



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FELIPPE DANYEL CARDOSO MARTINS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
*Cryptosporidium* spp E *Giardia duodenalis* EM PACIENTES  
ATENDIDOS NO SISTEMA PÚBLICO DE SAÚDE**

---

Londrina  
2020

FELIPPE DANYEL CARDOSO MARTINS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
*Cryptosporidium* spp E *Giardia duodenalis* EM PACIENTES  
ATENDIDOS NO SISTEMA PÚBLICO DE SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina - UEL, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Roberta Lemos Freire.

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- 619 Martins, Felipe Danyel Cardoso.  
OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp  
E *Giardia duodenalis* EM PACIENTES ATENDIDOS NO SISTEMA PÚBLICO  
DE SAÚDE / Felipe Danyel Cardoso Martins. - Londrina, 2020.  
69 f.
- Orientador: Roberta lemos Freire.  
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,  
2020.  
Inclui bibliografia.
1. Protozoologia - Tese. 2. Saúde Pública - Tese. 3. Epidemiologia - Tese. 4.  
Epidemiologia molecular - Tese. I. Freire, Roberta lemos. II. Universidade  
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação  
em Ciência Animal. III. Título.

CDU 576.8::619

FELIPPE DANYEL CARDOSO MARTINS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
*Cryptosporidium* spp E *Giardia duodenalis* EM PACIENTES ATENDIDOS  
NO SISTEMA PÚBLICO DE SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina - UEL, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Roberta Lemos Freire  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Regina Mitsuka Breganó  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Sílvia Cristina Osaki  
Universidade Federal do Paraná -UFPR

---

Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal  
Universidade Federal do Paraná -UFPR

Londrina, 27 de fevereiro de 2020.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia Animal e no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Lemos Freire.

O recurso financeiro para o desenvolvimento do projeto foi obtido junto aos órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. Fundação Araucária/PR - Chamada Pública CP 09/2016, Programa Institucional de Pesquisa Básica e Aplicada**
- 2. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Código de Financiamento 001.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sueli e Julio por todo apoio, educação, ensinamentos de vida, além de todo esforço desempenhado para minha formação.

À minha eterna namorada Natalia Bricks Soler que esteve sempre ao meu lado com muita alegria, carinho, paciência e compreensão, sempre disposta a me ajudar e a me motivar.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Roberta Lemos Freire, pela oportunidade, por todos seus conselhos e orientações no desenvolvimento deste estudo, sempre presente e disposta a sanar minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro, por ter aceito compor a banca de qualificação, por toda confiança, conselhos, pelas oportunidades de investigações de surtos, foi peça chave na minha formação como homem e profissional.

Ao Prof João Luis Garcia, por toda orientação durante meu período de pós-graduação, pela oportunidade de colaborar com suas pesquisas e pelas correções na qualificação.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Regina Mitsuka Breganó por toda ajuda para viabilizar esta pesquisa, além das valiosas contribuições na banca de qualificação

Ao Prof. Dr Diego Averaldo Guiguet Leal e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sílvia Cristina Osaki, por disporem seu tempo para se deslocarem à Londrina e participar da banca de defesa desta tese.

À Winni, Laís, Camila, Manuela e Giovanna, grandes pessoas e ótimas estagiárias, foram essenciais no desenvolvimento deste estudo.

A todos do setor de moléstias infecciosas do Hospital Universitário Regional da Universidade Estadual de Londrina, médicos, residentes, enfermeiros e técnicos, por contribuírem com o desenvolvimento deste projeto, em especial a Profa Zuleica Naomi Tano pela coordenação do projeto no setor.

A todos do laboratório central do município, por contribuírem com o desenvolvimento deste projeto, em especial ao Edilson João Cabrera pela coordenação do projeto no setor.

À Beatriz Nino, companhia diária no laboratório e motorista oficial do projeto, por todos os conselhos e ideias para o desenvolvimento deste estudo.

Aos estagiários, e residentes por todo auxílio na realização deste projeto e sobretudo pela amizade.

