

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

ÉRICA BOARATO DAVID

**Genotipagem dos isolados de *Giardia duodenalis* de
humanos e de cães na colônia de pescadores de Porto
Said, Botucatu, São Paulo.**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em Doenças
Tropicais.

**Orientadora: Profa. Dra. Semíramis Guimarães Ferraz Viana
Coorientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina G. Oliveira-Sequeira**

Botucatu

ÉRICA BOARATO DAVID

Genotipagem dos isolados de *Giardia duodenalis* de humanos e de cães na colônia de pescadores de Porto Said, Botucatu, São Paulo.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Coorientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina G. Oliveira-Sequeira

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

David, Érica Boarato.

Genotipagem dos isolados de *Giardia duodenalis* de humanos e de cães na colônia de pescadores de Porto Said, Botucatu, SP / Érica Boarato David. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Coorientador: Teresa Cristina Goulart Oliveira-Sequeira

Capes: 40101096

1. Água - Amostragem. 2. Protozoário. 3. Medicina tropical. 4. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Amostra de água; Caracterização molecular; Isolado de cão; Isolado humano; Protozoários intestinais.



Dedicatória

Aos meus pais Manoel e Rosa, que sempre me apoiaram e me ensinaram princípios para que eu me tornasse uma pessoa de bem.

Ao meu irmão Richard, pela amizade e afeto.

Ao Danilo, que com o seu amor, companheirismo e otimismo tornou-se uma pessoa indispensável em minha vida.

À Deus por tudo que representa em minha vida.





Agradecimentos

Agradeço especialmente a Profa Dra Semíramis Guimarães Ferraz Viana e a Profa Dra Teresa Cristina G. Oliveira-Sequeira que sempre foram muito éticas, competentes e amigas, e que há 10 anos me acolheram em seus laboratórios e dividiram seus conhecimentos em parasitologia, o que me proporcionou uma valiosa experiência acadêmica.

Dep. de Parasitologia/IB/Botucatu

Prof. Dr. Paulo Eduardo M. Ribolla

Ana Paula de Oliveira Arbex

Gabriela Nogueira Bittencourt

Patrícia Ap. Borim

Pós-graduandos

Funcionários

Amigos e alunos

Unicamp/ Campinas

Profa. Dra. Regina Maura B. Franco

Ms. Ana Rita Moraes Nardi

Técnico Ms Nilson Branco

Istituto Superiore di Sanità/Roma

Dr. Simone Mario Cacciò

Dr. Fabio Tosini

Dr. Edoardo Pozio

Dr. Antonino Bella

Seção Técnica de P. Graduação/FMB

FAPESP

Auxílio à pesquisa (2011/52100-3)

Bolsa doutorado (2011/0996-3)

Bolsa BEPE (2013/13940-1)



SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Capítulo I

1. Revisão de literatura	10
1.1 Infecções por protozoários intestinais e relevância em saúde pública	10
1.2 Aspectos gerais sobre <i>Giardia</i>	13
1.3 Aspectos gerais sobre <i>Blastocystis</i>	16
1.4 Aspectos gerais sobre <i>Dientamoeba fragilis</i>	21
1.5 Aspectos gerais sobre <i>Cryptosporidium</i>	23
1.6 Caracterização molecular de <i>Giardia duodenalis</i> , <i>Blastocystis</i> spp, <i>Dientamoeba fragilis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp.: fatos e questões	26
1.5.1 <i>Giardia duodenalis</i>	28
1.5.2 <i>Blastocystis</i> spp	33
1.5.3 <i>Dientamoeba fragilis</i>	36
1.5.4 <i>Cryptosporidium</i> spp	37
2. Justificativa	42
3. Objetivos	44
4. Referências	45

Capítulo II

5. Artigo “ Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil.”	55
Background	57
Methods	58
Results	62
Discussion	67

References	73
Tables	80
Figure	86
6. Conclusões	87

RESUMO

Muitas espécies de protozoários podem causar gastroenterite aguda ou crônica em seres humanos e são altamente prevalentes nas populações residentes nos países em desenvolvimento, onde a transmissão é favorecida devido a condições precárias de higiene e escassa disponibilidade de água potável. No entanto, a infecção assintomática e o poliparasitismo também são comumente observados nessas populações. Neste trabalho, investigou-se a prevalência de protozoários intestinais em duas colônias de pescadores, Porto Said (PS) e Santa Maria da Serra (SM), situadas ao longo do rio Tietê, no Estado de São Paulo. As colônias não dispõem de serviços públicos básicos como: vias públicas, fornecimento de água e luz e saneamento básico. Todos os colonos (n = 88 em PS, e n = 38 em SM) coletaram três amostras de fezes, e todos eram assintomáticos no momento da coleta. Para obter informações sobre as possíveis vias de transmissão, amostras fecais de 49 cães (38 de PS e 11 de SM) e 28 amostras de água do rio foram coletadas (16 de PS e 12 de SM). As amostras fecais humanas e caninas foram analisadas por microscopia e PCR para detectar e caracterizar os protozoários *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis* e *Cryptosporidium* spp. Diante dos resultados obtidos, *Blastocystis* spp. foi o parasita mais prevalente nas amostras humanas (45,4% em PS e 71% em SM), seguido por *D. fragilis* (13,6% em PS e 18,4% em SM) e *G. duodenalis* (18,2% em PS e 7,9% em SM), já *Cryptosporidium* spp. não foi detectado na população humana. Além disso, *G. duodenalis* foi detectado em quatro cães (10,5% em PS e dois cães (18,2%) em SM, enquanto que um único cão foi detectado com *Cryptosporidium canis*. Nas 28 amostras de água previamente processadas pelos métodos de filtração e separação imunomagnética e examinadas por microscopia de fluorescência, oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* não foram detectados. O sequenciamento da região *barcoding* do gene SSUrDNA revelou grande variação genética entre os isolados de *Blastocystis*, e os subtipos (STS) mais comuns foram ST3 (43,3%) e ST1 (34,3%), enquanto ST2 (10,4%) e ST7 (6,0%) foram detectados

em menor frequência. Foram identificadas infecções mistas com alelos múltiplos, ou com diferentes STs em oito isolados (11,9%). Para *D. fragilis* todos os isolados foram caracterizados como genótipo 1. Entre os isolados de *G. duodenalis*, foram encontrados os genótipos A (52,6%) e B (47,4%) em humanos, enquanto que nos cães foram encontrados os genótipos A (50,0%), C (33,3%) e D (16,6 %). Este estudo confirmou que os indivíduos assintomáticos em áreas desprovidas de infraestrutura básica albergam vários parasitas intestinais, e sugerem que a transmissão antroponótica é a predominante.

ABSTRACT

Several species of protozoa cause acute or chronic gastroenteritis in humans, worldwide. The burden of disease is particularly high among children living in developing areas of the world, where transmission is favored by lower hygienic standards and scarce availability of safe water. However, asymptomatic infection and polyparasitism are also commonly observed in poor settings. Here, we investigated the prevalence of intestinal protozoa in two small fishermen villages, Porto Said (PS) and Santa Maria da Serra (SM), situated along the river Tietê in the State of São Paulo, Brazil. The villages lack basic public infrastructures and services, such as roads, public water supply, electricity and public health services. Multiple fecal samples were collected from 88 individuals in PS and from 38 individuals in SM, who were asymptomatic at the time of sampling and had no recent history of diarrheal disease. To gain insights into potential transmission routes, 49 dog fecal samples (38 from PS and 11 from SM) and 28 river water samples were also collected. All samples were tested by microscopy and PCR was used to genotype isolates of *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis* and *Cryptosporidium* spp. By molecular methods, the most common human parasite was *Blastocystis* spp. (prevalence, 45% in PS and 71% in SM), followed by *D. fragilis* (13.6% in PS, and 18.4% in SM) and *G. duodenalis* (18.2% in PS and 7.9% in SM); *Cryptosporidium* spp. were not detected. Further, *G. duodenalis* was found in 4 dogs (10.5%) in PS and 2 dogs (18.2%) in SM, whereas a single dog was found infected with *Cryptosporidium canis*. River water samples processed by filtration and immunomagnetic separation and examined by fluorescent microscopy, were negative for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. Sequencing of the barcoding region of the small subunit ribosomal gene revealed large genetic variation among *Blastocystis* isolates, with subtypes (STs) that the most common were ST3 (43.3%) and ST1 (34.3%), whereas ST2 (10.4%) and ST7 (6%) were found at a lower frequency. Mixed infections with multiple alleles of one ST, or with different STs were identified in 8 isolates (11.9%). Among *G. duodenalis* isolates,

assemblages A (52.6%) and B (47.4%) were detected in humans, whereas assemblages A (50%), C (33.3%) and D (16.6%) were found in dogs. Finally, all *D. fragilis* isolates from humans were genotype 1. This study confirmed that asymptomatic individuals in poor areas are carriers of multiple intestinal parasites, and suggest that human-to-human is the predominant transmission route.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Infecções por protozoários intestinais e relevância em Saúde Pública

Ao longo do tempo, as infecções causadas por parasitas têm contribuído significativamente para o aumento das doenças infecciosas em todo o mundo. Dentre as doenças parasitárias, destacam-se as infecções causadas por parasitas entéricos, também denominadas enteroparasitoses. Muito embora as enteroparasitoses representem um problema à saúde humana, ainda são enfermidades negligenciadas, pois frequentemente estão associadas à pobreza e às precárias condições sanitárias, prevalentes em países socioeconomicamente menos favorecidos (STEPHENSON, et al., 2000).

As enteroparasitoses que afetam milhões de pessoas no mundo têm como agentes etiológicos alguma espécie de helminto e/ou protozoário gastrointestinal. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças gastrointestinais responsáveis por causar distúrbios entéricos, têm afetado mais pessoas do que qualquer outra doença (WHO, 2008). Apesar do agente etiológico, a disseminação das infecções gastrointestinais está associada, principalmente, ao contato pessoa a pessoa, por meio das mãos sujas, ou indiretamente por meio de fômites ou da ingestão de água e alimentos contaminados (FLETCHER et al., 2012).

Especialmente no que se refere aos protozoários, o ser humano pode ser o hospedeiro de diferentes espécies que colonizam o trato intestinal, incluindo organismos patogênicos ou não. Atualmente, estima-se que, por ano, mais de 58 milhões de infecções envolvendo protozoários intestinais ocorram no mundo, inclusive nos países desenvolvidos, onde se destacam como os parasitas mais frequentemente observados nos exames parasitológicos de fezes (Mc HARDY et al., 2014). Entretanto, ainda hoje, a ocorrência dessas infecções é diretamente influenciada pelo nível

socioeconômico e pelas condições de saneamento básico em que vivem as populações (ESCOBEDO et al., 2007).

No que diz respeito às espécies de protozoários reconhecidas como patogênicas, a infecção causada por esses parasitas pode estar associada a doenças diarreicas agudas ou crônicas, inclusive em indivíduos saudáveis. No entanto, em alguns casos, podem determinar quadros debilitantes graves, particularmente em crianças e indivíduos imunossuprimidos (FLETCHER et al., 2012). Os altos índices de morbidade associados ao grande contingente de crianças infectadas fazem com que as protozooses intestinais constituam um dos principais motivos de demanda por atendimento médico na infância. Além disso, outros impactos dessas infecções incluem a redução da produtividade do trabalhador, aumento dos gastos com assistência médica e os efeitos sobre a segurança alimentar (FLETCHER et al., 2012).

Vale destacar que as infecções por protozoários intestinais não acometem apenas o ser humano, uma vez que diferentes espécies de vertebrados, incluindo animais domésticos e silvestres, podem participar do ciclo desses parasitas como hospedeiros. Especialmente em relação às infecções em animais de produção, incluindo bovinos, ovinos e suínos, e em animais de companhia como cães e gatos, a ocorrência aliada a outras evidências epidemiológicas, têm levado a frequentes discussões sobre o significado em saúde pública do papel dos animais na infecção humana.

No que diz respeito às espécies de protozoários que mais comumente infectam o homem destacam-se *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis* e *Entamoeba histolytica*. Apesar da distribuição cosmopolita desses protozoários, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* e *Giardia* têm sido associados com frequência a casos de diarreia registrados em populações residentes na Ásia, África e América Latina (FLETCHER et al., 2011; NAIR et al., 2010; SHAH et al., 2009), enquanto que outros, como *Blastocystis* spp. e *Dientamoeba fragilis*, têm sido diagnosticados principalmente nos países desenvolvidos (FLETCHER et al.,

2012; STARK et al., 2009). Embora todos esses protozoários apresentem ampla distribuição mundial, os índices de prevalência variam nas diferentes regiões do mundo, inclusive dentro de cada país. De modo geral, a diversidade e distribuição desses patógenos, além do risco de se adquirir essas infecções, são diretamente influenciados por fatores demográficos, socioeconômicos, culturais e climáticos aliados às condições de saneamento básico em que vivem as populações. Segundo ALUM et al. (2010), a transmissão e a propagação desses patógenos guardam uma relação estreita com a disponibilidade de água potável, condições socioeconômicas e práticas de higiene da população, e também com a temperatura e umidade que podem atuar diretamente na sobrevivência dos estágios do parasita dependentes do ambiente.

Atualmente, as infecções por *Giardia* e *Cryptosporidium* têm sido consideradas as mais importantes protozooses intestinais por exercerem um impacto significativo na saúde pública, haja vista que são parasitas que causam diarreia e outras desordens entéricas, agravando deficiências nutricionais e impedindo um desenvolvimento satisfatório na infância (APPELBEE et al., 2005). Já com relação a *Blastocystis* e *Dientamoeba fragilis* apesar do crescente interesse dos pesquisadores em ampliar o conhecimento sobre esses parasitas, ainda persistem muitas discussões em relação à relevância clínica da infecção, especialmente no que se refere à possível participação destes protozoários na etiologia de desordens intestinais, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos (FLETCHER et al., 2012).

Considerando que o controle das infecções causadas por esses protozoários e por quaisquer outros parasitas intestinais é uma das formas eficazes de melhorar a saúde da população, principalmente nos países em desenvolvimento, o conhecimento sobre aspectos como prevalência nas diferentes populações, dinâmica de transmissão e os possíveis fatores de risco e condições ambientais envolvidos na exposição ao parasita é uma questão premente e relevante.

1.2. Aspectos gerais sobre *Giardia duodenalis*

O gênero *Giardia* inclui protozoários flagelados que parasitam o intestino delgado de várias espécies de vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Por mais de 300 anos, desde que *Giardia* foi observado pela primeira vez por van Leeuwenhoek, este protozoário ainda é considerado um dos 10 principais parasitas que infectam o homem, principalmente, nos países em desenvolvimento, onde é uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa (THOMPSON, 2000; MONIS et al., 2009). Nas nações desenvolvidas, a giardíase é frequentemente referida como uma doença re-emergente dada a sua participação em surtos diarreicos em creches e a associação de sua veiculação pela água de consumo (THOMPSON, 2000).

Após a criação do gênero *Giardia* por KUNSTLER (1882), vários nomes foram atribuídos às espécies, entre eles, *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia* e *Giardia enterica*. Vale destacar que as denominações *G. lamblia*, *G. duodenalis* e *G. intestinalis* têm sido empregadas como sinonímia, particularmente para isolados de origem humana.

Apesar de ter sido observado pela primeira vez em 1681, *Giardia* apenas começou a despertar maior interesse dos pesquisadores em 1932, quando o parasitologista Charles Stiles suspeitou de que havia uma relação entre a infecção pelo protozoário e a ocorrência de casos de diarreia (STILES, 1932). A partir de então, apesar de ter sido um dos parasitas mais investigados, ainda persistem inúmeros questionamentos em relação à sua taxonomia, patogenicidade e ao potencial zoonótico.

No que se refere à biologia, o gênero *Giardia* apresenta apenas duas formas evolutivas estruturalmente e bioquimicamente distintas, o trofozoíto e o cisto. Os trofozoítos são as formas flageladas responsáveis pelas manifestações clínicas da giardíase, enquanto os cistos representam o estágio infectante, pois exibem uma rígida parede protetora que permite a sobrevivência do parasita fora do hospedeiro (ADAM, 2001). Essas formas sobrevivem inclusive aos processos convencionais de

tratamento e desinfecção da água. Por apresentar um ciclo de vida direto, a transmissão ocorre facilmente após a ingestão dos cistos pela via fecal-oral, seja indiretamente através da água e alimentos contaminados ou diretamente de pessoa a pessoa. Após a ingestão dos cistos, o ambiente ácido do estômago promove a ruptura da parede cística, liberando consequentemente, os trofozoítos no duodeno, onde ocorrem a replicação do parasita e as alterações no tecido do hospedeiro (ERLANDSEN et al., 2004; SMITH et al., 2006).

