Kang G. Cryptosporidiosis: an under-recognized public health problem. *Trop Parasitol.* 2012;2(2):91–8.
19. Hofstra N, Vermeulen LC. Impacts of population growth, urbanisation and sanitation changes on global human *Cryptosporidium* emissions to surface water. *Int J Hyg Environ Health.* 2016;219(7):599–605.
20. Hofstra N, Bouwman AF, Beusen AHW, Medema GJ. Exploring global *Cryptosporidium* emissions to surface water. *Sci Total Environ.* 2013;442:10–9.
21. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet.* 2013;382:209–22.
22. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Rich SM, Widmer G, et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(6):710–715.
23. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis.* 2001;183(3):492–497.
24. Checkley W, White AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen X-M, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(1):85–94.

25. Mor SM, Tzipori S. Cryptosporidiosis in children in Sub-Saharan Africa: a lingering challenge. *Clin Infect Dis*. 2008;47(7):915–21.
26. Perch M, Sodemann M, Jakobsen MS, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Fischer TK, et al. Seven years' experience with *Cryptosporidium parvum* in Guinea-Bissau, West Africa. *Ann Trop Paediatr*. 2001;21(4):313–8.
27. Johansen ØH, Hanevik K, Thrana F, Carlson A, Stachurska-Hagen T, Skaare D, et al. Symptomatic and asymptomatic secondary transmission of *Cryptosporidium parvum* following two related outbreaks in schoolchildren. *Epidemiol Infect*. 2015;143(8):1702–9.
28. Thivierge K, Iqbal A, Dixon B, Dion R, Levesque B, Cantin P, et al. *Cryptosporidium hominis* is a newly recognized pathogen in the arctic region of Nunavik, Canada: molecular characterization of an outbreak. Woc Colburn L, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004534.
29. Tzipori S, Widmer G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol*. 2008;24(4):184–9.
30. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*. 1994 Jul 21;331(3):161–7.
31. Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, et al. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Quénia. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(1):78–82.
32. El-Badry AA, Al-Antably ASA, Hassan MA, Hanafy NA, Abu-Sarea EY. Molecular seasonal, age and gender distributions of *Cryptosporidium* in diarrhoeic egyptians: distinct endemicity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(12):2447–53.
33. Tellevik MG, Moyo SJ, Blomberg B, Hjøllø T, Maselle SY, Langeland N, et al. Prevalence of *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* among young children with and without diarrhea in Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10):e0004125.
34. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative.” *Trends Parasitol*. 2006;22(5):203–8.
35. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(2):225.

36. Clavero AO, Verdú ME, Pemán J, Dario R, Gobernado M. Human intestinal infection due to coccidia in Mozambique: two cases. *Acta Trop.* 1999;72(1):25–29.
37. Mandomando IM, Macete EV, Ruiz J, Sanz S, Abacassamo F, Valles X, et al. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(3):522–527.
38. Nhampossa T, Mandomando I, Acacio S, Quintó L, Vubil D, Ruiz J, et al. Diarrheal disease in rural Mozambique: burden, risk factors and etiology of diarrheal disease among children aged 0–59 months seeking care at health facilities. *PLoS ONE.* 2015;10(5):e0119824.
39. Cossa-Moiane ILC, Chilaule JJ, Cossa HFH, Cassocera M, Guimarrães E, De Deus N. Parasitic infections in children presenting with acute diarrhea in Mozambique: national surveillance data (2013 – 2015). In: 17th International Congress on Infectious Diseases [Internet]. Hyderabad, India: International Journal of Infectious Diseases; 2016. p. 1–477. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971216307469>
40. Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004496.
41. Snelling WJ, Xiao L, Ortega-Pierres G, Lowery CJ, Moore JE, Rao JR, et al. Cryptosporidiosis in developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 2007;1(3):242–256.
42. Ali S, Mumar S, Kalam K, Raja K, Baqi S. Prevalence, clinical presentation and treatment outcome of cryptosporidiosis in immunocompetent adult patients presenting with acute diarrhoea. *J Pak Med Assoc.* 2014;64(6):613–618.
43. Chalmers RM, Davies AP. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol.* 2010;124(1):138–46.
44. Egger M, Mäusezahl D, Odermatt P, Marti HP, Tanner M. Symptoms and transmission of intestinal cryptosporidiosis. *Arch Dis Child.* 1990;65(4):445–447.
45. Gendrel D, Treluyer JM, Richard-Lenoble D. Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17(2):189–197.