À CAPES, UEL, e Fundação Araucária pelo financiamento para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que tive o prazer de conviver durante toda a minha formação na UEL, companheiros de graduação, pós-graduação e de laboratório, cada um de vocês teve um papel importante na minha formação.

“A grande dificuldade está em tentar imaginar algo que você nunca viu, que é consistente em todos os detalhes com o que já foi visto e que é diferente do que já foi pensado.”

Richard Phillips Feynman

MARTINS, Felipe Danyel Cardoso. **Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium spp* e *Giardia duodenalis* em pacientes atendidos no sistema público de saúde**. 2020. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

Os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* são importantes etiologias zoonóticas de diarreia. Diferentes métodos de diagnóstico aplicados a esses protozoários em diferentes populações resultam em variações nas estimativas de ocorrência e dificulta uma melhor compreensão da complexa epidemiologia. Estes protozoários são descritos em diversos ambientes no Brasil e a utilização de métodos moleculares possibilita uma melhor caracterização da ocorrência, e a epidemiologia molecular permite identificar o impacto da transmissão zoonótica na epidemiologia destes parasitas. A presente tese teve como objetivo caracterizar a ocorrência *Cryptosporidium* e *Giardia* em pacientes atendidos no sistema público de saúde, no município de Londrina, PR. No primeiro estudo, amostras de fezes foram coletadas de 54 pacientes internados em um hospital de referência para doenças infecciosas; dados de idade, sexo, endereço, afecção que levou ao internamento, tempo de internação e histórico clínico também foram coletados. *Cryptosporidium* e *Giardia* foram diagnosticados pela PCR para o gene 18S rRNA. Dos pacientes avaliados 68,51% (37/54) eram portadores da infecção pelo HIV, sendo que 81,08% (30/37) destes manifestavam a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS); *Cryptosporidium* foi identificado em dois pacientes (3,07%; 02/54) e *Giardia* em três (5,55%; 03/54), todos os pacientes positivos manifestavam a AIDS. A análise por sequenciamento genético revelou *Cryptosporidium suis* em um paciente, não foi possível a caracterização no outro, e confirmou *Giardia duodenalis* nos três pacientes positivos. No segundo estudo, amostras de fezes encaminhadas por unidades básicas de saúde, foram coletadas, totalizando 112 amostras, 102 da área urbana e 10 de distritos do município. Dados dos pacientes (idade, sexo e endereço) também foram coletados. Foi realizado o diagnóstico para *Cryptosporidium* e *Giardia* por PCR para o gene 18SrRNA, as amostras positivas foram caracterizadas pelos genes TPI, Beta-giardin e GDH para *Giardia* e 18S rRNA para *Cryptosporidium*. No total, 19,64% (22/112) foram positivas para *Giardia*; a ocorrência em pacientes do sexo feminino foi de 20,33% e em pacientes do sexo masculino de 18,86%; quanto aos grupos etários, a menor ocorrência foi de 14,28% (1/7) no grupo de 0-|5 anos. A caracterização molecular foi possível em nove amostras e revelou a presença de *assemblage* B em todas, uma das quais como *subassemblage* BIII e outra como BIV no gene TPI e uma como BIV no gene GDH. Uma amostra foi positiva para *Cryptosporidium hominis* (0,89% - 01/112). Conclui-se que *Giardia* pode ser um importante protozoário em pacientes com AIDS em locais endêmicos e esta é a primeira descrição de *Cryptosporidium suis* em humanos no Brasil. Foi identificada uma alta frequência de *Giardia* em pacientes da atenção primária à saúde; isolados pertencentes ao *assemblage* B, *subassemblages* BIII e BIV, estão presentes em quadros diarreicos na região. *Cryptosporidium* ocorre em baixa frequência nesses pacientes e há ciclo antroponótico na região.