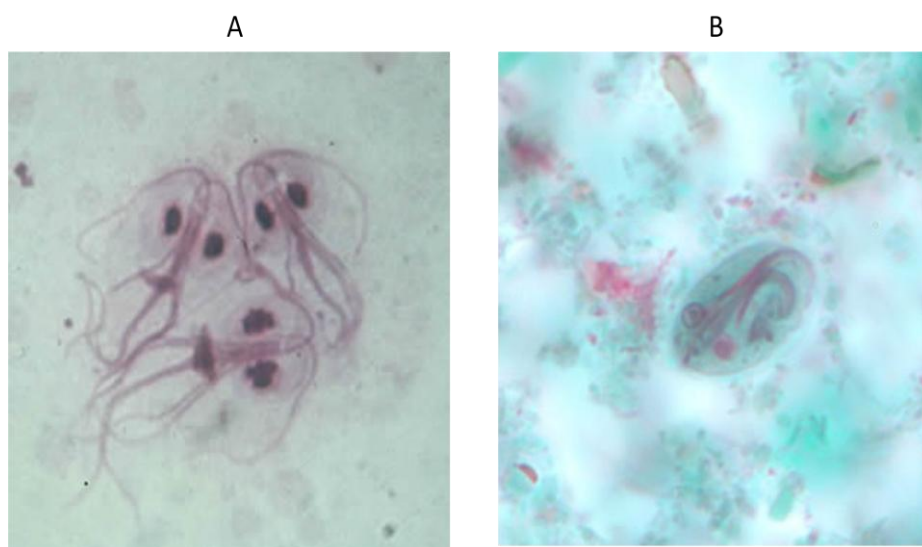


Figura 1. (A) Forma trofozoíta de *Giardia* corado com Giemsa e **(B)** forma cística de *Giardia* corado com tricômio. FONTE: <http://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/gallery.html>

Quanto à sintomatologia, a infecção por *Giardia* apresenta um espectro clínico diverso, entretanto a maioria dos indivíduos é assintomática. Nas infecções sintomáticas, a manifestação clínica mais frequente é a diarreia que pode ser aguda ou crônica, mas com frequência, a infecção é resolvida espontaneamente e os sintomas desaparecem em algumas semanas (LIU et al., 2000) .

Maior impacto clínico da infecção por *Giardia* tem sido observado em indivíduos malnutridos, imunocomprometidos e em crianças. Nessas últimas, as complicações decorrentes da giardíase, como a diarreia persistente e a má absorção intestinal, podem comprometer o desenvolvimento físico e cognitivo (WHO, 1997). A

despeito da importância clínica da giardíase, pouco é conhecido sobre a patofisiologia da diarreia e da má absorção intestinal associadas à infecção, sendo que os eventos responsáveis por alterações do epitélio intestinal ainda não foram completamente elucidados (COTTON et al., 2011). Ao que tudo indica, os mecanismos etiopatogênicos na giardíase são multifatoriais, podendo ser determinados por fatores relacionados ao parasito (mecânicos, proteolíticos, imunológicos) e ao hospedeiro (dieta, microflora intestinal e estados nutricional e imunológico) (GUIMARÃES et al., 1999).

A infecção por *Giardia* apresenta ampla distribuição mundial, afetando anualmente cerca de 280 milhões de pessoas (LANE et al., 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2000), estima-se que 200 milhões de pessoas residentes na Ásia, África e América Latina apresentem giardíase sintomática, sendo 500 mil novos casos registrados a cada ano. As maiores taxas de prevalência ainda são observadas nas populações que habitam países em desenvolvimento, especialmente em crianças. As taxas de infecção podem variar de 8 a 30% e raramente se apresentam abaixo de 4%. Com relação aos indivíduos residentes em países desenvolvidos, como por exemplo, os Estados Unidos, *Giardia* é o enteropatógeno mais comumente diagnosticado, sendo a prevalência estimada entre 2 a 5% (FENG & XIAO, 2011).

Devido a sua característica cosmopolita e por estar intimamente associada às precárias condições sócio-econômicas e higiênico-sanitárias, a giardíase está inserida, desde 2004, no grupo “WHO Neglected Diseases Initiative” que reúne doenças negligenciadas nos países em desenvolvimento e que guardam estreita relação com a pobreza, com a falta de saneamento básico e com a qualidade da água de consumo (SAVIOLI et al., 2006).

Embora a maioria dos casos de infecção por *Giardia* ainda ocorra de forma esporádica, segundo (KARANIS et al., 2007) e colaboradores, no período de 1954 até 2007, de 325 registros mundiais de surtos associados à veiculação hídrica e causados

por protozoários, em aproximadamente 40% dos casos, *Giardia* foi reconhecido como o agente contaminante. Destacam-se também os surtos associados à transmissão pessoa-a-pessoa, que são mais frequentes em ambientes coletivos como creches e escolas.

Além dos registros de prevalência da infecção humana, levantamentos parasitológicos recentes revelam que *Giardia* é um dos parasitos intestinais mais comuns em animais domésticos, em especial, em animais de companhia como cães e gatos, entretanto o papel como reservatórios nas infecções humanas ainda não está estabelecido. No que se refere aos cães, os estudos têm demonstrado que os índices de prevalência registrados em diferentes países variam de 1 a 57% (RYAN & CACCIÒ, 2013). Em relação aos animais domésticos de produção, prevalências variando de 0,1% a 20% e de 2 a 58% foram registradas em suínos e bovinos, respectivamente (RYAN & CACCIÒ, 2013).

1.3. Aspectos gerais sobre *Blastocystis* spp.

O gênero *Blastocystis* foi criado por Alexeieff em 1911, sob a denominação de *Blastocystis enterocola*. Em 1912, Brumpt atribuiu o nome *Blastocystis hominis* aos organismos isolados de amostras de fezes humanas. No entanto, ao longo dos últimos 10 anos, as análises de DNA têm revelado que muitos isolados associados a infecções humanas são geneticamente diferentes, enquanto que isolados obtidos de outros hospedeiros podem ser idênticos aos isolados humanos. Diante dessa heterogeneidade, muitos pesquisadores consideram ser mais apropriado se limitar apenas à denominação genérica, isto é, *Blastocystis*.

Durante muitos anos, *Blastocystis* foi erroneamente descrito como organismo vegetal, levedura ou fungo por alguns autores e até mesmo, como a forma cística de outros protozoários, como *Trichomonas* spp (STENZEL & BOREHAM, 1996). Após cinco décadas de pesquisas, em 1967 ZIERDT e colaboradores, reclassificaram o organismo como protista baseado em critérios morfológicos e fisiológicos. Entre as

características que levaram os pesquisadores a aceitar *Blastocystis* como protista, destacam-se: presença de um ou mais núcleos, presença de organelas como complexo de Golgi e retículo endoplasmático liso e rugoso e a observação organelas celulares semelhantes a mitocôndria. Além disso, *Blastocystis* não cresce em meios de cultivo específicos para fungos, drogas antifúngicas não matam o parasita e algumas substâncias com efeito sobre os protozoários têm atividade contra esse organismo (PARIJA & JEREMIAH, 2013). Com o advento das técnicas moleculares, em 1996, o gênero *Blastocystis* foi incluído no filo eucariota, reino Stramenopiles (Heterokonta), no entanto, essa classificação taxonômica ainda não é satisfatória e, portanto, deve ser revisada (PARIJA & JEREMIAH, 2013).

Quanto à morfologia, apenas recentemente, aliando as observações feitas em microscopia óptica aos recursos da microscopia eletrônica, têm sido possível avanços significativos no estudo de aspectos morfológicos desse parasita. Entre algumas observações importantes, vale destacar que *B. hominis* é um organismo polimórfico, cujas formas mais comumente encontradas e descritas na literatura são as formas vacuolar, granular, amebóide e cística (Figura 2). Ainda são poucas as informações em relação à transformação de uma forma evolutiva em outra, mas sabe-se que esse polimorfismo está condicionado a certos fatores físico-químicos e biológicos como, por exemplo, mudanças osmóticas, presença de certas drogas e estado metabólico do hospedeiro, que podem influenciar a morfologia dos organismos, tanto in vivo quanto in vitro. Essa variação na morfologia pode ter implicações importantes no diagnóstico, pois as formas evolutivas do parasita não são igualmente encontradas em amostras de fezes e em meios de cultura (STENZEL & BOREHAM, 1996).

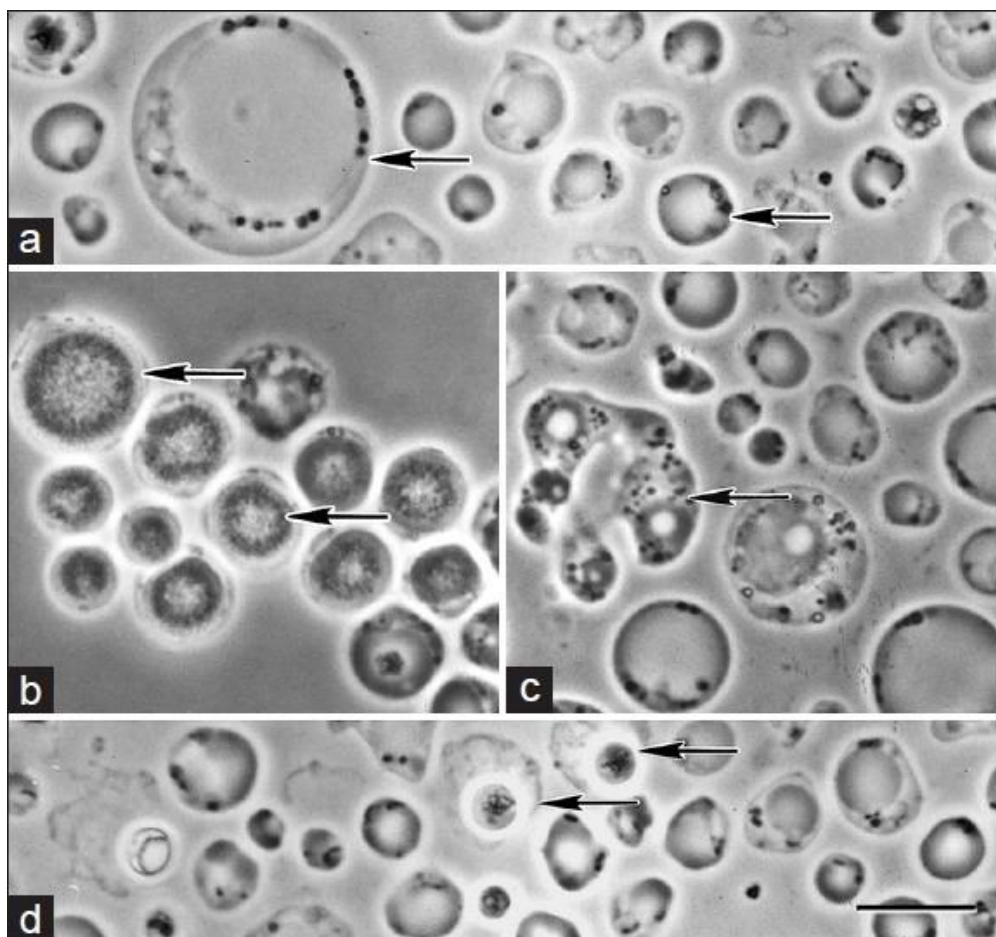


Figura 2. (a) formas vacuolares de *Blastocystis* apresentam grande vacúolo e variação de tamanho (setas), (b) as formas granulares com grânulos distintos presentes no corpo central, (c) forma Amebóide com pseudópodo (d) formas de cisto. Fonte: PARIJA & JEREMIAH, 2013.

Considerando as informações reunidas em diferentes estudos, são fortes as evidências de que a transmissão de *Blastocystis* seja efetuada por via fecal-oral, sendo que a recente descrição da forma cística foi uma contribuição significativa para o entendimento do mecanismo de transmissão desse protozoário. Até o momento, o cisto tem sido considerado a principal forma infectante e, à semelhança de outros protozoários intestinais, o homem pode se infectar pela ingestão de cistos presentes em águas sem tratamento ou inadequadamente tratadas e em alimentos contaminados, ou diretamente de pessoa-pessoa por meio de mãos contaminadas. Desde a descrição de *Blastocystis*, muitas foram as hipóteses aventadas para explicar o ciclo evolutivo desse parasito, no entanto, ainda não há um consenso quanto à seqüência de eventos que ocorrem no ciclo e os mecanismos de multiplicação do

parasito. Entre as proposições mais recentes, considera-se que o mecanismo de multiplicação mais plausível é a divisão binária. (PARIJA & JEREMIAH, 2013; STENSVOLD et al., 2007).

Quanto à sintomatologia, a maioria dos indivíduos infectados é assintomática. Nas infecções sintomáticas, a manifestação clínica mais frequente é a diarreia que pode ser aguda ou crônica. Na maioria dos casos, a infecção é resolvida espontaneamente e os sintomas desaparecem em algumas semanas. Outras manifestações clínicas que podem acompanhar o quadro de diarreia são dores abdominais, flatulência, náuseas e vômitos. A ocorrência de quadros diarreicos crônicos, persistentes ou recidivantes é mais frequente em indivíduos imunocomprometidos, especialmente em pacientes com AIDS, nos estágios mais avançados da doença.

Recentemente, várias questões hipóteses têm surgido a partir de estudos que relacionam a crescente ocorrência de infecções por *Blastocystis* em indivíduos que apresentam a síndrome do intestino irritável (SII) (POIRIER et al., 2012). Entre as explicações plausíveis para tal associação destacam-se o fato de que a maioria das pessoas diagnosticadas com a SII apresentaram altas taxas de infecção por *Blastocystis*, além do que a mudança na microbiota intestinal causada pela SII poderia proporcionar condições favoráveis para a colonização desse protozoário no intestino (ROBERTS et al., 2014). Por outro lado, a ocorrência de infecção em indivíduos saudáveis reforça a opinião de que *Blastocystis* seja um parasita oportunista. Neste contexto, é importante ressaltar que a presença de *Blastocystis* nas fezes de indivíduos que apresentam distúrbios gastrintestinais não é suficiente para que se atribua os sintomas à infecção por esse parasita, pois outras infecções parasitárias ou mesmo doenças não infecciosas podem produzir manifestações semelhantes (STENZEL & BOREHAM, 1996).

A distribuição geográfica de *Blastocystis* ainda é pouco conhecida, mas os estudos têm revelado uma ampla distribuição em todo o mundo e as prevalências

variam entre 0,5 e 62%. Entretanto, as maiores prevalências têm sido observadas nos países em desenvolvimento onde as condições sanitárias e socioeconômicas da população são precárias. Nos países desenvolvidos, essas taxas geralmente são inferiores, podendo variar de aproximadamente 1 a 20%, como por exemplo, 0,5% no Japão a mais de 20% nos Estados Unidos. (CLARK et al., 2013). No Brasil, ainda é restrito o número de publicações que registram os índices de prevalência em diferentes regiões. Em estudo epidemiológico recente realizado em uma população indígena da região Amazônica do Estado Mato Grosso, foi possível constatar uma prevalência de 21% (MALHEIROS, et al., 2011).

Levantamentos coproparasitológicos têm permitido a detecção de *Blastocystis* em amostras de fezes provenientes de animais de produção, incluindo bovinos e suínos, e de animais de companhia como cães e gatos. Recentemente em estudo realizado na Colômbia com animais de produção, de companhia e silvestres, foi possível detectar a prevalência de *Blastocystis* em aves (90%), bovinos (80%), cães (37%), gambás (62,5%), ratos (30%) e em 100% dos primatas não humanos investigados (RAMÍREZ et al., 2014). Essas observações, aliadas a outras evidências epidemiológicas, têm levado alguns pesquisadores a suspeitarem do potencial zoonótico das infecções em animais.

1.4. Aspectos gerais sobre *Dientamoeba fragilis*

A espécie *Dientamoeba fragilis* foi descrita em 1918 por Jepps e Dobbel, sendo inicialmente classificada como uma ameba comensal do trato gastrointestinal (JEPPS & DOBBEL, 1918). No entanto, recentemente, com o auxílio das ferramentas moleculares e da microscopia eletrônica, os estudos têm considerado que este protozoário passou a integrar à classe *Trichomonadida*, a família *Trichomonadidae*, e, possivelmente, a subfamília *Tritrichomonadinae* (MARITZ et al., 2014).