46. Mondal D, Haque R, Sack RB, Kirkpatrick BD, Petri WA. Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of preschool children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(5):824–826.
47. Mäusezahl D, Egger M, Odermatt P, Tanner M. Clinical aspects and epidemiology of cryptosporidiosis in immunocompetent children. *Schweiz Rundsch Med Prax Rev Suisse Med Prax.* 1991;80(37):936–40.
48. Bassat Q, Guinovart C, Sigaúque B, Aide P, Sacarlal J, Nhampossa T, et al. Malaria in rural Mozambique. Part II: children admitted to hospital. *Malar J.* 2008;7(1):37.
49. Bessoff K, Spangenberg T, Foderaro JE, Jumani RS, Ward GE, Huston CD. Identification of *Cryptosporidium parvum* active chemical series by repurposing the open access malaria box. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2731–9.
50. Caulfield LE, de Onis M, Blössner M, Black RE. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(1):193–198.
51. Miller JM, Boyd HA, Ostrowski SR, Cookson ST, Parise ME, Gonzaga PS, et al. Malaria, intestinal parasites, and schistosomiasis among Barawan Somali refugees resettling to the United States: a strategy to reduce morbidity and decrease the risk of imported infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(1):115–121.
52. Striepen B. Comment: time to tackle cryptosporidiosis. *Nature.* 2013;503:189–91.
53. Centers for Disease Control and Prevention. Stool specimens: specimen collection for molecular diagnosis [Internet]. DPDx - laboratory identification of parasitic diseases of public health concern. 2014 [cited 2016 Jun 28]. Available from: <http://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/stool/moleculardx.html>
54. Neves DP, Melo AL de, Linardi PM, Victor RWA. *Parasitologia humana*. 11^a ed. São Paulo: Atheneu; 2004. 494 p.
55. Becker DJ, Oloya J, Ezeamama AE. Household socioeconomic and demographic correlates of *Cryptosporidium* seropositivity in the United States. Lammie PJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9):e0004080.

56. Mirhashemi ME, Zintl A, Grant T, Lucy FE, Mulcahy G, De Waal T. Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Exp Parasitol.* 2015;151–152:14–20.
57. Morgan f U, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RCA. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):995–998.
58. Omoruyi B, Nwodo U, Udem C, Okonkwo F. Comparative diagnostic techniques for *Cryptosporidium* infection. *Molecules.* 2014;19(2):2674–83.
59. Organização Mundial de Saúde. Basic laboratory methods in medical parasitology. *Parasitology-laboratory manuals.* Geneva: WHO; 1991. 61 p.
60. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol.* 2010;124(1):80–9.
61. Centers for Disease Control and Prevention. *Cryptosporidium* treatment [Internet]. Treatment | *Cryptosporidium* | Parasites | CDC. 2016 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/treatment.html>
62. AIDSinfo. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections among HIV-exposed and HIV-infected children [Internet]. AIDSinfo; 2016 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>
63. Pozio E. Highly active antiretroviral therapy and opportunistic protozoan infections. *Parassitologia.* 2004;46(1–2):89–93.
64. Prüss A, Kay D, Fewtrell L, Bartram J, others. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. *Environ Health Perspect.* 2002;110(5):537–542.
65. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet.* 2012;379(9832):2151–2161.
66. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet.* 2014;385:430–40.
67. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE, WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *The Lancet.* 2005;365(9465):1147–1152.
68. Akinbo FO, Okaka CE, Omoregie R. Prevalence of intestinal parasitic infections among HIV patients in Benin city, Nigeria. *Libyan J Med.* 2010;5(0):5506.