**Palavras-chave:** diarreia; zoonoses; protozoários intestinais; atenção primária à saúde; atenção terciária à saúde.

MARTINS, Felipe Danyel Cardoso. **Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* in patients attended in health public service.** 2020. 66 p. Thesis (Doctorate degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

*Cryptosporidium* and *Giardia* are important etiologies of zoonotic diarrhea. Different diagnostic methods applied to these protozoa in different populations result in variations in occurrence estimates and makes difficult a better understanding of the complex epidemiology in general. These protozoa are described in different environments in Brazil and the use of molecular methods allows a better characterization of the occurrence, and molecular epidemiology allows to identify the impact of zoonotic transmission in these parasites' epidemiology. The present thesis aimed to characterize the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in patients attended in the public health system, in Londrina, PR. In the first study, stool samples were collected from 54 patients admitted to a reference hospital for infectious diseases; data on age, sex, address, condition leading to hospitalization, length of stay and medical history were also collected. *Cryptosporidium* and *Giardia* were diagnosed by PCR for the 18S rRNA gene. 68.51% (37/54) of the patients evaluated had HIV infection, with 81.08% (30/37) having acquired immunodeficiency syndrome (AIDS); *Cryptosporidium* was identified in two patients (3.07%; 02/54) and *Giardia* in three (5.55%; 03/54), all positive patients manifested AIDS. Genetic sequencing analysis revealed *Cryptosporidium suis* in one patient and confirmed *Giardia duodenalis* in the three positive patients. In the second study, stool samples sent by basic health units were collected, totaling 112 samples, 102 from urban areas and 10 from districts. Patient data (age, sex and address) were also collected. Diagnosis was made for *Cryptosporidium* and *Giardia* by PCR for the 18SrRNA gene, positive samples were characterized by the TPI, Beta-giardin and GDH genes for *Giardia* and 18S rRNA for *Cryptosporidium*. In total, 19.64% (22/112) were positive for *Giardia*; occurrence in female patients was 20.33% and in male patients, 18.86%; regarding the age groups, the lowest occurrence was 14.28% (1/7) in the 0-|5 years group. Molecular characterization was possible in nine samples and revealed the presence of assemblage B in all of them, one as a subassemblage BIII and the other as BIV in the TPI gene and one as BIV in GDH gene. One sample was positive for *Cryptosporidium hominis* (0.89% - 01/112). *Giardia* can be an important protozoan in AIDS patients in endemic regions and this is the first description of *Cryptosporidium suis* in humans in Brazil. A high frequency of *Giardia* has been identified in primary health care patients; isolates belonging to assemblage B, subassemblages BIII and BIV, are present in diarrheal patients in the region. *Cryptosporidium* occurs in low frequency in these patients and there is an anthroponotic cycle in the region.

**Keywords:** diarrhea; zoonosis; intestinal protozoa; primary health care; tertiary health care.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UEL	Universidade Estadual de Londrina
OMS	Organização Mundial de Saúde
HTS	Helmintos Transmitidos pelo Solo
GBD	<i>Global Burden Disease</i>
DALY	Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade
PNH	Primatas Não-Humanos
pH	Potencial Hidrogeniônico
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
2.1	PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS .....	11
2.2.	<i>Cryptosporidium</i> spp .....	14
2.3	<i>Giardia duodenalis</i> .....	16
2.4	<i>Cryptosporidium</i> spp E <i>Giardia duodenalis</i> EM ALIMENTOS E AMBIENTE NO BRASIL.....	20
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4</b>	<b>ARTIGOS</b> .....	33
4.1	ARTIGO A - OCORRÊNCIA DE <i>Cryptosporidium</i> spp. E <i>Giardia Duodenalis</i> EM PACIENTES INTERNADOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA REGIONAL PARA DOENÇAS INFECCIOSAS .....	33
4.2	ARTIGO B - OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Giardia Duodenalis</i> E <i>Cryptosporidium</i> spp. EM PACIENTES COM DIARREIA ATENDIDOS NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE.....	46
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	46
<b>6</b>	<b>ANEXOS</b> .....	67