A

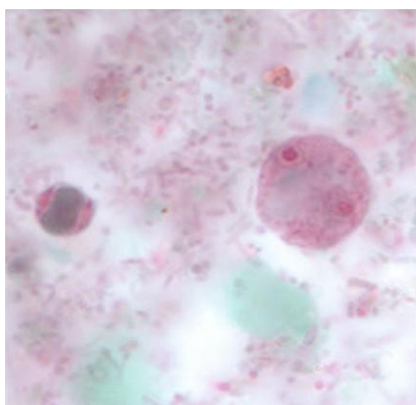


Figura 3. (A) Forma trofozoíta binucleada de *D. fragilis* corado com tricômio e (B) forma trofozoíta uninucleada de *D. fragilis* corado com tricômio. FONTE: <http://www.cdc.gov/dpdx/dientamoeba/gallery.html>

Quanto à sintomatologia, *D. fragilis* foi considerado um protozoário comensal por Jepps e Dobell ao identificar esse protozoário em amostras de fezes de pacientes com ausência de sintomas clínicos. Esses autores também observaram que o modo de nutrição de *D. fragilis* era semelhante ao de amebas não patogênicas como *Entamoeba coli* e *Endolimax nana*. (JEPPS & DOBBEL, 1918). A primeira hipótese que consideraram a possibilidade de que *D. fragilis* haveria potencial patogênico foi aventada pelo pesquisador HAKANSSON em 1936 quando observou que em pacientes que albergavam esse protozoário apresentavam sintomatologia (HAKANSSON, 1936). Até o momento, ainda não há um consenso entre os pesquisadores quanto à sintomatologia, mas a maioria dos indivíduos infectados é assintomática. Nas infecções sintomáticas, dentre os sintomas gastrointestinais diagnosticados, diarreia têm sido o mais frequente, seguido de dores abdominais, náuseas, anorexia e perda de peso (STARK et al, 2010). Com relação à idade dos hospedeiros, ainda não foi possível definir se a infecção de *D. fragilis* ocorre com maior frequência em adultos ou crianças. (BARRATT et al., 2011).

Atualmente, os estudos têm evidenciado a infecção por *D. fragilis* em pacientes que apresentam distúrbios intestinais. Dentre os distúrbios intestinais frequentemente diagnosticados, a síndrome do intestino irritável (SII) tem sido relacionada com a infecção de *D. fragilis*, já que os estudos demonstram maior ocorrência deste protozoário em pacientes portadores da SII do que em pacientes não portadores da doença. Além da ocorrência de distúrbios intestinais, *D. fragilis* vem sendo associado a outros protozoários entéricos. Dentre estes protozoários, as associações comumente relatadas são de *D. fragilis* e *Blastocystis hominis*. Essas associações sugerem que o modo de transmissão de *D. fragilis* compartilha características similares aos demais protozoários entéricos (YAKOOB et al., 2010).

O protozoário *Dientamoeba* apresenta ampla distribuição mundial e as prevalências variam entre 0,3 e 52%, dependendo das condições higiênico sanitárias da população em estudo e do método diagnóstico empregado (BARRATT, et al., 2011). No Brasil quase a totalidade dos estudos não incluem *D. fragilis* nos levantamentos coproparasitológicos. O estudo mais recente foi realizado em Brasília com pacientes atendidos em um hospital universitário, incluindo crianças e adultos, verificando-se a prevalência de 17,7% para *Dientamoeba fragilis* (MINUZZI & CUBA CUBA; 2010). É importante salientar que a observação deste protozoário por microscopia necessita de fixação e coloração com hematoxilina férrica ou tricômio, pois a forma trofozoítica é extremamente frágil podendo sobreviver poucas horas nas fezes dificultando assim, o diagnóstico microscópico. Por isso, sua prevalência é subestimada principalmente nos países em desenvolvimento onde são escassos os estudos com este protozoário.

1.5. Aspectos gerais sobre *Cryptosporidium* spp.

O gênero *Cryptosporidium* é composto por protozoários parasitas que infectam células epiteliais do trato gastrointestinal de vertebrados, incluindo mamíferos, roedores, aves, répteis e peixes. Em 1907, Ernest Edward Tyzzer ao estudar as glândulas gástricas de camundongos assintomáticos, fez a primeira descrição sobre o protozoário, propondo o gênero *Cryptosporidium* e a espécie *Cryptosporidium muris* (*C. muris*). Posteriormente, em 1912, o mesmo pesquisador descreveu uma segunda espécie, *Cryptosporidium parvum*, também observada em camundongos (XIAO & RYAN, 2004).

No que diz respeito a infecção humana, os primeiros registros foram feitos em dois casos clínicos distintos relatados em 1976, quando o parasita foi identificado em uma criança imunocompetente com diarreia aguda auto-limitada (NIME et al., 1976) e em um indivíduo adulto imunossuprimido que apresentava diarreia persistente (MEISEL et al., 1976). Já na década de 1980, esse parasita foi alvo de intensa investigação em função da sua nefasta associação com o vírus da imunodeficiência

adquirida (HIV), mas foi somente após a ocorrência do surto de Milwaukee em 1993, onde mais de 400.000 indivíduos foram infectados, é que a infecção por *Cryptosporidium* foi reconhecida como uma das infecções entéricas mais graves e de difícil controle (RAMIREZ et al., 2004).

Esse gênero apresenta grande complexidade taxonômica e compreende 25 espécies, e dessas, seis já foram associadas a infecções humanas: *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum*, são responsáveis pela grande maioria das infecções na população humana, seguidas por *Cryptosporidium meleagridis* e mais esporadicamente, por *Cryptosporidium cuniculus*, *Cryptosporidium felis* e *Cryptosporidium canis*. (XIAO, 2010)

Quanto à biologia, é um parasito intracelular obrigatório encontrado preferencialmente nas microvilosidades das células intestinais. O ciclo biológico é monoxênico e inclui uma fase assexuada (merogonia) e uma fase sexuada (gametogonia) responsável pela formação de microgametas e macrogametas que, após a fecundação resultam na formação dos oocistos que é a forma infectante do parasito (Figura 4). Há evidências de que após a fecundação, resultam na formação de dois tipos de oocistos: um de parede espessa (80%) que ao ser eliminado juntamente com as fezes já está apto a infectar o hospedeiro, e outro de parede delgada (20%) interna que se rompe na luz intestinal e parece estar associado aos casos de autoinfecção (FRANCO, 2011). A maioria das infecções é adquirida a partir da ingestão de oocistos presentes na água, nos alimentos ou no ambiente contaminados com fezes. A transmissão direta de pessoa a pessoa, por meio das mãos contaminadas, é comum em ambientes coletivos (creches, orfanatos, escolas, asilos, etc) desprovidos de condições sanitárias adequadas. Além disso, como este protozoário pode infectar o homem e uma variedade de animais domésticos e silvestres não se pode descartar a possibilidade de transmissão zoonótica na disseminação das infecções (BOUZID et al., 2013).

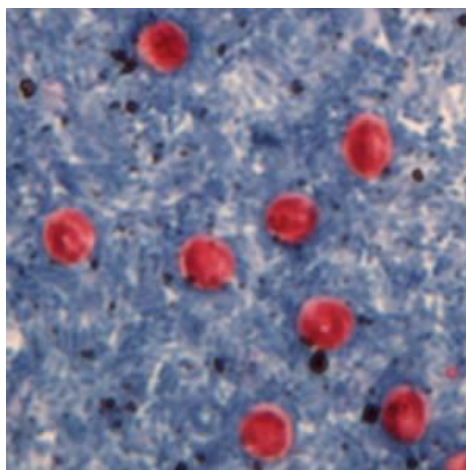


Figura 4. Oocistos de *Cryptosporidium* corados pelo método de Ziehl-Neelsen modificado.
FONTE: <http://www.cdc.gov/dpdx/images/cryptosporidiosis/Crypto>

A infecção por *Cryptosporidium* é endêmica na maioria das regiões tropicais, sendo que a suscetibilidade à criptosporidiose depende de fatores como a idade, o estado imunitário do hospedeiro e a associação com outros patógenos. Quanto à sintomatologia, a infecção em indivíduos imunocompetentes geralmente está associada a um quadro de diarreia auto-limitada, sendo que nos indivíduos imunodeprimidos pode ocorrer gastroenterite grave e prolongada. O principal sintoma é a diarreia que em crianças mal nutridas e pessoas com imunidade comprometida, como os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) apresenta-se de forma severa e prolongada, sendo muitas vezes acompanhada por náuseas, vômitos, cólica, perda de peso e febre, podendo até levar a óbito (SHIKANI & WEISS, 2014).

A infecção humana por *Cryptosporidium* spp. já foi registrada em mais de 90 países e a sua prevalência varia de 0,3% a 4,3% na América do Norte; 0,1% a 14,1% nos países europeus; 1,3% a 13,1% na Ásia e de 3,2% a 31,5% na América Central e do Sul (FAYER et al., 2000). Vale destacar que em países em desenvolvimento, a infecção é mais frequente em crianças com menos de cinco anos de idade e nos países desenvolvidos, os surtos da infecção decorrentes de veiculação hídrica envolve indivíduos adultos (XIAO & RYAN, 2004).

1.6. Caracterização molecular de *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp, *Dientamoeba fragilis* e *Cryptosporidium* spp: fatos e questões

A despeito dos protozoários *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis* e *Cryptosporidium* spp. pertencerem a grupos taxonômicos distintos, esses protozoários apresentam características biológicas comuns que tornam a epidemiologia das infecções semelhantes. Entre estas características destacam-se: (1) ampla distribuição em todo o mundo; (2) exercem um impacto significativo na saúde pública, causando diarreia na população humana, sobretudo em crianças e indivíduos imunocomprometidos, (3) ciclo de vida direto, pois requerem apenas uma espécie de hospedeiro para completar uma geração; (4) a habilidade de parasitar o homem e uma variedade de animais silvestres e domésticos, incluindo animais de companhia como cães e gatos; (5) a principal forma de transmissão é a fecal-oral, e com exceção de *Dientamoeba fragilis*, as formas infectantes (cistos e oocistos) são muito resistentes podendo permanecer viáveis por vários meses no meio ambiente, (6) a grande possibilidade de veiculação hídrica desses patógenos.

Do ponto de vista epidemiológico, esses protozoários podem estar envolvidos em diferentes ciclos de transmissão que incluem hospedeiros como animais silvestres, animais domésticos e de companhia, ou apenas a população humana. As circunstâncias em que tais ciclos podem interagir ainda não foram completamente elucidadas, haja vista que, até o presente, o caráter zoonótico das infecções causadas por esses protozoários, ainda é um assunto que tem dominado grande parte das pesquisas, especialmente no que se refere à dinâmica da transmissão dessas infecções. A princípio, um importante obstáculo enfrentado nas investigações epidemiológicas consistia na ausência de atributos morfológicos distintivos entre os diferentes isolados *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis* e *Dientamoeba fragilis*, dificultando com isso a identificação do potencial zoonótico representado por cada um

dos isolados encontrados nas diferentes espécies animais (THOMPSON & SMITH, 2011; MARITZ et al., 2014).

Diante disso, nas últimas três décadas, a análise de DNA de isolados obtidos de diferentes hospedeiros tem revelado que os gêneros *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis* e *Dientamoeba fragilis* compreendem um complexo que inclui isolados morfológicamente indistinguíveis, porém geneticamente distintos. (XIAO, 2010; FENG & XIAO, 2011; PARIJA & JEREMIAH, 2013, BARRAT et al., 2011). Assim, não obstante a importância da elucidação de questões referentes à taxonomia, a análise de diferenças genéticas intraespecíficas têm permitido inovar o conhecimento da epidemiologia nas infecções humanas e em animais, inclusive no que se refere a dinâmica de transmissão dos genótipos e a relação desses grupos aos aspectos biológicos, às características clínicas da infecção, à prevalência nas diferentes populações e aos fatores de risco e condições ambientais envolvidos na exposição aos parasitas. (MARITZ et al., 2014; CHALMERS & KATZER, 2013; THOMPSON & SMITH, 2011; SMITH et al., 2006)

1.5.1. *Giardia duodenalis*

A partir da criação do gênero, a determinação das espécies foi feita, principalmente, com base no hospedeiro de origem, e com isso, mais de 50 espécies foram descritas, a maioria em mamíferos. Com o tempo, este critério passou a ser criticado por muitos pesquisadores ao reconhecerem que espécies de *Giardia* de diferentes hospedeiros podem ser idênticas, enquanto que aquelas de um mesmo hospedeiro podem ser marcadamente diferentes. Diante disso, a classificação proposta por FILICE (1952), tem sido a mais aceita e baseia-se em características morfológicas dos trofozoítos como o aspecto dos corpos medianos e o formato e dimensões do parasito. De acordo com este sistema, o gênero *Giardia* é dividido em três espécies, sendo *G. duodenalis* que infecta vários mamíferos, inclusive o homem,

aves e répteis, *G. muris* que infecta roedores, aves e répteis e *G. agilis* que infecta anfíbios. Posteriormente, com os recursos de microscopia eletrônica e os avanços em biologia molecular, três novas espécies foram propostas, a saber: *G. psittaci* (ERLANDSEN et al., 1987) e *G. ardeae* (ERLANDSEN et al., 1990) descritas, respectivamente, em periquitos e garças azuis e *G. microti*, encontrada em roedores conhecidos como camundongo-do-campo e rato-almiscarado (MONIS et al. 2009).

Dentre as seis espécies aceitas, *Giardia duodenalis* (= *Giardia intestinalis* = *Giardia lamblia*) é a única espécie que parasita o homem, podendo infectar outros mamíferos, incluindo animais de companhia como cães e gatos e uma variedade de animais domésticos e silvestres. Com o progresso das investigações científicas, especialmente após o advento das técnicas moleculares, muitos estudos têm revelado que *G. duodenalis* é um complexo que inclui isolados morfologicamente indistinguíveis, porém geneticamente distintos. Estas evidências reforçam os comentários feitos por Filice (1952) que ao dividir o gênero *Giardia* em três espécies, chamou a atenção para o fato de que, dentro dos grupos *G. duodenalis*, *G. agilis* e *G. muris* estariam incluídos organismos morfologicamente similares, contudo, exibindo características fisiológicas distintas (MONIS et al., 2009). Além disso, o pesquisador ressalta que para se definir precisamente a posição taxonômica desses organismos seria preciso recorrer ao emprego de metodologias mais refinadas e discriminatórias.

Durante os últimos 30 anos, estudos para a análise de DNA de isolados obtidos de diferentes hospedeiros têm permitido avanços no entendimento de questões referentes à heterogeneidade do complexo "*duodenalis*". A detecção de grupos genéticos distintos de *Giardia* tem-se baseado na análise da sequência de DNA correspondente a genes polimórficos, DNA correspondente a genes polimórficos, tais como o gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossômico (ssrRNA), as enzimas: glutamato desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*) e beta-giardina (β -giardina), o fator de alongação alfa (*ef1 α*) e, mais recentemente, a região espaçadora intergênica (IGS) do rRNA (CACCIÒ & RYAN, 2008). As observações

feitas nesses estudos revelam que o homem e outras espécies de mamíferos podem ser infectados pelos genótipos identificados como A e B, que incluem isolados considerados potencialmente zoonóticos. Além desses genótipos, foi possível o reconhecimento de outros grupos, a saber: genótipos C e D identificados em cães (HOPKINS et al., 1997; MONIS et al., 1998), o genótipo E em ruminantes (EY et al., 1997) e os genótipos F e G em gatos e ratos domésticos, respectivamente (MONIS et al., 1999). Além dos genótipos já descritos e aceitos para os estudos de caracterização molecular, outros grupos têm sido propostos, como por exemplo, o genótipo H identificado em focas, entretanto a sua existência ainda não foi seguramente confirmada (FENG & XIAO, 2011) (QUADRO1).

Quadro 1. Classificação dos genótipos e subgenótipos de *Giardia duodenalis*.

Genótipo	Subgenótipo	Hospedeiro(s)
A	AI	Homem e cães
	AII	Homem
	AIII	Animais silvestres e bovinos
B	BIII	Homem, primatas não humanos, cães, gatos e animais silvestres
	BIV	Homem, cães e animais silvestres
	BSI	Homem
	BS6	Homem
C e D	Não identificado	Cães
E	Não identificado	Bovinos, suínos e ovinos
F	Não identificado	Gatos
G	Não identificado	Ratos
H	Não identificado	Animais marinhos

Mais recentemente, a partir do reconhecimento de diferenças nas sequências gênicas de isolados previamente caracterizados como genótipos A e B, foi possível identificar subgrupos distintos, dentre os quais se destacam AI, AII, BIII e BIV (MONIS et al., 2003). No genótipo A, o subgenótipo AI reúne isolados humanos e de animais

zoonóticos, enquanto que o subgenótipo AII inclui, predominantemente, isolados humanos. Mais recentemente, foi reconhecido o subgenótipo AIII, que até o presente, ainda não foi associado à infecção humana, sendo que as evidências indicam que este grupo parece ser específico de mamíferos ungulados, predominando nas espécies silvestres (MONIS et al., 2003). Quanto ao genótipo B, os subgenótipos BIII e BIV têm sido identificados em amostras fecais obtidas de humanos, cães, gatos, cavalos, bezerros e animais silvestres (MONIS et al., 2003; SPRONG et al., 2009). Outros dois subgenótipos, BS1 e BS6, foram identificados recentemente por LALLE e colaboradores (2009), em amostras fecais obtidas de indivíduos de uma população originária do Saara Ocidental. Segundo alguns autores, a despeito das informações reunidas em diferentes investigações, ainda não foi possível definir com maior precisão, os subtipos do grupo genético B (FENG & XIAO, 2011).