69. Mbae CK, Nokes DJ, Mulinge E, Nyambura J, Waruru A, Kariuki S. Intestinal parasitic infections in children presenting with diarrhoea in outpatient and inpatient settings in an informal settlement of Nairobi, Quénia. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):243.
70. De Schacht C, Mabunda N, C Ferreira O, Ismael N, Calú N, Santos I, et al. High HIV incidence in the postpartum period sustains vertical transmission in settings with generalized epidemics: a cohort study in Southern Mozambique. *J Int AIDS Soc.* 2014;17(1):18808.
71. Adamu H, Wegayehu T, Petros B. High prevalence of diarrhoeagenic intestinal parasite infections among non-ART HIV patients in Fitcha Hospital, Ethiopia. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e72634.
72. Missaye A, Dagne M, Alemu A, Alemu A. Prevalence of intestinal parasites and associated risk factors among HIV/AIDS patients with pre-ART and on-ART attending dessie hospital ART clinic, Northeast Ethiopia. *AIDS Res Ther.* 2013;10:7.
73. Teklemariam Z, Abate D, Mitiku H, Dessie Y. Prevalence of intestinal parasitic infection among HIV positive persons who are naive and on antiretroviral treatment in Hiwot Fana Specialized University hospital, Eastern Ethiopia. *Hindawi Publ Corp.* 2013;2013:1–6.
74. Speich B, Croll D, Fürst T, Utzinger J, Keiser J. Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(1):87–99.
75. Aldeyarbi HM, El-Ezz NMTA, Karanis P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: the African perspective. *Environ Sci Pollut Res.* 2016;23(14):13811–21.
76. Daly RF, Hill NT. Characterizing the role of animal exposures in cryptosporidiosis and shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections: South Dakota, 2012. *Zoonoses Public Health.* 2016;63(6):467–76.
77. Kimani VN, Mitoko G, McDermott B, Grace D, Ambia J, Kiragu MW, et al. Social and gender determinants of risk of cryptosporidiosis, an emerging zoonosis, in Dagoretti, Nairobi, Quénia. *Trop Anim Health Prod.* 2012;44(1):17–23.
78. Thompson RCA, Palmer CS, O’Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J.* 2008;177(1):18–25.

79. Pierce KK, Kirkpatrick BD. Update on human infections caused by intestinal protozoa: Curr Opin Gastroenterol. 2009;25(1):12–7.
80. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ. 2003;81(3):197–204.
81. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev. 2004;17(1):72–97.
82. Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. Microbes Infect. 1999;1(2):141–148.
83. Abu Samra N, Thompson PN, Jori F, Freaan J, Poonsamy B, du Plessis D, et al. Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. in diarrhoeic children from four provinces in South Africa. Zoonoses Public Health. 2013;60(2):154–9.
84. Sow SO, Muhsen K, Nasrin D, Blackwelder WC, Farag TH, Panchalingam S, et al. The burden of *Cryptosporidium* diarrheal disease among children <24 months of age in moderate/high mortality regions of sub-Saharan Africa and South Asia, utilizing data from the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(5):e0004729.
85. Deus ND, Chilaúle J, Bero DM, Langa JP, Pinto F, Moiane I, et al. Vigilância nacional de diarreias agudas em crianças. Maputo; 2013.
86. Organização Mundial de Saúde. WHO child growth standards. Training course on child growth assessment. Module B: measuring a child's growth [Internet]. Geneva: WHO; 2008. 47 p. Available from: <http://www.who.int/childgrowth/training/en/>
87. Organização Mundial de Saúde. WHO child growth standards. Training course on child growth assessment. Module C: Interpreting growth indicators [Internet]. Geneva: WHO; 2008. Available from: <http://www.who.int/childgrowth/training/en/>
88. Organização Mundial de Saúde. Bench Aids for the diagnosis of intestinal parasites [Internet]. 4th Edition. Geneva: WHO; 1994. 21 p. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37323/1/9789241544764_eng.pdf
89. Plutzer J, Karanis P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. Vet Parasitol. 2009;165(3–4):187–99.

90. Ruecker NJ, Hoffman RM, Chalmers RM, Neumann NF. Detection and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(12):3998–4007.
91. Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, van Rooyen MAA, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):1220–3.
92. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-Subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(4):1578–1583.
93. Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, et al. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(8):3386–3391.
94. Xiao L, Moore JE, Ukoh U, Gatei W, Lowery CJ, Murphy TM, et al. Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in Pig Slurry. *Res Gate.* 2006;72(6):4461–3.
95. Zhang W, Yang F, Liu A, Wang R, Zhang L, Shen Y, et al. Prevalence and genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned and post-weaned Piglets in Heilongjiang province, China. *Res Gate.* 2013;8(7):e67564.
96. Eibach D, Krumkamp R, Al-Emran HM, Sarpong N, Hagen RM, Adu-Sarkodie Y, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. among children in rural Ghana. *PLoS Negl Trop.* 2016;9(3):1–12.
97. Augusto G, Nala R, Casmo V, Sabonete A, Mapaco L, Monteiro J. Geographic distribution and prevalence of schistosomiasis and soil-transmitted helminths among schoolchildren in Mozambique. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(5):799–803.
98. Cardona GA, Carabin H, Goñi P, Arriola L, Robinson G, Fernández-Crespo JC, et al. Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *Sci Total Environ.* 2011;412–413:101–8.
99. Mehraj V, Hatcher J, Akhtar S, Rafique G, Beg MA. Prevalence and factors associated with intestinal parasitic infection among children in an urban slum of Karachi. Sutherland CJ, editor. *PLoS ONE.* 2008;3(11):e3680.