## 1 1 INTRODUÇÃO

2

3 As principais doenças infecciosas emergentes são zoonoses, as condições ambientais,  
4 além das interações neste, representam um cenário crucial na transmissão dessas doenças  
5 (WARREN et al., 2008). A partir do controle quimioterápico aplicado aos helmintos  
6 transmitidos pelo solo; dos avanços no desenvolvimento de saneamento básico; da dinâmica  
7 entre os seres humanos, os animais domésticos/selvagens e o ambiente; das características de  
8 resistência ambiental e de transmissão dos protozoários; e das mudanças ocorridas na cadeia  
9 de produção de alimentos, os protozoários emergem como uma importante etiologia de  
10 diarreia mesmo com todas essas medidas aplicadas para melhorar a saúde a nível mundial  
11 (HOTEZ, 2014).

12 Com relação aos protozoários *Cryptosporidium* spp e *Giardia duodenalis* estes se  
13 destacam como etiologia de diarreia de transmissão zoonótica, com ocorrência e impacto  
14 global, estima-se que criptosporidiose tenha causado 8,4 milhões de DALYs (anos de vida  
15 perdidos ajustados pela incapacidade) e a giardíase 171 mil DALYs em 2010 (HOTEZ, 2014;  
16 KOTLOFF, 2017; THOMPSON; SMITH, 2011). O controle é desafiador e depende de  
17 estudos e intervenções sob o paradigma de Saúde Única (*One Health*), este paradigma  
18 compreende que há um entrelace entre a saúde humana, animal e ambiental, e portando  
19 intervenções que busquem uma melhoria da saúde devem levar em consideração estes três  
20 domínios (MWANGI; FIGUEIREDO; CRISCITIELLO, 2016; SCHURER et al., 2016).

21 No Brasil, espécies zoonóticas de *Cryptosporidium*, descritas em pacientes  
22 portadores do vírus HIV, e *assemblages* zoonóticos de *Giardia* relatados em crianças e  
23 adultos, demonstram a importância de animais como fontes de infecção para humanos  
24 (ARAÚJO et al., 2008; COELHO et al., 2017; LUCCA et al., 2009) Ainda, esses  
25 protozoários são descritos em diversos ambientes e alimentos, assim há uma importante  
26 circulação e a transmissão pode ocorrer por diversas formas (COELHO et al., 2017; CUNHA;  
27 PERALTA; PERALTA, 2019).

28 No entanto, a epidemiologia molecular destes dois protozoários é ainda pouco  
29 explorada no Brasil. Visto a ampla ocorrência no ambiente, é necessária uma abordagem  
30 maior com relação ao diagnóstico e epidemiologia molecular em humanos e animais para  
31 compreender e revelar o real impacto destas doenças na população.

32

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS

As zoonoses hoje são as principais doenças infecciosas emergentes, as condições ambientais, além das interações neste, representam um cenário crucial na transmissão dessas doenças (WARREN *et al.*, 2008). O controle dessas enfermidades se torna desafiador uma vez que depende de um esforço multiprofissional entre saúde humana, animal e ambiental. Para superar esse desafio, hoje o controle tem se desenvolvido sob o paradigma de Saúde Única (*One Health*), esse novo paradigma compreende que a saúde deve ser pensada como uma só saúde que envolva a saúde animal, humana e ambiental (MWANGI; FIGUEIREDO; CRISCITIELLO, 2016).

Estudos fundados a partir desse novo paradigma tem alcançado resultados promissores no controle de doenças transmitidas por vetores e a raiva (CUNNINGHAM; DASZAK; WOOD, 2017). Estudos controlados randomizados, que busquem avaliar intervenções relacionadas aos protozoários intestinais formatados nesse paradigma, ainda são escassos, estes hoje estão baseados em educação sanitária e saneamento básico (CUMMING *et al.*, 2019). Porém, estudos transversais que avaliem dois dentre os três domínios (saúde humana, animal e ambiental) são mais frequentes, e em grande parte concordam que esta abordagem leva a uma melhor compreensão da transmissão de doenças (SCHURER *et al.*, 2016).