Vale ressaltar que, a precisão para se caracterizar geneticamente os isolados de *G. duodenalis*, vai depender de fatores tais como: o gene-alvo, o número de marcadores genéticos empregados na análise, o grau de especificidade do ensaio e as técnicas empregadas para identificação dos genótipos (FENG & XIAO, 2011). A despeito disso, não há um critério rígido que determine a escolha desses marcadores, uma vez que todos os *loci* permitem a distinção entre os genótipos maiores, isto é, A, B, C, D, E, F e G. No entanto, como a variação intra-genótipos é limitada, alguns genes menos conservados e, portanto mais polimórficos, como β -giardina, *gdh* e *tpi* têm mostrado uma maior diversidade intra-genotípica, possibilitando a diferenciação de subtipos, especialmente dos subgenótipos AI, AII e AIII. Assim, o subgenótipo AI desdobra-se em dois tipos AI-1 e AI-2 e o subgenótipo AII em sete tipos, AII-1 até AII-7. O subgenótipo AIII possui apenas um tipo, AIII-1 (FENG & XIAO, 2011).

A análise de diferenças genéticas intraespecíficas no complexo *G. duodenalis* tem revolucionado o conhecimento da epidemiologia nas infecções humanas. Com isso, tem sido crescente a realização de estudos moleculares com o propósito de caracterizar os genótipos presentes nas populações em que a prevalência e a

frequência de transmissão deste protozoário são altas. Nesse contexto, um dos grandes impactos das análises moleculares de isolados de *Giardia* humanos e de outras espécies de mamíferos foi ampliar as possibilidades para a melhor compreensão da epidemiologia e significado em saúde pública da infecção causada por este protozoário, permitindo a obtenção de informações relevantes no que se refere ao papel dos animais na epidemiologia da infecção humana e à relação dos genótipos com aspectos biológicos e características clínicas da infecção.

Recentemente, os pesquisadores FENG & XIAO (2011), ao compilarem as informações apresentadas em diferentes investigações, destacam que as análises moleculares de mais de 4000 isolados obtidos das fezes de indivíduos residentes em diferentes regiões geográficas revelam que o homem é infectado predominantemente pelos genótipos identificados como A e B e que a prevalência dos genótipos varia consideravelmente de um país para outro. No entanto, vale destacar que os fatores que determinam essa variabilidade geográfica dos genótipos ainda não foram esclarecidos, mas é muito provável que diferenças quanto às vias de transmissão e às fontes de infecção interfiram na distribuição desses grupos. Em revisão recente apresentada por LAISHRAM et al. (2012), o autor destaca em um mapa-múndi a distribuição dos genótipos A e B detectados em diferentes amostras fecais humanas obtidas em populações residentes nos cinco continentes (Figura 5).

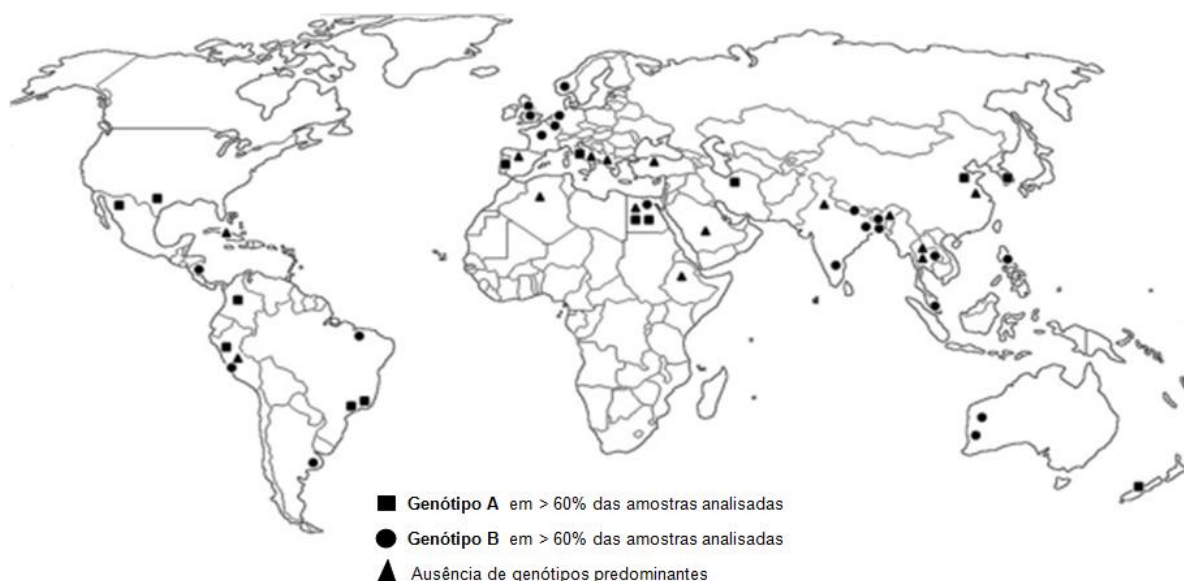


Figura 5. Distribuição dos genótipos A e B detectados em diferentes amostras fecais humanas obtidas em populações residentes nos cinco continentes. FONTE: LAISHRAM et al. (2012)

Até o presente, no Brasil, ainda são poucos os estudos de caracterização genotípica de isolados de *Giardia* obtidos de fezes humanas, no entanto, as observações têm indicado que no país, a distribuição dos genótipos pode variar em populações residentes em regiões diferentes. Assim, no sudeste do país, entre os artigos disponíveis na bibliografia científica, destaca-se o primeiro estudo realizado por VOLOTÃO et al. (2007) que, empregando PCR e o sequenciamento do gene β -giardina, demonstraram a predominância do genótipo AI em isolados detectados nas fezes de crianças, adultos e de cães, no município do Rio de Janeiro. Nesse mesmo ano, no Estado de São Paulo, SOUZA e colaboradores (2007), analisando a sequência do gene *gdh*, identificam os genótipos AII e B em isolados humanos, os genótipos C e D em amostras caninas e os genótipos AI e F em isolados obtidos de gatos. Mais recentemente, em estudo realizado no Estado de Minas Gerais, todos os isolados obtidos de crianças atendidas em creches públicas do município de Araguari foram classificados como genótipo B (SANTOS et al., 2012). Já em um estudo realizado na região Nordeste do país, KOHLI e colaboradores (2008) identificaram os

genótipos A e B em isolados obtidos de crianças residentes em uma comunidade carente de Fortaleza.

1.5.2. *Blastocystis* spp.

Nos últimos 10 anos, as análises moleculares de *Blastocystis* têm permitido avanços no entendimento das questões não só relacionadas à diversidade genética, mas também a taxonomia desse enigmático organismo. O gene SSU-rDNA (menor subunidade ribossomal) possui regiões conservadas e regiões variáveis, sendo assim, uma ferramenta importante para a identificação de relações filogenéticas entre as espécies. Através do estudo desse gene foi possível classificar *Blastocystis* no grupo dos Stramenopiles. Esse grupo é definido como um conjunto evolutivo heterogêneo de protistas multicelulares e unicelulares, com mais de 100.000 espécies incluindo-se a alga marrom, diátomos, crisófitos, mofo, lodo, entre outros. Embora esta classificação possa parecer satisfatória ao nível molecular, há uma discrepância na morfologia entre *Blastocystis* e outros stramenophiles. Em geral, os Stramenopiles possuem flagelos rodeados por “pelos” laterais como mastigonemas, que são características ausentes nos *Blastocystis* (PARIJA & JEREMIAH, 2013).

Após diversos estudos empregando a PCR, a identificação desse organismo a nível de espécie ainda é um desafio. Além disso, a análise das sequências do gene SSUrDNA obtidas de diferentes isolados de *Blastocystis* revelou uma extensa variação genética. Baseados nessas variações foram criados os subtipos (STs) na tentativa de agrupar os isolados (cepas) que partilhavam as mesmas características genéticas. Como resultado, um consenso foi desenvolvido por STENSVOLD e colaboradores em 2007, que propuseram a substituição de todos os nomes de espécies que anteriormente haviam sido atribuídas em função do hospedeiro de origem como, por exemplo, *Blastocystis ratti* e *Blastocystis hominis*, como "*Blastocystis* sp." seguido do número do subtipo (CLARK, et al., 2013)

Até o momento, o SSU-rDNA é um gene confiável para detectar diferentes STs de *Blastocystis* sp, não se limitando somente aos STs já descritos na literatura e, além disso, os estudos realizados com esse gene, tem demonstrado não haver necessidade de sequenciar o gene completo (1800pb) para a classificação precisa de novos STs. Várias regiões do gene têm sido utilizados por diferentes autores com esta finalidade (como representado na figura 6). No entanto, entre essas regiões, destaca-se a região “barcode” proposta por SCICLUNA e colaboradores (2006) que tem mostrado maior eficiência e sensibilidade tanto na identificação de subtipos já descritos como na descoberta de novos grupos genéticos.

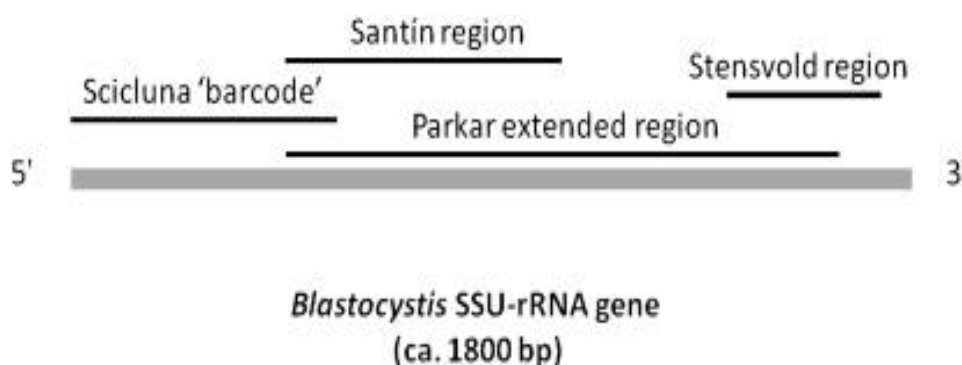


Figura 6. Representação esquemática do gene SSU-rRNA para *Blastocystis*.

FONTE: CLARK et al. (2013)

compreende, 17 subtipos. Os subtipos ST1-ST4 são encontrados em 90% dos isolados humano, enquanto que apenas 10% dos demais isolados humanos são pertencentes aos subtipos ST5-ST9. Todos estes STs, exceto o ST9 também têm sido encontrados em vários hospedeiros não humanos. Em 2009, oito novos STs (ST10-ST17) foram detectados em hospedeiros não humanos (ALFELLANI, et al., 2013 a).

No que se refere aos subtipos e possíveis relações com fenótipos, a observação de vários estudos realizados no mundo ainda não encontraram quaisquer correlação. No entanto, ALFELLANI e colaboradores (2013 b) após compilarem os dados referentes a 3.000 isolados obtidos de diferentes regiões geográficas, observaram que a prevalência dos subtipos varia de um país para outro. O subtipo ST4 é quase tão comum quanto ST1 e ST3 em alguns países da Europa, porém

parece ser praticamente inexistente na maioria das outras regiões como nos países da América do Sul. Por outro lado, ST6 é muito raro entre os europeus e norte-americanos, enquanto que alguns países da Ásia e do Oriente Médio, como no Egito, Nepal, Japão e Malásia a ocorrência desse subtipo em isolados humanos tem sido frequentemente relatada. Já o subtipo ST3 e ST1 são os subtipos mais prevalente na maioria das investigações realizadas (MOOSAVI et al., 2012; EROGLU et al., 2009; LEE et al., 2012; YAKOOB et al., 2010; THATHAISONG et al., 2003).

Até o momento, no Brasil, há apenas um estudo de caracterização molecular de *Blastocystis* publicado recentemente. Neste estudo realizado por MALHEIROS e colaboradores (2011), após o sequenciamento de fragmento referente ao gene SSUrRNA foram identificados em uma população indígena da região Amazônica do Estado Mato Grosso, os subtipos ST1 (41%), ST2 (32%) e ST3 (17%).

1.5.3. *Dientamoeba fragilis*

Os estudos de caracterização molecular de *D. fragilis*, tem se baseado na amplificação e no sequenciamento do gene SSU-rDNA. Por ser um gene conservado, tem mostrado maior eficiência e sensibilidade tanto na PCR convencional quanto na PCR em tempo real. (BARRAT et al., 2011).

Até o momento, existem descritos os genótipos I e II, porém são raros os estudos que tentaram correlacionar esses genótipos com a presença ou ausência de doença. Os estudos sugerem que o genótipo I é o mais frequentemente encontrado tanto em indivíduos sintomáticos quanto nos assintomático. (JOHNSON & CLARK, 2000). Por outro lado, a relação do genótipo com a sintomatologia ainda é uma questão que precisa ser elucidada.

Recentemente um estudo realizado na Holanda por MASS e colaboradores (2013) detectaram *Dientamoeba fragilis* como o protozoário mais frequente encontrado em 89% das amostras de fezes obtidas de pacientes pediátricos com sintomas

gastrointestinais utilizando a técnica da PCR–multiplex. Em outro estudo realizado na Dinamarca com pacientes adultos que apresentavam a síndrome do intestino irritável foi detectado *D. fragilis* em 34,8% das amostras, enquanto que no grupo controle foi diagnosticado 23,4% das amostras com a presença do protozoário (KROGSGAARD et al., 2014).

Até o momento, não há um consenso sobre caráter zoonótico da infecção por *D. fragilis*, deixando sem respostas questões referente a via de transmissão e os possíveis hospedeiros naturais. Recentemente este protozoário foi detectado em fezes de suínos e primatas não humanos e seus isolados foram caracterizados com os mesmos genótipos que infectam os humanos (CACCIÒ et al., 2012; STARK et al., 2008). Há evidências que os animais domésticos não estariam envolvidos na transmissão de *D. fragilis*; no entanto a hipótese que múltiplos isolados poderiam estar circulando em hospedeiros animais também não pode descartada. Até o momento, os estudos que avaliam a dinâmica de transmissão ainda são escassos, mas ao que tudo indica parece improvável que a transmissão de hospedeiros não humanos represente uma proporção significativa das infecções. (MARITZ et al., 2014)

1.5.4 *Cryptosporidium* spp.

Devido as dificuldades associadas à taxonomia de *Cryptosporidium* spp., foram incluídas normas de nomenclatura pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICNZ) para a validação de novas espécies dentro do gênero *Cryptosporidium*. Além da adesão a essas normas, XIAO e colaboradores (2004) publicaram um consenso onde descrevem quais são os requisitos mínimos para a inclusão de uma nova espécie *Cryptosporidium*, que incluem: dados morfométricos dos oocistos, caracterização genética (incluindo caracterizações multiloculares), o sítio da infecção nos hospedeiros naturais e estudos experimentais que evidencie a especificidade do hospedeiro. Assim, considerando as observações feitas em vários

estudos que, com base em critérios morfológicos, biológicos e genéticos, culminaram com a caracterização de isolados de *Cryptosporidium* obtidos de diferentes hospedeiros, o Quadro 2 apresenta todas as espécies atualmente aceitas.

A infecção humana está associada principalmente às espécies *C. hominis* e *C. parvum*, já com menor frequência podemos destacar as infecções pelas espécies *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. canis* e *C. felis*. Embora a distribuição e prevalência variem muito em todo o mundo, existem espécies que raramente infectam o homem, dentre as quais citamos: *C. andersoni*, *C. suis*, *C. scrofarum*, *C. bovis*, e *C. muris*.