100. Ngui R, Ishak S, Chuen CS, Mahmud R, Lim YAL. Prevalence and risk factors of intestinal parasitism in rural and remote West Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e974.
101. Izadi M, Jonaidi-Jafari N, Saburi A, Eyni H, Rezaeiemanesh M-R, Ranjbar R. Prevalence, molecular characteristics and risk factors for cryptosporidiosis among Iranian immunocompromised patients: cryptosporidiosis and immunodeficiency. *Microbiol Immunol*. 2012;56(12):836–42.
102. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect*. 2002;4(10):1047–1058.
103. Moestue H, Huttly S. Adult education and child nutrition: the role of family and community. *J Epidemiol Community Health*. 2008;62(2):153–9.
104. Daniels ME, Shrivastava A, Smith WA, Sahu P, Odagiri M, Misra PR, et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* in humans, domestic animals, and village water sources in rural India. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(3):596–600.
105. Dreelin EA, Ives RL, Molloy S, Rose JB. *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water: A case study from Michigan, USA to inform management of rural water systems. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(10):10480–503.
106. Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect*. 2004 Jul;6(8):773–85.
107. Anabwani G, Navario P. Nutrition and HIV/AIDS in sub-Saharan Africa: an overview. *Nutrition*. 2005;21(1):96–9.
108. Irisarri-Gutiérrez MJ, Mingo MH, de Lucio A, Gil H, Morales L, Seguí R, et al. Association between enteric protozoan parasites and gastrointestinal illness among HIV- and tuberculosis-infected individuals in the Chowke district, southern Mozambique. *Acta Trop*. 2017;170:197–203.
109. Nhampossa T, Sigaúque B, Machevo S, Macete E, Alonso P, Bassat Q, et al. Severe malnutrition among children under the age of 5 years admitted to a rural district hospital in southern Mozambique. *Public Health Nutr*. 2013;16(9):1565–74.
110. Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1017–23.

111. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):511–32.
112. Hawash Y. DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. Korean J Parasitol. 2014;52(3):263–71.

APÊNDICE

1 APÊNDICE A

Tabela 10. Associação entre variáveis clínico-epidemiológicas dos pacientes (χ^2 , p).

Variáveis	F.E. Criança	F.E. Cuidador	Educação	Fonte de água	Sanitários	Alimentação	A. respiratórias	Desidratação	Nutrição
F.E. Criança	NA	18.034 (0.115)	3.734 (0.443)	1.711 (0.791)	5.523 (0.238)	45.609 (0.000)	5.747 (0.188)	6.400 (0.171)	6.414 (0.167)
F.E. Cuidador	18.034 (0.115)	NA	28.201 (0.000)	0.259 (0.968)	2.255 (0.521)	22.661 (0.001)	3.571 (0.312)	7.609 (0.055)	1.285 (0.733)
Educação	3.734 (0.443)	28.201 (0.000)	NA	0.699 (0.403)	23.465 (0.000)	4.928 (0.085)	3.926 (0.048)	0.146 (0.702)	0.009 (0.926)
Fonte de água	1.711 (0.791)	0.259 (0.968)	0.699 (0.403)	NA	0.387 (0.534)	1.127 (0.562)	1.999 (0.228)	6.446 (0.011)	0.054 (0.817)
Sanitários	5.523 (0.238)	2.255 (0.521)	23.465 (0.000)	0.387 (0.534)	NA	4.781 (0.092)	1.871 (0.171)	0.009 (0.925)	1.348 (0.246)
Alimentação	45.609 (0.000)	22.661 (0.001)	4.928 (0.085)	1.127 (0.562)	4.781 (0.092)	NA	3.440 (0.156)	11.545 (0.003)	8.191 (0.018)
A. respiratórias	5.747 (0.188)	3.571 (0.312)	3.926 (0.048)	1.999 (0.228)	1.871 (0.171)	3.440 (0.156)	NA	0.328 (0.567)	0.630 (0.427)
Desidratação	6.400 (0.171)	7.609 (0.055)	0.146 (0.702)	6.446 (0.011)	0.009 (0.925)	11.545 (0.003)	0.328 (0.567)	NA	5.499 (0.019)
Nutrição	6.414 (0.167)	1.285 (0.733)	0.009 (0.926)	0.054 (0.817)	1.348 (0.246)	8.191 (0.018)	0.630 (0.427)	5.499 (0.019)	NA