Dois grupos de parasitos são os responsáveis pelas parasitoses intestinais, protozoários e helmintos. Avanços no controle das helmintíases a partir da popularização de drogas eficazes no tratamento e do desenvolvimento de intervenções como o tratamento em massa de populações, conhecido como quimioterapia preventiva, permitiram que houvesse uma importante redução em sua ocorrência (FLETCHER; STARK; ELLIS, 2011). A quimioterapia preventiva, recomendada pela Organização Mundial de Saúde, consiste em tratar anualmente a população que tenha a prevalência de qualquer infecção por helmintos transmitidos pelo solo (HTS) entre 20 a 50%, sem que haja um diagnóstico prévio; caso a prevalência exceda 50%, o tratamento torna-se semestral (WHO, 2017).

A partir da implementação da quimioterapia preventiva um aumento na incidência de protozooses intestinais é observado na população, o mecanismo envolvido ainda não foi descrito, porém as drogas e doses utilizadas nessa intervenção não tem eficácia contra protozoários, é sugerido ainda que o controle das infecções por helmintos sem a melhora das

1 condições sanitárias podem abrir um nicho ecológico onde bactérias e/ou protozoários podem  
2 encontrar um ambiente mais favorável por redução na competição e/ou alterações no perfil  
3 imunológico do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

4 O impacto global das protozooses zoonóticas é alto, um estudo para medir a carga de  
5 doenças a nível global (*Global Burden Disease Study*) contabilizou aproximadamente 55 mil  
6 mortes por amebíase e 100 mil por Criptosporidiose durante o ano de 2010 (HOTEZ *et al.*,  
7 2014). Más condições de saneamento e higiene pessoal combinadas com baixos níveis de  
8 educação, estas características comuns em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento,  
9 contribuem para esta ocorrência (IGNACIO *et al.*, 2017).

10 Medidas como incidência, prevalência e mortalidade não permitem aferir  
11 diretamente o quanto uma população perde por estar doente. Para estimar essa perda, medidas  
12 sumárias de saúde populacional têm sido desenvolvidas (MURRAY; SALOMON;  
13 MATHERS, 2000). A principal delas no estudo das protozooses intestinais é a DALY (anos  
14 de vida perdidos ajustados por incapacidade), esta medida considera quantos anos de vida  
15 foram perdidos por morte prematura e por incapacitação considerando uma etiologia  
16 (DEVLEESSCHAUWER *et al.*, 2017). As protozooses intestinais apresentaram, de acordo  
17 com o estudo GBD 2010 (*global burden disease*), valores alarmantes nesse indicador, a  
18 amebíase causou 2,2 milhões de DALYs, criptosporidiose 8,4 milhões de DALYs, giardíase  
19 171 mil DALYs em 2010. Como comparação com outras doenças negligencias, no mesmo  
20 período as helmintíases intestinais causaram 5,19 milhões de DALYs (HOTEZ *et al.*, 2014).

21 Mesmo com valores de mortalidade e de DALYs alarmantes, até o momento para o  
22 controle das protozooses intestinais, não há programas de saúde pública em larga escala  
23 desenvolvidos e bem estabelecidos como se observa no controle das helmintoses intestinais  
24 (TURKELTAUB; MCCARTY; HOTEZ, 2015).

25 Uma vez que os principais protozoários intestinais são transmitidos via fecal-oral,  
26 medidas de saneamento básico, como acesso a água não contaminada, disposição adequada de  
27 fezes e medidas de educação em saúde, são as principais formas de controle hoje, porém  
28 deve-se adicionar a essas o controle em populações animais, uma vez que estes podem ser  
29 importantes hospedeiros (INNES *et al.*, 2020; RYAN; ZAHEDI; PAPANINI, 2016; SPEICH  
30 *et al.*, 2016). Em comunidades rurais em Bangladesh um ensaio randomizado controlado  
31 revelou que intervenções que busquem melhorias em saneamento e higiene (lavagem das  
32 mãos) reduziram significativamente as infecções por *G. duodenalis*, porém quando avaliada a  
33 disposição de água clorada esta não reduziu significativamente as infecções já que a cloração  
34 não é capaz de inativar a forma infectante (LIN *et al.*, 2018).