Quadro 2. Espécies de *Cryptosporidium* reportadas em diferentes hospedeiros

Espécies <i>Cryptosporidium</i>	Hospedeiro Principal	Infecção humana	Localização no hospedeiro	Referência
<i>C. molnari</i>	peixes	-	Estômago	Alvarez-Pellitero e Sitjà-Bobadilla, 2002
<i>C. scophthalmi</i>	peixes	-	Intestino	Alvarez-Pellitero et al., 2004
<i>C. serpentis</i>	répteis	-	Estômago	Levine, 1980
<i>C. varanii</i> / <i>C. saurophilum</i>	Lagartos	-	Estômago	Pavlásek et al., 1995
<i>C. fragile</i>	anfíbios	-	Estômago	Jirku et al., 2008
<i>C. meleagridis</i>	aves	sim	Intestino	Slavin, 1995
<i>C. baileyi</i>	aves	sim	Intestino	Current et al., 1986
<i>C. galli</i>	aves	-	Estômago	Pavlásek, 1989
<i>C. muris</i>	roedores	sim	Estômago	Tyzzer, 1907
<i>C. parvum</i>	roedores	sim	Intestino	Tyzzer, 1912
<i>C. wrairi</i>	roedores	-	Intestino	Vetterling et al., 1971
<i>C. felis</i>	felinos	sim	Intestino	Iseki, 1979
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	sim	Abomaso	Lindsay et al., 2000
<i>C. canis</i>	canídeos	sim	Intestino	Fayer et al., 2001
<i>C. hominis</i>	humanos	sim	Intestino	Morgan-Ryan et al., 2002
<i>C. suis</i>	suínos	sim	Intestino	Ryan et al., 2004
<i>C. bovis</i>	ruminantes	sim	Desconhecido	Fayer et al., 2005
<i>C. fayeri</i>	cangurus	sim	Desconhecido	Ryan et al., 2008
<i>C. ryanae</i>	Bovinos	-	Desconhecido	Fayer et al., 2008
<i>C. macropodum</i>	cangurus	-	Desconhecido	Power and Ryan., 2008
<i>C. xiaoi</i>	ovinos/caprinos	-	Desconhecido	Fayer e Santin, 2009
<i>C. ubiquitum</i>	cordeiro	sim	Desconhecido	Fayer et al., 2010
<i>C. cuniculus</i>	coelhos	sim	Desconhecido	Robinson et al., 2010
<i>C. tyzzeri</i>	roedores	sim	Desconhecido	Ren et al., 2012
<i>C. viatorum</i>	humanos	?	Desconhecido	Elwin et al., 2012
<i>C. scrofarum</i>	suínos	?	Desconhecido	Kvac et al., 2013

FONTE: Adaptado FAYER (2010); NICHOLS et al. (2014)

As recentes investigações moleculares sobre a distribuição, biologia e potencial zoonótico de *Cryptosporidium* têm permitido o reconhecimento da real importância das infecções por este protozoário. No que se refere à especificidade, inicialmente, acreditou-se que apenas a espécie *Cryptosporidium parvum*, era responsável pela infecção humana e de outras 150 espécies de mamíferos. Os

estudos de caracterização genotípica têm revelado que de fato, *C. parvum* é uma espécie que apresenta uma baixa especificidade parasitária, tendo sido identificada em camundongos, bovinos, equinos e seres humanos (FAYER, 2004). Diante disso, *C. parvum* parece ser a espécie de mais ampla distribuição estando associada à infecção humana e de várias espécies de animais domésticos e silvestres (APPELBEE et al., 2005).

Ao que tudo indica a variabilidade genética intra-específica apresentada por *Cryptosporidium parvum* é também o fenômeno responsável tanto pela ocorrência de genótipos específicos para determinados hospedeiros e de genótipos zoonóticos (IRWIN, 2002) como também por genótipos que expressam potencial patogênico característico (AMBROISE-THOMAS, 2000). No que se refere a *C. hominis*, a despeito de relatos ocasionais de infecção em rebanhos, a criptosporidiose humana está associada principalmente a esta espécie que guarda estrita relação com a transmissão antroponótica (CACCIÓ et al., 2013; XIAO, 2010).

Assim, diferentes estudos envolvendo análises de polimorfismos de nucleotídeo único - SNPs (PENG et al., 1997), polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição - RFLP (XIAO et al., 1999), polimorfismos de conformação (GASSER et al., 2001), análises de repetições de sequências simples - microssatélites (CACCIÒ et al., 2000) e também métodos de amplificação randomizada (KARANIS et al., 2007) têm sido utilizados para caracterizar isolados de *Cryptosporidium* obtidos de amostras fecais humanas e de animais, e também de amostras ambientais. No que diz respeito aos diferentes marcadores moleculares, a subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA) é o marcador mais utilizado nos estudos de caracterização genética de *Cryptosporidium* (XIAO, 2010), seguido dos demais marcadores: Hsp70, COWP, actina, β -tubulina e GP60 utilizados para a caracterização de espécies e genótipos (CACCIÒ et al., 2005). Recentemente o gene CpA135, foi utilizado para a identificação de espécies de *Cryptosporidium* de oocistos presentes em amostras humanas e de rebanho ovino (CACCIÓ et al., 2013). Os recentes avanços na caracterização

molecular tornaram possível diferenciar oocistos do parasito em espécies, genótipos e subgenótipos. O gene GP60 ou GP40 é o marcador genético mais apropriado para subgenotipar as espécies de *C. hominis* e *C. parvum*, responsáveis pela a maioria das infecções humanas, por conter várias regiões que apresentam altas taxas de mutação, incluindo uma região hiper-variável. Compreender os subgenótipos nessas espécies, pode ajudar a fornecer pistas sobre os mecanismos de infecção e estabelecer bases científicas para as modalidades terapêuticas eficazes. (XIAO,2010; WIDMER & LEE, 2010). Atualmente, existem 10 famílias de subgenótipo encontradas em *C. parvum* (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIlf, IIh, Ii, IIj,IIk) sendo que IIa e IId está em 26 países e além disso são zoonóticos. Os subgenótipos IIc também é comumente encontrado nos estudos. No que se refere a *C. hominis*, essa espécie é composta por seis famílias de subgenótipos (Ia-Ig excluindo Ic, que é ainda indefinido).

No Brasil, ainda são escassos estudos de caracterização genotípica de isolados de *Cryptosporidium* obtidos de fezes humanas. Assim, no sudeste do país, entre os artigos disponíveis na literatura científica, destaca-se o estudo realizado por GONCALVES et al. (2006) que, empregando PCR e o sequenciamento do gene (COWP), e o locus do microsatélite ML1, encontraram somente a espécie *C. hominis* em isolados detectados nas fezes de crianças atendidas em uma creche no município do São Paulo. O primeiro estudo com felinos no Brasil foi realizado por THOMAZ e colaboradores (2007) com isolados de cães, gatos e bovinos do estado de São Paulo, analisando a sequência do gene SSUr RNA, identificaram as espécies *C. canis*, *C. felis* em todos os isolados de gatos e *C. parvum* e *C. bovis* nos isolados obtidos de bovinos. Mais recentemente, ARAÚJO e colaboradores (2011) realizaram o primeiro estudo de caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp em isolados obtidos de amostras de água superficiais coletadas em seis rios distribuídos no Estado de São Paulo e, utilizando o gene SSUrRNA, os isolados obtidos em amostras de águas recreacionais foram classificados como *C. hominis* e *Cryptosporidium* sp., e como *C. meleagridis*. No mesmo ano, FIUZA e colaboradores (2011) detectaram, após o

sequenciamento, a infecção por *C. andersonii* em vacas leiteiras de dois rebanhos no Estado do Rio de Janeiro.

2. JUSTIFICATIVA

A despeito do interesse dos pesquisadores em esclarecer várias questões fundamentais sobre a epidemiologia dos protozoários intestinais *Giardia*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. e *Dientamoeba fragilis*, ainda são necessárias investigações que forneçam informações sobre a dinâmica de transmissão das espécies, genótipos e subtipos, e que correlacionem esses grupos genéticos aos aspectos biológicos e clínicos dessas infecções, à prevalência nas diferentes populações e aos fatores de risco e condições ambientais envolvidos na exposição ao parasita. Com respeito a toda essa variabilidade genética observada nesses organismos, os ciclos de transmissão e a relação epidemiológica entre os diversos hospedeiros, é ainda uma situação complexa, em especial no que se refere à transmissão zoonótica. Mesmo diante da habilidade desses parasitas infectarem o homem e uma diversidade de espécies de mamíferos domésticos e silvestres, ainda não há evidências que comprovem seguramente essa questão.

Portanto, para responder a essas questões são necessárias investigações epidemiológicas nas quais além de se empregar as técnicas moleculares de caracterização genotípica, as amostras sejam obtidas de grupos populacionais de áreas endêmicas onde estejam asseguradas algumas características que possibilitem essa transmissibilidade. Frente a todas essas considerações, o grupo populacional que nos propusemos a investigar é constituído por indivíduos e cães que vivem em duas colônias de pescadores que estão localizadas às margens do Rio Tiête. Nestas comunidades, as famílias vivem em moradias precárias e não têm acesso às redes públicas de abastecimento de água, de coleta de esgoto e de fornecimento de energia elétrica. Assim, no presente, propõe-se identificar as principais infecções causadas por enteroparasitas e caracterizar genotipicamente os isolados de *Giardia*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. e *Dientamoeba fragilis* detectados nessas populações ribeirinhas. Com a realização desta investigação epidemiológica, espera-se, além de atender a uma proposta científica, obter informações que poderão

fundamentar ações educativas em saúde com esse grupo, visando a prevenção das parasitoses intestinais e promovendo a saúde infantil e a melhoria das condições de vida das famílias e da comunidade como um todo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a ocorrência de parasitas intestinais nos moradores de duas colônias de pescadores do Médio Tietê e nos cães que coabitam essas comunidades e, caracterizar geneticamente os isolados dos protozoários *Giardia*, *Blastocystis*, *Dientamoeba fragilis* e *Cryptosporidium* obtidos nessas populações e em amostras de água do Rio Tietê.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar por meio de exames coproparasitológicos a prevalência de parasitas entéricos nas populações que vivem nas colônias;
2. Avaliar por meio de exames coproparasitológicos a prevalência de parasitas entéricos nos cães que coabitam as colônias;
3. Verificar a presença de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* spp em amostras de água bruta superficial do rio, às margens das colônias;
4. Caracterizar genotipicamente os isolados de *Giardia*, *Blastocystis*, *Dientamoeba fragilis* e *Cryptosporidium* circulantes em seres humanos, cães e na água e avaliar a frequência com que os genótipos identificados ocorrem nas comunidades estudadas;
5. Verificar a existência de associações entre os genótipos de *Giardia*, *Blastocystis*, *Dientamoeba fragilis* e *Cryptosporidium* e os fatores de risco para a infecção.

4. REFERÊNCIAS

Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3): 447–75.

Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. Protist. 2013; 164(4): 497-509. **A**

Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop. 2013; 126(1): 11–8. **B**

Alum A, Rubino JR, Ijaz MK. The global war against intestinal parasites—should we use a holistic approach? Int J Infect Dis. 2010; 14 (9):732–8.

Ambroise-Thomas P. Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. Int J Parasitol. 2000; 30(12-13):1361-7.

Appelbee AJ, Thompson RC, Olson ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. Trends Parasitol. 2005; 21(8):370-6.

Araújo RS, Dropa M, Fernandes LN, Carvalho TT, Sato MI, Soares RM, Matté GR, Matté MH. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in Sao Paulo, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011; 85(5):834-8.

Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. Gut Microbes. 2011; 2(1):3-12.

Bouzig M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. Clin Microbiol Rev. 2013; 26(1):115-34.

Cacciò S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. Parasitology. 2000; 120(3): 237-44.

Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol. 2005; 21(9): 430-7.

Cacciò, SM, Ryan, U. Molecular epidemiology of *Giardia*. Mol Biochem Parasitol., 2008; 160(2):75-80.

Cacciò SM, Sannella AR, Manuali E, Tosini F, Sensi M, Crotti D, Pozio E. Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. Emerg Infect Dis. 2012; 18(5):838-41.

Cacciò SM, Sannella AR, Mariano V, Valentini S, Berti F, Tosini F, Pozio E. A rare *Cryptosporidium parvum* genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. Vet Parasitol. 2013; 191(1-2):128-31.

Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. Trends Parasitol. 2013; 29(5):237-51.

Clark CG, Van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. Adv Parasitol. 2013; (82): 1-32.

Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. Int J Parasitol. 2011; 41(9): 925-33.

Erlandsen SL, Bemrick WJ, Pawley j. Evidence for a new specie *Giardia psittaci*. J Parasitol. 1987; (73): 623-9.

Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, et al. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol. 1990; (76): 717-24.

Erlandsen SL, Russo AP, Turner JN. Evidence for adhesive activity of the ventrolateral flange in *Giardia lamblia*. J Eukaryot Microbiol. 2004; 51(1):73-80.

Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. Parasitol Res. 2009; 105(6):1589–92.

Escobedo A A, Cañete R, Núñez FA. Intestinal protozoan and helminth infections in the

municipality San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba. [Trop Doct.](#), 37 (4): 236-8, 2007.

Ey PL, Mansouri, M Kulda, J Nohýnková, E Monis, PT Andrews, RH Mayrhofer, G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *Eukaryot Microbiol.* 1997; 44(6), 626-35.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* 2000; 126(1-2):1305-22.

Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol.* 2004; 126 (1-2): 37-56.

Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* 2010; 124(1):90-7.

Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(1): 110-40, 2011.

Filice FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ Calif Publ Zool.* 1952; 57: 53-146.

Fiuza VR, Almeida AJ, Frazão-Teixeira E, Santín M, Fayer R, Oliveira FC. Occurrence of *Cryptosporidium andersoni* in Brazilian cattle. *J Parasitol.* 2011; 97(5):952-3.

Fletcher SM, Stark D, Ellis J. Prevalence of gastrointestinal pathogens in sub-Saharan Africa. Systematic review and meta-analysis. *J. Public Health Afr.* 2011; (2):127–37.

Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25 (3):420-49.

Franco RMB. *Sarcocystis, Isospora e Cryptosporidium*. In: Neves, DP. *Parasitologia Humana*. Atheneu. São Paulo, 2011 p. 189-98.

Gonçalves EMN, Araujo RS, Orban M, Matte GR, (2), Matte MH, Corbett CEP. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in fecal samples. *Rev. Inst Med trop S Paulo.* 2008; 50(3):165-7.

- Guimarães S, Sogayar MI, Franco MF. *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1999; 41(1): 45-58.
- Hakansson EG. *Dientamoeba fragilis*, a cause of illness: report of a case. Am J Trop Med Hyg 1936; 16:175-8.
- Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson, RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. J. Parasitol. 1997; 83 (1): 44-51.
- Irwin PJ. Companion animal parasitology: a clinical perspective. Int J Parasitol. 2002; 32(5): 581-93.
- Jepps MW, Dobell C. *Dientamoeba fragilis* n.g., n. sp.: a new intestinal amoeba from man. Parasitology. 1918;10:352-67.
- Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. Clin Microbiol Rev. 2004;17(3):553-70.
- Johnson JA, Clark CG. Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. J Clin Microbiol. 2000 ;38(12):4653-4.
- Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J Water Health. 2007; 5(1):1-38.
- Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, Lima AA, Guerrant RL. *Giardiaduodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; 102(7): 718-25.
- Krogsgaard LR, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, Bytzer P. The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study. Clin Gastroenterol Hepatol. 2014; 16(14): S1542-3565.

Kunstler J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. C R Seances Soc Biol Fil. 1882; 95: 347-9.

Laishram S, Kang G, Ajjampur SS. Indian. Giardiasis: a review on assemblage distribution and epidemiology in India. J Gastroenterol. 2012; 31(1):3-12.

Lalle M, Bruschi F, Castagna B, Campa M, Pozio E, Cacciò SM. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009; 103(8): 834-8.

Lane S, Loyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. Crit Rev Microbiol. 2002; 28(2):123-47.

Lee IL, Tan TC, Tan PC, Nanthiney DR, Biraj MK, Surendra KM, Suresh KG.. Predominance of *Blastocystis* sp. subtype 4 in rural communities, Nepal. Parasitol Res. 2012; 110(4):1553–62.

Liu SM, Brown DM, O'Donoghue P, Upcroft P, Upcroft JA. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. Mol Biochem Parasitol. 2000; 108 (1): 137-40.

Malheiros AF, Stensvold CR, Clark CG, Braga GB, Shaw JJ. Short report: Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011; 85(6):1050-3.

Maritz JM, Land KM, Carlton JM, Hirt RP. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? Trends Parasitol. 2014; 30(7):333-41.

McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2014; 52(3):712-20.

Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology. 1976; (6):1156-60.

Minuzzi TTCS, Cuba CA. Identificação fenotípica de *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis* em pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília: Caracterização molecular preliminar de isolados diagnosticados. Rev. Ibero-Latinoam Parasitol. 2010; 69 (2): 124-133.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, Ey PL. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. Parasitology. 1998; 116(1), 7–19.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol Biol Evol. 1999; 16(9):1135–44.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infect. Genet Evol. 2003; 3(1): 29–38.

Monis PT, Cáccio SM, Thompson RCA. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol. 2009; 25(2): 93-100.

Moosavi A, Haghighi A, Mojarad EN, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, Kazemi B, Zali MR. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. Parasitol Res. 2012; 111(6): 2311–5.

Munasinghe VS, Vella NG, Ellis JT, Windsor PA, Stark D. Cyst formation and faecal-oral transmission of *Dientamoeba fragilis*--the missing link in the life cycle of an emerging pathogen. Int J Parasitol. 2013;43(11):879-83.

Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya MK, Krishnan T, Ganguly S, Saha DR, et al. Emerging trends in the etiology of enteric pathogens as evidenced from an active surveillance of hospitalized diarrhoeal patients in Kolkata, India. Gut Pathog. 2010; 2(1): 4.

Nichols GL, Chalmers RM, Hadfield SJ. Molecular Epidemiology of Human Cryptosporidiosis. In: Cacciò SM, Widmer G. *Cryptosporidium*: parasite and disease. Springer. New York, 2014 p.81-148.

Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a

human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 1976; (4): 592-8.

Ögren J, Dienus O, Löfgren S, Iveroth P, Matussek A. *Dientamoeba fragilis* DNA detection in *Enterobius vermicularis* eggs. *Pathog Dis*. 2013; 69(2):157-8.

Organização Mundial da Saúde. Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2000; 1: 1191.

Parija SC, Jeremiah S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop Parasitol*. 2013; 3(1):17-25.

Peng MM, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante AA, Weltman AC, Ong CS, Mac Kenzie WR, Lal AA, Beard CB. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg Infect Dis*. 1997; 3(4):567-73.

Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog*. 2012; 8(3).

Ramírez JD. et al. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol*. 2014; 22: 223-8.

Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of *Cryptosporidiosis* in humans and animals. *Microbes Infect*. 2004; 6 (8):773-85.

Röser D, Nejsun P, Carlsgart AJ, Nielsen HV, Stensvold CR. DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. *Exp Parasitol*. 2013;133(1):57-61.

Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol*. 2013; 43 (12-13):943-56.

Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, Mundim MJ, Cury MC. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis*

infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(8):473-9.

Savioli L, Smith H, Thompson RCA. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends Parasitol.* 2006; 22(5): 203–08.

Scicluna SM., Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist.* 2006; 157(1): 77-85.

Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. Global etiology of travelers’ diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80(4):609–614.

Shikani H, Weiss LM. Human Cryptosporidiosis: A Clinical Perspective. In: Cacciò SM, Widmer G. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer. New York, 2014 p. 383-422.

Stark D1, Barratt JL, van Hal S, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(4):634–50.

Smith HV, Cáccio SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RC. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.* 2006; 22 (4): 160-7.

Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. *Vet. Parasitol.* 2007; 149(3-4):258-64.

Sprong H, Cacciò SM, Broglia A, Nöckler K, Enemark HL, Giles M, et al. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(12):e558.

Stark D, Phillips O, Peckett D, Munro U, Marriott D, Harkness J, Ellis J. Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: an update on the life cycle and host distribution. *Vet Parasitol.* 2008; 151(1):21-6.

Stark D1, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. A review of the clinical

presentation of dientamoebiasis. Am J Trop Med Hyg. 2010; 82(4):614-9.

Stensvold CR, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes--a consensus. Trends Parasitol. 2007; 23(3):93-6.

Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev. 1996; 9(4):563-84.

Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA. Malnutrition and parasitic helminth infections. Parasitology, 121, (S23–38), 2000.

Stiles CW. Parasitological observations made in Orange County, Florida. Helminthol. Soc Wash. 1932; (19): 90.

Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, Tan-Ariya P, Viputtigul K, Sudatis A, Noonai A, Leelayoova S. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 2003; 41(3):967–75.

Thomaz A, Meireles MV, Soares RM, Pena HF, Gennari SM. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. Vet Parasitol 2007; 150(4):291-6.

Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potencial. Int J Parasitol. 2000; 30(12-13): 1259-67.

Thompson RC, Smith A. Zoonotic enteric protozoa. Vet Parasitol. 2011; 182 (1): 70-8.

Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: a phylogenetic analysis. Acta Trop. 2007; 102(1): 258-62.

Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RC, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(8):3386-91.

Xiao L, Ryan U. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. Curr Opin Infect Dis. 2004; 17(5):483-90.

Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*. 2010; 124(1): 80-9.

Yakoob J. et al. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res*. 2010; 107(3): 679–84.

Widmer G, Lee Y. Comparison of single- and multilocus genetic diversity in the protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis*. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76(19):6639-44.

World Health Organization. The World Health Report. Fighting Disease Fostering Development, Geneva, Switzerland. 1997.

Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil.

¹Érica Boarato David, ¹Semíramis Guimarães, ¹Ana Paula de Oliveira, ¹Teresa Cristina Goulart de Oliveira-Sequeira, ¹Gabriela Nogueira Bittencourt, ²Ana Rita Moraes Nardi, ¹Paulo Eduardo Martins Ribolla, ²Regina Maura Bueno Franco, ²Nilson Branco, ³Fabio Tosini, ³Antonino Bella, ³Edoardo Pozio and ³Simone M. Cacciò

¹Parasitology Department, Institute of Bioscience, São Paulo State University (UNESP), Campus de Botucatu, Botucatu, São Paulo, PO Box: 510; CEP: 18618-970, Brazil; ²Department of Animal Biology, Biology Institute, State University of Campinas, Rua Monteiro Lobato 255, Campinas, São Paulo, PO Box: 6109 CEP: 13083-970, Brazil; ³Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, Rome 00161 Italy

Corresponding author

Simone M. Cacciò, Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, Rome 00161 Italy. E-mail: simone.caccio@iss.it, phone: +39 06 4990 3016; fax +39 06 4990 3561

Abstract

BACKGROUND: Several species of protozoa cause acute or chronic gastroenteritis in humans, worldwide. The burden of disease is particularly high among children living in developing areas of the world, where transmission is favored by lower hygienic standards and scarce availability of safe water. However, asymptomatic infection and polyparasitism are also commonly observed in poor settings. Here, we investigated the prevalence of intestinal protozoa in two

small fishermen villages, Porto Said (PS) and Santa Maria da Serra (SM), situated along the river Tietê in the State of São Paulo, Brazil. The villages lack basic public infrastructures and services, such as roads, public water supply, electricity and public health services.

METHODS: Multiple fecal samples were collected from 88 individuals in PS and from 38 individuals in SM, who were asymptomatic at the time of sampling and had no recent history of diarrheal disease. To gain insights into potential transmission routes, 49 dog fecal samples (38 from PS and 11 from SM) and 28 river water samples were also collected. All samples were tested by microscopy and PCR was used to genotype isolates of *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis* and *Cryptosporidium* spp..

RESULTS: By molecular methods, the most common human parasite was *Blastocystis* spp. (prevalence, 45% in PS and 71% in SM), followed by *D. fragilis* (13.6% in PS, and 18.4% in SM) and *G. duodenalis* (18.2% in PS and 7.9% in SM); *Cryptosporidium* spp. were not detected. Sequence analysis revealed large genetic variation among *Blastocystis* isolates, with subtypes (STs) 1 and 3 being predominant, and with the remarkable absence of ST4. Among *G. duodenalis* isolates, assemblages A and B were detected in humans, whereas assemblages A, C and D were found in dogs. Finally, all *D. fragilis* isolates from humans were genotype 1. A single dog was found infected with *Cryptosporidium canis*. River water samples were negative for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts.

CONCLUSIONS: This study showed a high carriage of intestinal parasites in asymptomatic individuals from two poor Brazilian villages, and large genetic variability of *Blastocystis* spp and *G. duodenalis* isolates.

KEYWORDS: Brazil; intestinal protozoa; humans; dogs; river water; molecular typing

BACKGROUND

Human infection with gastrointestinal parasites are common worldwide, but cause significant higher morbidity and mortality in developing countries, particularly among children, where many communities still lack access to improved sanitation facilities [1]. Infection can

cause acute or chronic gastroenteritis, but a considerable percentage of infected individuals show no symptoms. Among protozoa, species of *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis*, *Entamoeba* and *Dientamoeba* are the most common etiological causes of gastrointestinal infections.

In many laboratories of developing countries, microscopic examination of stools for detection of cysts, oocysts and trophozoites remains the diagnostic method of choice, due to the low cost of reagents. However, optical microscopy requires considerable technical expertise, is time consuming and, in most cases, does not allow determination of the parasite at the species/genotype level. Molecular methods are more expensive and require specific equipments, but have higher specificity and sensitivity compared to microscopy, and are therefore increasingly used to detect and characterize gastrointestinal protozoa. Furthermore, the large genetic variability observed among isolates of intestinal protozoan species has lead to the description of many genotypes and subtypes that have been found to differ in host range, zoonotic potential and clinical significance [2-4] therefore strongly impacting on our knowledge of the epidemiology of parasitic infection.

Previous surveys on gastrointestinal parasites in humans from Brazil have mainly focused on *Giardia* and *Cryptosporidium*, and investigated the prevalence of infection in risk groups, like children attending daycare centers [5,6], residents of low-income communities [7,8] and HIV patients [9]. Epidemiologic studies have shown that adverse health effects can occur in children infected with multiple gastrointestinal parasites, particularly those from families with extremely low socioeconomic status [5]. However, asymptomatic carriage of single or multiple gastrointestinal parasites has also been reported in many studies [10].

Given the public health significance of the intestinal protozoa infections, the present study aimed at determining the prevalence and the genetic diversity of gastrointestinal protozoa in humans living in two poor villages situated along the river Tietê in the State of São Paulo, Brazil, and at exploring potential transmission routes by testing animal (dogs) and environmental (river water) samples.

METHODS

Study area and population

This work was conducted in two small fisherman villages in the State of São Paulo, Brazil, namely Porto Said (PS), located close to the city of Botucatu (latitude 22° 53' 9" S, longitude 48° 26' 42" W), and Santa Maria (SM), located close to the city of Santa Maria da Serra (latitude 22°34'1"S, longitude 48°9'39"W) (Figure 1). These villages are important centers of fishing in the Middle Tietê Basin, and together gather approximately 50 families, mostly coming from the poorest regions of the country. These communities lack basic public infrastructures, such as roads, water supply and electricity, and health services. The living conditions are poor, as most families live in makeshift huts covered with plastic and wood, or in small brick and wood houses near the river. For sanitation, homes have cesspools. Drinking water is obtained from cistern wells or from clandestine connections to official network. Free roaming animals, including dogs, cats and chickens, are present in both villages. The river is not used as a source of drinking water, but the population is exposed to river water due to occupational or recreational activities.

Ethical statement

The study was approved by the Research Ethics Committees of the Botucatu Medical School, UNESP (protocol number 3898/2011 CEPE) and Animal Experimentation/Biosciences Institute/UNESP (protocol number 306-CEEA). Individuals provided an informed consent prior to sample collection.

Collection and processing of fecal samples

Fecal samples were collected from October 2011 to April 2013. Formal consent was obtained from 88 of the 107 individuals living in the Porto Said village, and from 38 of the 43 individuals living in the Santa Maria village. All individuals received a package with three collectors containing a 2.5% potassium dichromate solution, and were asked to collect three fecal specimens on alternate days. Single fecal samples from dogs (38 in PS and 11 in SM) were also collected in plastic containers and preserved as described above. Fecal samples from

chickens and cats could not be collected because of lack of consent from bird owners, and due to the risk of sampling cats that were not vaccinated against rabies.

The fecal material (from humans or dogs) was transferred to test tubes and washed three times with distilled water (800xg for three minutes) to remove potassium dichromate. An aliquot of fecal sediment was stained with Lugol's iodine, and observed at 40X under an optical microscope (Leica DM750). A second aliquot was processed by flotation with zinc sulfate, and examined microscopically by the same procedure.

River water samples collection and processing

Water samples from the Tietê River were collected during both the dry and the rainy seasons, from four distinct points in PS and from three distinct points in SM. At each site, two samples of five liters each were collected one meter away from the river bank and 10-15 cm below the surface. The turbidity and the pH were measured for each sample. The procedures were performed according to the USEPA 1623 Method [12]. Samples were first filtrated through membranes of mixed esters of cellulose (47 mm diameter, nominal porosity of 3µm, Millipore®), with the modifications described in [11]. After this step, the membranes were scraped with a smooth-edged plastic loop and rinsed with a solution containing 0.1% Tween 80 for 20 minutes. The eluted material was centrifuged for 15 minutes at 1050 x g and the sediment was washed once with Milli-Q water and centrifuged again. Immunomagnetic separation (IMS) of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts was performed using the Dynabeads® GC-combo kit (Idexx Laboratories, USA) according to the manufacturer's instructions. After IMS, samples were examined by a direct immunofluorescence assay using the Merifluor kit (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, USA), and nucleic acid were stained with the fluorogenic dye DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole).

Molecular analysis of intestinal protozoa

Genomic DNA was extracted from 200 mg of fecal sediments or from purified water samples using the QIAamp® Stool mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. For *Blastocystis* spp., amplification of a ~600 bp fragment of the

small subunit ribosomal RNA (ssu rDNA) gene was carried out as described by [13]. For *Giardia*, amplification of a 511 bp fragment of the beta-giardin gene (*bg*), and of a 530 bp of the triose phosphate isomerase (*tpi*) gene followed described protocols [14,15]. For the glutamate dehydrogenase (*gdh*) gene, amplification of a 530 bp fragment [16], or of a 430 bp fragment [17] were performed. For *Dientamoeba fragilis*, amplification of a ~300 bp fragment of the ssu rDNA gene was performed as previously described [18]. For *Cryptosporidium* spp., a nested PCR protocol for the amplification of a ~590 bp fragment of the ssu rDNA was used [19].

All PCR reactions were performed in a final volume of 50 μ l containing 25 μ l of 2x GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 μ l of each primer (10 pmol/ μ l), 5 μ l of extracted DNA and 18 μ l of sterile water. Aliquots (5-10 μ l) of PCR reactions were loaded on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Positive PCR products were purified using spin columns (QiaQuick PCR purification kit, Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced on both strands.

In cases where amplification of more than one microorganism was suggested by the analysis of chromatograms, the corresponding PCR products were cloned using the pGEM®T easy kit (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's instructions. Plasmids were purified using a commercial kit (QiaMiniPrep, Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced on both strands using vector primers.

PCR products were sequenced from both strands using the ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequencing reactions were analysed using the ABI PRISM® 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems). Chromatograms were edited and assembled using the SeqMan 7.1 software package (DNASTAR, Madison, WI, USA). Species, genotypes or subtypes were identified by BLAST searches (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), and *Blastocystis* alleles were further identified at the *Blastocystis* database (<http://pubmlst.org/blastocystis/>). Novel sequences have been deposited in the NCBI nucleotide database.

Statistical analysis

Data were summarized by absolute frequency and percentage. The differences between proportions were evaluated by the Chi-square test or, when appropriate, Fisher's exact test. Statistical analyses were carried out using STATA software version 11.2 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

RESULTS

Microscopic detection of intestinal parasites

All individuals (n=126) were considered asymptomatic, since stools were scored as formed at the time of collection and no episode of diarrhea was reported during the two months prior to sample collection. Out of the 126 individuals studied, 83 (65.9%) were positive for at least one intestinal parasite (Table 1). Among the 88 individuals from PS, 24 (27.3%) were positive for *Entamoeba coli*, 6 (6.8%) for *G. duodenalis*, one (1.1%) for *Blastocystis* spp., and one (1.1%) for *Iodamoeba bütschlii*. Among the 38 individuals from SM, 9 (23.7%) were positive for *Blastocystis* spp., 7 (18.4%) for *E. coli*, 6 (15.8%) for *G. duodenalis*, and one (2.6%) for *Endolimax nana*. Concerning helminthes, microscopy revealed three cases of hookworms and one case of *Strongyloides stercoralis* infection in individuals from PS (Table 1). The prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Dientamoeba fragilis* was not estimated, as diagnosis requires permanent staining of fecal smears.

Giardia duodenalis cysts were identified in 3 of the 38 (7.9%) dog fecal samples from PS and in one of the 11 (9.1%) dog fecal samples from SM. Eggs of *Ancylostoma* spp. were detected in 27 (71.1%) dog fecal samples from PS, and in 7 (63.6%) dogs from SM. Other helminthes, like *Toxocara*, *Trichuris* and *Spyrocerca*, were detected at a lower frequency (Table 1).

Molecular detection of intestinal protozoa

The prevalence of protozoa in human samples as detected by PCR were as follows: in the PS village, 45% (40 of 88) for *Blastocystis* spp., 18.2% (16 of 88) for *G. duodenalis*, 13.6% (12 of 88) for *D. fragilis*, and 0% for *Cryptosporidium*, whereas in the SM village, 71% (27 of 38) for

Blastocystis spp., 7.9% (3 of 38) for *G. duodenalis*, 18.4% (7 of 38) for *D. fragilis*, and 0% for *Cryptosporidium* (Tables 2 and 3).

Analysis of single and multiple infections

In individuals from PS, double infections with *Blastocystis* spp and *G. duodenalis* (n=2; Table 2) were found to occur at a frequency lower than expected (Chi-square test, p=0.011), whereas double infections with *Blastocystis* spp. and *D. fragilis* (n=8; Table 2) were found at a frequency higher than expected (Chi-square test, p=0.019). Two cases of triple infections were observed. As expected, the prevalence of *G. duodenalis* infection was higher in children compared to adults (data not shown), but this doesn't explain the low number of co-infection with *Blastocystis* spp, as this parasite was also commonly detected among children.