F.E – Faixa Etária, A. Respiratórias – Afecções respiratórias, NA – Não aplicável, Nutrição – estado nutricional, Sanitários – tipo de sanitários

Antes da análise multivariada, nos verificamos se as nossas variáveis clínico-epidemiológicas (faixa etária da criança, faixa etária do cuidador, educação formal, fonte de água, tipo de sanitários, alimentação da criança, afecções respiratórias desidratação e estado nutricional) apresentavam forte associação uma com a outra. Porque cada uma das variáveis era categórica, nós quantificamos a força da associação usando o teste de Qui-quadrado de Pearson. Este teste demonstrou vários graus de associação entre as variáveis, e assim, o efeito de cada uma na infecção por espécies de *Cryptosporidium* foi considerada em modelos multivariado tendo em conta a interação entre elas, incluindo variáveis com indicio de alguma associação ($p < 0.20$).

2 APÊNDICE B

Tabela 11. Distribuição das variáveis quantitativas categorizadas segundo a proveniência (Unidades Sanitárias).

Características da Criança	Total % (n)	Proveniência		Valor de p
		HG-Mavalane % (n)	HG-José Macamo % (n)	
Idade da criança (meses) (n=319)				
Mediana (IQR)	11.0 (7 – 15)	11 (7.0 – 15.0)	11.0 (7.0– 15.0)	0.694 ^u
Idade do cuidador (anos) (n=306)				
Mediana (IQR)	25.5 (21 – 31)	25 (21 – 32)	26.0 (21 - 31)	0.951 ^u

^uZ-score de U (Mann-Whitney Wilcoxon Rank-Sum Test)

Tabela 12. Relação das espécies de animais e sua distribuição segundo a proveniência das crianças.

Espécies de Animais	Total		Proveniência			
			HG-Mavalane		HG-José Macamo	
	n	%	n	%	n	%
Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)	29	23.4	14	22.22	15	24.59
Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	74	59.7	33	52.38	41	67.21
Porco doméstico (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	4	3.2	3	4.76	1	1.64
Cabrito (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	3	2.4	0	0.00	3	4.92
Vaca (<i>Bos taurus</i>)	2	1.6	1	1.59	1	1.64
Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	1	0.8	0	0.00	1	1.64
Aves ^a	45	36.3	30	47.62	15	24.59
Total de casos	124	38.9	63	78.12	61	49.19

^aPato, galinha (*Gallus gallus domesticus*), pombo (*Columba livia*).

Tabela 13. Associação entre idade da criança e idade do cuidador com infecção por espécies de *Cryptosporidium* em crianças admitidas com diarreia aguda admitidas no HG-Mavalane e HG-José Macamo, análise univariada (Abril de 2015 a Fevereiro de 2016).

Características	<i>Cryptosporidium</i> spp. (+)		
	Coef B	S.E.	Valor de p
Idade da criança (meses) (n=319)	0.032	0.018	0.069
Idade do cuidador (anos) (n=306)	0.054	0.029	0.065

Coef. B – Coeficiente B; S.E – Erro padrão.

3 APÊNDICE C

Tabela 14. Distribuição das crianças participantes no presente estudo, segundo o local de residência e Unidade Sanitária de hospitalização (Fisher's Exact Test = 294.069, p <0.00001).