In individuals from SM, double infections with *Blastocystis* spp. and *G. duodenalis* or with *Blastocystis* spp. and *D. fragilis* occurred at the expected frequency. One case of triple infection was observed (Table 3).

When the data from both villages were combined, double infections with *Blastocystis* spp. and *G. duodenalis* (n=3) were found to occur at a frequency lower than expected (Chi-square test, p=0.003), whereas double infections with *Blastocystis* spp and *D. fragilis* (n=12) were found at a frequency higher than expected (Chi-square test, p=0.057).

We also investigated the distribution of *Blastocystis* STs in PS (Table 2) and noted that 15 of 16 cases of infection with ST3 occurred as single infections compared to 13 of 20 for ST1 (Fisher's test, p=0.002). However, this was not observed in SM (Table 3), where ST3 was found in combination with *D. fragilis* (3 cases) or with other *Blastocystis* STs (one with ST7 and one case with ST1).

Typing of *Blastocystis* spp.

Among individuals from PS, sequencing of a fragment of the ssu rDNA gene indicated the presence of ST1 (20 samples), ST2 (3 samples) and ST3 (16 samples) subtypes. BLAST search at the *Blastocystis* subtype database further allowed to identify alleles 4 and 81 within ST1, alleles 11 and 12 within ST2, alleles 34, 36 and 37 within ST3 (Table 2). Mixed infections

with two ST1 alleles (4 and 81), two ST3 alleles (34 and 36), and two ST6 alleles (122 and 134) were each found in single samples (Table 2).

Among individuals from SM, sequencing indicated the presence of ST1 (3 samples), ST2 (4 samples), ST3 (13 samples), ST6 (1 sample) and ST7 (4 samples) subtypes. BLAST search at the *Blastocystis* allele database further allowed to identify allele 4 of ST1, alleles 9, 10 and 12 of ST2, alleles 34, 36 and 37 of ST3, and allele 96 of ST7 (Table 3). Mixed infections with two ST3 alleles (36 and 128), two ST6 alleles (122 and 134) and two ST7 alleles (96 and a novel allele) were each found in single samples. Two mixed infections with different subtypes (one with ST3+ST7, and one with ST1+ST3) were found after cloning of the PCR products and sequencing of five individual plasmids (Table 3). Phylogenetic analysis confirmed that the *Blastocystis* isolates belonged to strongly supported clusters, i.e., to different STs (data not shown).

All dog samples (38 from PS and 11 from SM) were negative for *Blastocystis* by PCR.

Typing of *Giardia duodenalis*

Among individuals from PS, sequencing revealed assemblage A in 8 isolates and assemblage B in 9 isolates (Table 2). Among assemblage A isolates, genotype A1 was found at the *tpi* locus in 1 isolate, whereas genotype A2 was found in all other isolates, regardless of the marker (Table 2). Among assemblage B isolates, a single genotype was found at the *tpi* locus, which was identical to that reported in different hosts (humans and a dog) and in a wastewater sample. At the *bg* locus, 3 different genotypes were found: the first was identified in 5 isolates, and had 100% identity with previously described isolates from humans and a macaque; the second was found in 2 isolates, had 100% identity with previously described isolates from humans, from a calf and from reference strains; the third was found in 1 isolate, had 100% identity with a previously described human isolate from Uganda. At the *gdh* locus, two genotype were found: the first was identified in 4 isolates and had 100% identity with previously described isolates from humans, whereas the second, found in 1 isolate, had 100% identity with animal isolates (chinchillas and a rabbit) and with reference strains (Ad-45 and

Ad-28). Two isolates were analyzed by sequencing a different *gdh* fragment (Table 2), and two genotypes were found, one having 100% identity with a single human isolate, whereas the other had 99% identity with many isolates, including the reference strain Ad-45 and Ad-28.

Among humans from SM, assemblage A was found in 2 isolates, and genotype A2 was identified at the *bg* or *tpi* locus, respectively (Table 3). A single isolate was typed as assemblage B at 3 loci, and genotypes found in the PS village were identified.

Regardless of the village and the *G. duodenalis* assemblage, inspection of sequencing files did not show the presence of double peaks (overlapping nucleotides at specific positions), indicating a lack of allelic sequence heterogeneity in these isolates. For 7 isolates from assemblage B, sequence information was available at 3 loci (Table 2 and 3), and two multi-locus genotype (MLG) were detected, one found in 5 isolates and the other in 2 isolates. Phylogenetic analyses of single or concatenated genes showed a closer relationship of Brazilian isolates with reference sequences of assemblage B, sub-assemblage BIV (data not shown).

A total of 49 dog fecal samples were tested by PCR, and amplification of at least one gene fragment was obtained from 6 isolates, 4 from PS and 2 from SM. Genotype A2 was identified in 2 dogs from PS (at the *bg* and *tpi* loci, and at the *bg* and *gdh* loci, respectively) and in one dog from SM (at the *bg* locus). Assemblage C was identified at the *tpi* locus in one dog from PS, and at all the 3 loci in one dog from SM. Assemblage D was identified at the *bg* and *gdh* loci in one dog from PS.

Typing of *Dientamoeba fragilis*

Sequencing of the PCR products from the 19 human samples positive for *D. fragilis* (12 from PS and 7 from SM) showed the presence of genotype 1 in all samples (100% identity to AY730405; Tables 2 and 3).

All dog samples (38 from PS and 11 from SM) tested negative by PCR.

Typing of *Cryptosporidium* spp.

Sequencing of a fragment of the SSU rDNA gene from the single dog sample positive revealed the presence of *Cryptosporidium canis* (100% identity to GenBank AB210854).

Analyses of river water samples

The analysis of 28 river water samples did not reveal the presence of *Cryptosporidium* oocysts or *Giardia* cysts, based on results of both microscopy and PCR. The levels of turbidity of water samples collected during the dry (average values, PS=8.66 NTU, SM=12.64 NTU) and the rainy (average values, PS= 28.53 NTU, SM= 20.59 NTU) seasons, were within a range which is considered appropriate for the applied methodology; pH values were close to neutrality.

The DNAs extracted from water samples were also tested by PCR for *Blastocystis* spp., and amplification was observed from 3 samples collected in PS. Direct sequencing of PCR products generated overlapping chromatograms, likely arising from amplification of more than one DNA template (data not shown). The corresponding PCR products were cloned and individual plasmids (n=12) were sequenced. This allowed the identification of sequences having significant identity (99%) to an uncultured stramenopile identified in a study of the lake Taihu, China (GenBank GQ844623), and to an uncultured dictyochophyte identified in a study of the lake Esch sur Sure, Luxembourg (GenBank GU068032). These eukaryotic microorganisms were both present in the 3 water samples from PS, whereas *Blastocystis* spp. was not identified in any of these samples.

DISCUSSION

The main objective of this study was to investigate the occurrence and the genetic diversity of intestinal protozoa in the stools of asymptomatic individuals living in two poor villages located along the Tietê river, State of São Paulo, Brazil. All samples were tested by microscopy and PCR. As expected, PCR detected a higher number of infection than microscopy, likely because of the small number of parasites shed with the feces of asymptomatic individuals, or, in the case of *Dientamoeba fragilis* and *Cryptosporidium* spp., because microscopic detection requires permanent staining procedures which were not used in this study.

We will first discuss some general implications of the present findings. As mentioned

above, overt intestinal symptoms were not observed among the individuals from two villages, yet they were frequently infected with one or more parasites. A comparison of the prevalence of different protozoa in the two villages showed that double infections with *Blastocystis* spp. and *G. duodenalis*

occurred at a frequency lower than expected in individuals the PS village, and that this result was not explained by the higher frequency of *Giardia* among young individuals. The same trend was not observed in SM, albeit it should be noted that *Blastocystis* spp was highly prevalent in this village while *G. duodenalis* was rarely found. We also observed that double infections with *Blastocystis* spp. and *D. fragilis* occurred at a frequency higher than expected in individuals from the PS village, but not in those from the SM village. An association between *Blastocystis* spp. and *D. fragilis* has been recently reported in a study of children presenting with gastrointestinal symptoms [20]. Furthermore, we noticed that single infections with *Blastocystis* ST3, but not with ST1, were found at a frequency higher than expected in the PS village; however, this was not observed in the SM village. Further investigations are needed to understand whether these observations may reflect real biological interactions among different protozoa that colonize the human gut.

Other surveys conducted in Brazil, both in rural and urban contexts [5-10], also identified frequent asymptomatic infection caused by *Blastocystis* spp. and *G. duodenalis*. This suggests that, where infections are endemic, humans elicit an immune reaction that minimizes the deleterious effects of a given parasite (immunological tolerance) without achieving parasites' clearance, a concept well established in the case of helminthic infections [21]. On the other hand, there are clear evidences that *Cryptosporidium* and *Giardia* can cause severe diarrhea in children, particularly in malnourished children, with a significant impact on growth and cognitive function [22]. Thus, understanding which parasite and host factors are responsible for acute enteritis and long term adverse health effects remains an important area of research. In perspective, important insights into further mechanisms can be obtained by metagenomics analysis of the complex gut microbiota.

Some interesting comments were derived from the molecular characterization of

intestinal protozoa that was performed. In the case of *Blastocystis* spp., which was the most common human parasite in both villages, the most remarkable finding was the absence of ST4, which confirmed previous studies from South America [23-25]. Indeed, ST4 has been identified only in a few non-human primates in South America [25,26], in contrast with data from Europe where ST4 has been linked to symptomatic infection and to irritable bowel disease in humans [26].

Further studies are needed to understand the origin of this ST, which, compared to other human-associated STs, displays lower genetic variability, thus suggesting its recent acquisition as a parasite of humans [27]. Moreover, when the PCR assay that is commonly used to detect *Blastocystis* spp. in feces [13] was applied to water samples, other eukaryotic microorganisms were identified. In particular, sequences with very high homology (99%) to stramenopiles and dictyochophytes from freshwater lakes were identified in three water samples from the PS village. As commented in the original article [13], the primers were developed to detect *Blastocystis* in fecal samples from vertebrate hosts or from *in vitro* cultures, and not from environmental samples, and the homology to other stramenopiles, that was noticed by the investigators, was considered not relevant. To our knowledge, only a few studies have applied PCR to detect and type *Blastocystis* spp. in water samples. In a study from Turkey, tap water samples were tested using subtype-specific sequenced-tagged site primers, and ST1 was identified in 3 of 25 samples [28]. In central Nepal, water samples from two rivers were tested using subtype-specific sequenced-tagged site primers and found to contain *Blastocystis* ST1 and ST4 [29]. In wastewater samples assessed in the Philippines [30], *Blastocystis* ST1 and ST2 subtypes were identified by PCR of full length ssu rDNA using the primers described by [31], but detection was done after *in vitro* cultivation of the parasite. Our findings highlight a need to design and test new primers for the specific amplification of *Blastocystis* spp. from water samples, and even from food samples.

In the case of *G. duodenalis*, typing of human isolates showed the presence of sub-assemblage AII (mainly genotype A2) and sub-assemblage BIV. A literature survey of other studies on human giardiasis in Brazil showed that genotype A1 (sub-assemblage AI) was

identified more often (98 isolates) than genotype A2 (sub-assemblage AII, 47 isolates) [32,33]. This contrasts with the data obtained in Europe and other parts of the world where genotypes of sub-assemblage AII (mainly genotype A2) predominate in humans [34]. On the other hand, the identification of the BIV sub-assemblage is in agreement with a previous study of 8 human isolates from Brazil based only on *gdh* sequencing [33]. Typing of *G. duodenalis* isolates from dogs revealed both zoonotic (A2) and non-zoonotic (C and D) assemblages. The occurrence of genotype A2 likely reflects the exposure of dogs to cysts of human origin, resulting from an inadequate disposal of sewage in the PS and SM villages. In previous studies from Brazil, both zoonotic (genotypes A1 and A2) and non-zoonotic (assemblages C and D) strains were detected in dogs [32, 33]. The role of dogs as reservoirs of zoonotic assemblages of *G. duodenalis* has been widely discussed in the literature [36,37]. The available data show that the host-specific assemblages are largely more prevalent than zoonotic assemblages, worldwide, and only a few surveys conducted in poor settings have provided evidence for a transmission cycle between humans and dogs [38].

In the case of *D. fragilis*, this is the first study to characterize isolates from South America at the molecular level. Sequencing of an *ssu rDNA* gene fragment revealed the presence of genotype 1 in all of the 19 positive human samples. Information about this parasite is scanty, but of the 2 confirm this observation.

Finally, the absence of *Cryptosporidium* spp. was not surprising, as infection with this parasite is usually symptomatic and associated with watery diarrhea, abdominal pain, nausea and vomiting. Asymptomatic carriage has been reported, but detection of the very low number of oocysts in the feces remains challenging [40]. The absence of *Cryptosporidium* oocysts in the river water samples tested, and the finding of *Cryptosporidium canis* in the single positive dog, suggest a limited circulation of *Cryptosporidium* species pathogenic to humans in the study area.

This study has some limitations. First, only one staining technique was used for the microscopic detection of parasites and stool samples were preserved in potassium dichromate; this may have affected the detection of some species, particularly *D. fragilis* and

Cryptosporidium spp. Second we have been unable to collect fecal samples from chickens and cats, and thus to investigate their potential role in the transmission of intestinal protozoa to humans. It is noticeable that in the SM village, infection with *Blastocystis* ST6 and ST7 have been detected, and, since birds are the main host of these STs, it would have been valuable to test chickens for the presence of this parasite. More generally, strong conclusions about the routes of transmission in the two villages could not be reached. The fact that different *Blastocystis* STs and different *G. duodenalis* assemblages were found among members of a single family indicates multiple sources of exposure and suggests a role of the environment in the transmission. On the other hand, the detection of a single ST or assemblage in other families is more likely explained by direct person-to-person transmission within households.

CONCLUSIONS

A high carriage of intestinal protozoa characterized the populations under study, and many individuals carried multiple parasites in the lack of apparent gastrointestinal symptoms. The large genetic heterogeneity observed among isolates of *Blastocystis* and *Giardia* suggests exposure to multiple sources, including person-to-person contacts and contaminated water or food.

Author's contributions

Conceived and designed the experiments: SG, TCGOS, EBD. Performed the experiments: EBD, APO, GNB, ARMN. Field work organization and sample collection: TCGOS, SG, EBD, APO and GNB. Analyzed the data: EBD, SG, AB, SMC. Contributed reagents/materials/analysis tools: SG, SMC, PEMR. Water samples processing: RMBF, NB. Wrote the paper: EBD, SG, TCGOS, FT, EP, SMC.

Conflict of Interests

The authors declared that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have

influenced its outcome.

Acknowledgements

This work was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants to SG (2011/52100-3). EBD was supported by FAPESP fellowship. APO and ARMN were sponsored by CAPES fellowships. The authors would like to thank all families that participated in the study. We also thank Patrícia Borim for technical support.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Map of the area showing the location of the two villages along the Tietê river, State of São Paulo, Brazil.

REFERENCES

1. Harhay MO, Horton J, Olliaro PL: **Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children.** Expert Rev Anti Infect Ther 2010, **8**:219-34.
2. Chalmers RM, Katzer F: **Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis.** Trends Parasitol 2013, **29**:237-251.
3. Ryan U, Cacciò SM: **Zoonotic potential of *Giardia*.** Int J Parasitol 2013, **43**:943-956.
4. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR: **Recent developments in *Blastocystis* research.** Adv Parasitol 2013, **82**:1-32.
5. Lander RL, Lander AG, Houghton L, Williams SM, Costa-Ribeiro H, Barreto DL, Mattos AP, Gibson RS: **Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in**

- preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast Region of Brazil.** Cad Saúde Pública 2012, **28**:2177-2188.
6. Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, Mundim MJ, Cury MC: **Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil.** Trans R Soc Trop Med Hyg 2012, **106**:473-479.
7. Moraes Neto AH, Pereira AP, Alencar M de F, Souza PR Jr, Dias RC, Fonseca JG, Santos CP, Almeida JC: **Prevalence of intestinal parasites versus knowledge, attitudes, and practices of inhabitants of low-income communities of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil.** Parasitol Res 2010, **107**:295-307.
8. Gil FF, Busatti HG, Cruz VL, Santos JF, Gomes MA: **High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group.** Pathog Glob Health 2013, **107**:320-324.
9. Assis DC, Resende DV, Cabrine-Santos M, Correia D, Oliveira-Silva MB: **Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients.** Rev Inst Med Trop São Paulo 2013, **55**:149-154.
10. Nobre LN, Silva RV, Macedo MS, Teixeira RA, Lamounier JA, Franceschini SC: **Risk factors for intestinal parasitic infections in preschoolers in a low socio-economic area, Diamantina, Brazil.** Pathog Glob Health 2013, **107**:103-106.
11. Franco RM, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R: **Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil.** Rev Inst Med Trop São Paulo 2001, **43**:109-111.
12. United States Environmental Protection Agency (USEPA) Office of Water. Washington

- DC. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA.** 2005, EPA-815-R-05-002.
13. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG: **DNA barcoding of *Blastocystis*.** Protist 2006, **157**:77-85.
14. Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Cacciò SM, Pozio E: **Genotyping of *Giardia* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay.** J Parasitol 2005, **91**:203-205.
15. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L: **Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*.** Emerg Infect Dis 2003, **9**:1444-1452.
16. Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E: **Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B.** Int J Parasitol 2008, **38**:1523-1531.
17. Read CM, Monis PT, Thompson RCA: **Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP.** Infec Genet Evol 2004, **4**:25-30.
18. Cacciò SM, Sannella AR, Manuali E, Tosini F, Sensi M, Crotti D, Pozio E: **Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans.** Emerg Infect Dis 2012, **18**:838-481.
19. Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlasek I: **Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic.** Appl Environ Microbiol 2003, **69**:4302-4307.

20. Maas L, Dorigo-Zetsma JW, de Groot CJ, Bouter S, Plötz FB, van Ewijk BE: **Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR.** Clin Microbiol Infect 2014, **20**:545-550.
21. Johnston CJ, McSorley HJ, Anderton SM, Wigmore SJ, Maizels RM. **Helmints and immunological tolerance.** Transplantation 2014, **97**:127-132.
22. Checkley W, White AC Jr, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen X, Fayer R, Griffiths JK, Guerrant RL, Hedstrom L0, Huston CD1, Kotloff KL2, Kang G3, Mead JR4, Miller M5 Petri WA Jr, Priest JW, Roos DS1, Striepen B7, Thompson RC, Ward HD9, Van Voorhis WA, Xiao L4, Zhu G, Houpt ER. **A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*.** Lancet Infect Dis 2015,**15**:85-94.
23. Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R: **Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals.** Parasitol Res 2011, **109**:205-212.
24. Malheiros AF, Stensvold CR, Clark CG, Braga GB, Shaw JJ: **Short report: Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil.** Am J Trop Med Hyg 2011, **85**:1050-1053.
25. Ramírez JD, Sánchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Flórez AC, Stensvold CR: ***Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia.** Infect Genet Evol 2014, **22**: 223-228.
26. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark

- CG: **Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications.** Acta Trop 2013, **126**:11-18.
27. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG: **Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes.** Infect Genet Evol 2012, **12**:263-273.
28. Eroglu F, Koltas IS: **Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method.** Parasitol Res 2010, **107**:841-845.
29. Lee LI, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK: ***Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility?** Parasit Vectors 2012, **5**:130. doi: 10.1186/1756-3305-5-130.
30. Banaticla JE, Rivera WL: **Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines.** J Water Health 2011, **9**:128-137.
31. Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano L, Wu Z, Takahashi Y: **Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities.** J Clin Microbiol 2000, **38**:1324-1330.
32. Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM: **Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene.** Vet Parasitol 2007, **149**:258-264.
33. Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O: **Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis.** Acta Trop 2007, **102**:10-19.

34. Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW; ZOOPNET network and partners: **Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis***. PLoS Negl Trop Dis 2009, **3**:e558.

35. Volotão AC, Ramos NM, Fantinatti M, Moraes MV, Netto HA, Storti-Melo LM, Godoy EA, Rossit AR, Fernandes O, Machado RL: **Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil**. Braz J Infect Dis 2011, **15**:382-383.

36. Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G, Cama VA: **Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance**. Trends Parasitol 2010, **26**:180-189.

37. Beck R, Sprong H, Pozio E, Cacciò SM: **Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: lessons from a multilocus sequence typing study**. Vector Borne Zoonotic Dis 2012, **12**:206-213.

38. Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC: **Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community**. Parasitology 2004, **128**:253-262.

39. Johnson JA, Clark CG: **Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis***. J Clin Microbiol 2000, **38**:4653-464.

40. Davies AP, Campbell B, Evans MR, Bone A, Roche A, Chalmers RM: **Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom**. Pediatr Infect Dis J 2009, **28**:838-840.

Table 1. Microscopic prevalence of parasites in human and dog faecal samples from Porto Said and Santa Maria (Tietê river, State of São Paulo, Brazil).

Parasite	Human samples	
	Porto Said (n=88)	Santa Maria (n=38)
Hookworms	1	-
<i>Blastocystis</i> spp.	-	3
<i>Entamoeba coli</i>	20	3
<i>Giardia duodenalis</i>	3	2
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	1	-
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	-
<i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis</i>	-	1
<i>E. coli</i> + <i>Blastocystis</i>	1	2
<i>G. duodenalis</i> + <i>E. coli</i>	2	1
<i>G. duodenalis</i> + Hookworms	1	-
<i>E. coli</i> + Hookworms	1	-
<i>G. duodenalis</i> + <i>Blastocystis</i>	-	2
<i>G. duodenalis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Blastocystis</i>	-	1

Parasite	Dog samples	
	Porto Said (n=38)	Santa Maria (n=11)
<i>Ancylostoma</i> spp.	25	3
<i>Giardia duodenalis</i>	2	-
<i>Toxocara canis</i>	2	-
<i>Trichuris vulpis</i>	-	1
<i>Ancylostoma</i> spp.+ <i>T. canis</i>	1	1
<i>Ancylostoma</i> spp.+ <i>G. duodenalis</i>	1	1
<i>Ancylostoma</i> spp.+ <i>Spirocerca</i> spp.	-	1
<i>Ancylostoma</i> spp.+ <i>T. vulpis</i>	-	1

Table 2. Genotypic characterization of *Blastocystis* spp., *Giardia duodenalis* and *Dientamoeba fragilis* from humans in the Porto Said village, State of São Paulo, Brazil.

Sex	Age	Status	<i>Blastocystis</i> subtype	<i>G. duodenalis</i> assemblage <i>bg / tpi / gdh</i>	<i>D. fragilis</i> genotype
F	45	Single	ST3	-	-
M	21	Single	ST3	-	-
M	21	Single	ST3	-	-
M	48	Single	-	-	-
F	43	Single	-	-	-
F	51	Single	-	-	-
M	48	Single	-	- / A1 / -	-
M	23	Family 1	ST3	-	-
F	23	Family 1	-	-	1
M	6	Family 1	ST1	-	1
M	44	Family 2	ST1	-	-
F	43	Family 2	ST3	-	-
M	43	Family 3	-	-	-
F	58	Family 3	ST3	-	-
F	31	Family 3	ST1	-	1
F	12	Family 3	ST3	-	-
M	10	Family 3	ST1	-	1
M	4	Family 3	-	-	-
M	29	Family 4	ST3	-	-
M	40	Family 4	-	-	-
F	42	Family 5	ST3	-	1
M	43	Family 5	-	-	-
F	15	Family 5	-	-	1
M	7	Family 5	-	-	-
M	3	Family 5	-	-	-
M	45	Family 6	ST1	-	-
F	43	Family 6	-	-	-
M	10	Family 6	-	-	-
M	3	Family 6	-	- / - / A2	-
M	47	Family 7	ST1	-	-
F	26	Family 7	ST1	-	-
M	7	Family 7	ST1	-	-
F	4	Family 7	ST1	B / B / B	1
M	46	Family 8	-	-	-
F	46	Family 8	-	-	-

F	68	Family 9	ST1	-	-
F	47	Family 9	ST1	-	-
F	31	Family 9	-	-	-
M	14	Family 9	ST1	-	-
F	12	Family 9	-	-	-
M	10	Family 9	-	B / - / -	-
M	7	Family 9	ST1	-	-
F	5	Family 9	-	-	-
M	51	Family 10	ST1	-	1
F	38	Family 10	-	-	-
F	7	Family 10	-	A2 / - / -	-
F	67	Family 11	-	-	-
M	59	Family 11	ST3	-	-
M	49	Family 11	ST3	-	-
M	44	Family 12	ST2	-	1
F	35	Family 12	ST1	-	1
F	15	Family 12	ST1	A2 / - / -	-
M	13	Family 12	-	A2 / A2 / A2	-
M	10	Family 12	ST1	B / B / B	-
F	5	Family 12	-	B / B / B*	-
F	34	Family 13	-	-	-
F	13	Family 13	-	-	-
F	11	Family 13	ST3	-	-
M	31	Family 14	-	-	-
M	31	Family 14	ST3	-	-
F	51	Family 14	-	-	-
M	49	Family 15	-	-	-
F	42	Family 15	ST3	-	-
F	12	Family 15	-	-	-
M	59	Family 16	-	B / B / B*	-
F	69	Family 16	ST1	-	-
F	13	Family 16	-	-	-
F	9	Family 16	ST3	-	-
M	8	Family 16	ST2	A2 / - / -	1
M	31	Family 17	ST1	-	-
F	26	Family 17	-	-	-
M	11	Family 17	-	B / B / B	-
M	3	Family 17	-	B / B / B	-

Referências

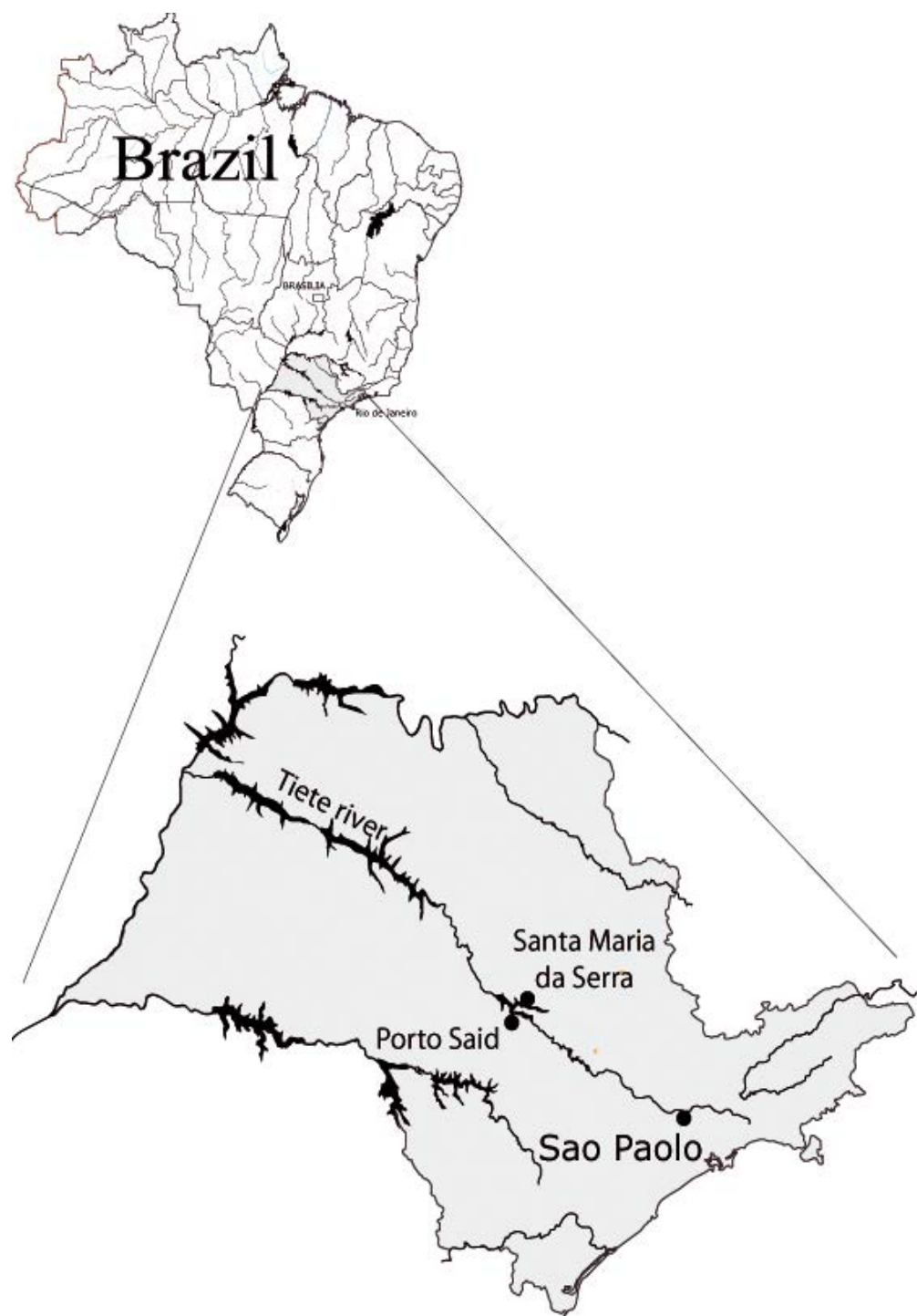
M	47	Family 18	-	-	-	
F	28	Family 18	-	-	-	
F	6	Family 18	ST1	-	-	
M	42	Family 19	-	A2 / A2 / A2	-	
F	36	Family 19	ST6	-	-	
M	13	Family 19	-	A2 / A2 / -	-	
F	5	Family 19	ST3	-	-	
M	32	Family 20	-	-	-	
F	26	Family 20	-	-	-	
F	4	Family 20	-	-	-	*, <i>gdh</i>
M	31	Family 21	-	B	-	
F	27	Family 21	-	-	-	
M	3	Family 21	-	-	-	
M	31	Family 22	-	-	-	
F	<u>39</u>	<u>Family 22</u>	<u>ST2</u>	<u>-</u>	<u>1</u>	

analysed by the method of Read et al. (2004)

Table3. Genotypic characterization of *Blastocystis* spp., *Giardia duodenalis* and *Dientamoeba fragilis* from humans in the Santa Maria village, State of São Paulo, Brazil.

Sex	Age	Status	<i>Blastocystis</i> subtype	<i>G. duodenalis</i> assemblage <i>bg tpi gdh</i>	<i>D. fragilis</i> genotype
F	46	single	ST3+ST7	-	-
F	53	single	ST3	-	-
F	36	single	ST6	- / A2 / -	-
M	42	single	-	-	1
M	48	single	ST1	-	-
F	43	single	ST3	-	-
M	35	single	ST3	-	-
M	75	single	-	-	-
M	58	single	-	-	-
F	62	single	ST3	-	-
M	34	single	ST1+ST3	-	-
M	35	single	-	-	-
M	25	Family 1	ST3	-	-
F	27	Family 1	ST1	-	-
M	2	Family 1	ST3	-	-
M	32	Family 2	ST2	-	-
F	27	Family 2	ST7	-	-
M	6	Family 2	ST3	-	1
M	7	Family 3	ST3	-	1
F	36	Family 3	-	-	-
M	35	Family 3	ST7	-	-
F	10	Family 3	ST3	-	-
F	12	Family 3	-	B / B / B	1
F	41	Family 4	ST1	A2 / - / -	1
M	9	Family 4	-	-	-
M	55	Family 5	-	-	-
F	49	Family 5	ST7	-	-
F	4	Family 6	ST2	-	-
F	24	Family 6	ST3	-	-
M	4	Family 7	-	-	-
F	62	Family 7	ST7	-	-
F	6	Family 7	ST3	-	1
M	32	Family 7	ST2	-	-
F	4	Family 7	-	-	-
F	26	Family 7	ST3	-	-
M	64	Family 8	ST2	-	1
F	47	Family 8	ST3	-	-
M	37	Family 8	-	-	-

Figure 1



6. CONCLUSÕES

1. Considerando a detecção por microscopia e PCR, os protozoários intestinais mais frequentemente observados nas populações humanas de Porto Said e Santa Maria foram *Blastocystis* spp, seguido por *D. fragilis* e *G. duodenalis*. *Cryptosporidium* spp. não foi detectado.
2. Nas populações caninas das duas comunidades, *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* foram os protozoários detectados.
3. A baixa recuperação de cistos de *Giardia* e oocisto de *Cryptosporidium* em amostras de água tem sido uma das limitações para a pesquisa destes protozoários em amostras ambientais.
4. Nas comunidades estudadas, a despeito da presença dos subtipos para *Blastocystis*, predominaram as infecções associadas aos subtipos ST3 e ST1.
5. Nas infecções humanas por *Giardia*, ambos genótipos A e B foram detectados, enquanto que nos cães, além da infecção por isolados hospedeiro-específicos C e D, isolados genótipo A também foram identificados.
6. Apenas infecções pelo genótipo 1 de *Dientamoeba* foram detectadas na população humana.
7. A grande variabilidade genética dos isolados de *Blastocystis* spp e *Giardia* sugere que estas duas populações estão expostas a diversas fontes de contaminação favorecendo assim, a ocorrência de transmissão antroponótica.