Residência	Total N (%)	Proveniência	
		HG-Mavalane n (%)	HG-José Macamo n (%)
Distritos Municipais do Município de Maputo			
KaMaxaqueni	67 (21,0)	66 (98,5)	1 (1,5)
KaMubukwana	68 (21,3)	11 (16,2)	57 (83,8)
KaMavota	71 (22,3)	70 (98,6)	1 (1,4)
KaMpfumo	2 (0,6)	0 (0,0)	2 (100)
NIhamankulu	23 (7,2)	1 (4,3)	22 (95,7)
Marracuene	3 (0,9)	2 (66,7)	1 (33,3)
Município da Matola (Maputo Província)	80 (25,1)	6 (7,5)	74 (92,5)
Distrito de Moamba (Maputo Província)	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (100)
Distrito de Boane (Maputo Província)	4 (1,2)	0 (0,0)	4 (100)
Total	319 (100)	156 (48,9)	163 (51.1)

4 APÊNDICE D

Tabela 15. Distribuição de casos analisados por PCR convencional para detecção de espécies de *Cryptosporidium*.

Características dos pacientes	PCR convencional		χ^2 (valor de p)
	Não % (n)	Sim % (n)	
Género			
Feminino	40.0 (54)	60.0 (81)	0.003 (0.953)
Masculino	39.7 (73)	60.3 (111)	
Faixa etária da criança			
0 - 6 Meses	50.8 (32)	49.2 (31)	5.931 (0.204)
7 – 12 Meses	38.5 (50)	61.5 (80)	
13 – 18 Meses	38.3 (31)	61.7 (50)	
19 – 24 Meses	36.7 (11)	63.3 (19)	
25 - 60 Meses	20.0 (3)	80.0 (12)	
Faixa etária do cuidador			
≤ 20 Anos	33.3 (19)	66.7 (38)	3.675 (0.299)
21 - 26 Anos	37.3 (41)	62.7 (69)	
27 - 32 Anos	38.2 (29)	61.8 (47)	
≥ 33 Anos	49.2 (310)	50.8 (32)	
Educação formal			
Sim ^a	41.1 (76)	58.9 (109)	0.241 (0.623)
Não ^b	38.3 (51)	61.7 (82)	
Fonte de água			
Canalizada	39.6 (108)	60.4 (165)	0.114 (0.736)
Outras Fontes	42.2 (19)	57.8 (26)	
Alimentação			
Leite materno	47.9 (45)	52.1 (49)	6.358 (0.042)*
Leite artificial	50.0 (14)	50.0 (14)	
Outros alimentos	34.2 (67)	65.8 (129)	
Sanitários			
Com fossa séptica	42.4 (81)	57.6 (110)	3.775 (0.052)
Latrina	31.4 (37)	68.6 (81)	
Contacto animal			
Não	43.1 (84)	56.9 (111)	2.232 (0.135)
Sim	34.7 (43)	65.3 (81)	
Tipo de animal			
Mamífero ^c	35.4 (28)	64.6 (51)	1.173 (0.556)
Mamífero e Aves	42.1 (8)	57.9 (11)	
Aves ^d	26.9 (7)	73.1 (19)	

n – número de participantes, **p** – valor de p pelo teste de χ^2 de Pearson, ^a Tem no mínimo o nível secundário ou ensino técnico; ^b Não estudou ou frequentou a escola até ao nível primário; ^c Cão, gato, porco, cabrito, boi; ^d Pato, galinha, pombo. *Diferenças significativas pelo teste χ^2 ($p \leq 0.05$)

5 APÊNDICE E

Tabela 16. Distribuição de casos analisados por PCR convencional para detecção de espécies de *Cryptosporidium*.

Características dos pacientes	PCR convencional		χ^2 (valor de p)
	Não % (n)	Sim % (n)	
Estado nutricional			
Normal	31.9 (23)	68.1 (49)	0.873
Desnutridos	38.2 (31)	60.8 (48)	(0.350)
VIH			
Positivo	24.4 (10)	54.2 (31)	6.236
Negativo	45.8 (77)	54.2 (91)	(0.013)*
<i>Plasmodium</i> spp.			
Positivo	44.4 (8)	55.6 (10)	0.134
Negativo	40.1 (113)	59.9 (169)	(0.714)
Afecções respiratórias			
Sim	32.0 (8)	68.0 (17)	0.838
Não	41.4 (1130)	58.6 (160)	(0.360)
Vômito			
Sim	39.1 (63)	60.9 (98)	0.119
Não	41.0 (64)	59.0 (92)	(0.731)
Febre			
Sim	45.1 (41)	54.9 (50)	1.573
Não	37.4 (85)	62.6 (142)	(0.210)
Desidratação			
Sim	43.9 (75)	56.1 (96)	2.373
Não	35.4 (52)	64.6 (95)	(0.123)

*Diferenças significativas pelo teste χ^2 ($p \leq 0.05$)