1 Algumas características comuns dos protozoários intestinais permitem que se  
2 mantenham endêmicos na população, em determinadas regiões, mesmo após intervenções em  
3 saneamento. Com relação às formas evolutivas destes, em alguns gêneros há presença de  
4 formas ambientais de resistência capazes de se manterem infectantes por meses a anos  
5 (ERICKSON; ORTEGA, 2006). Este grupo ainda é caracterizado pela alta eliminação de  
6 formas infectantes e baixa dose infectante, isso permite que um único hospedeiro parasitado  
7 seja capaz de transmitir a um grande número de suscetíveis (EFSTRATIOU; ONGERTH;  
8 KARANIS, 2017). Há de se considerar ainda o aspecto zoonótico, este fator aliado às demais  
9 características citadas acima faz com que medidas de controle tomadas no âmbito apenas  
10 humano ou ambiental não sejam totalmente eficazes (RYAN; ZAHEDI; PAPANINI, 2016).

11 Considerando populações de países desenvolvidos, com indicadores excelentes de  
12 saneamento, estas protozooses se apresentam geralmente associadas à transmissão  
13 intradomiciliar, à transmissão por meio de surtos de veiculação hídrica e/ou alimentar e às  
14 viagens para países em que estas são endêmicas (FLETCHER *et al.*, 2012).

15 A transmissão via alimentos é um fator importante que ganha destaque a partir da  
16 globalização. A cadeia de produção e distribuição de alimentos permitem que um único lote  
17 de alimento produzido seja enviado a uma grande área geográfica podendo então causar surtos  
18 de grandes dimensões (DIXON, 2016; DEVLEESSCHAUWER *et al.*, 2017; RYAN;  
19 HIJJAWI; XIAO, 2017).

20 Os protozoários emergem como uma importante etiologia de diarreia mesmo com  
21 todas medidas aplicadas para melhorar a saúde a nível mundial (HOTEZ, 2014). Neste  
22 cenário, *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* são protozoários distribuídos mundialmente e  
23 se caracterizam por causarem doença de caráter zoonótico, responsáveis por doença  
24 gastrointestinal em animais e humanos; antes com importância reconhecida em animais e  
25 humanos jovens e/ou imunocomprometidos, porém recentemente reconhecida também em  
26 adultos com sistema imunológico hígido (HATALOVÁ *et al.*, 2019; RYAN; HIJJAWI, 2015;  
27 THOMPSON; SMITH, 2011). *Cryptosporidium* é considerado o segundo maior causador de  
28 quadros graves de diarreia em crianças menores de cinco anos na Ásia e África (KOTLOFF *et*  
29 *al.*, 2013).

30 Dentre os protozoários intestinais zoonóticos, estes estão entre os que há maior  
31 compreensão quanto à ocorrência, transmissão e patogenicidade, no entanto ainda não há um  
32 tratamento e uma vacina eficaz para *Cryptosporidium* e ainda restam dúvidas sobre a relação  
33 entre a grande diversidade genética e a transmissão de *G. duodenalis* (THOMPSON; ASH,  
34 2019; THOMPSON; SMITH, 2011).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

## 2.2 *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

*Cryptosporidium* é um gênero de protozoários pertencente ao filo Apicomplexa, classe, Gregarinomorpha, subclasse Cryptogregarina, ordem Cryptogregarida e família Cryptosporidiidae (CAVALIER-SMITH, 2014; RYAN et al., 2016; THOMPSON; KOH; CLODE, 2016). É um parasita intracelular e extracitoplasmático causador da criptosporidiose, infecta células epiteliais do trato gastrointestinal, e pode causar infecções extra-intestinais nos pulmões, pâncreas, ductos biliares e vesícula biliar (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Sua disseminação ocorre pela eliminação de oocistos infectantes nas fezes levando à contaminação do meio ambiente. Os oocistos são capazes de permanecerem viáveis por longo período no ambiente, são resistentes a vários fatores ambientais como à salinidade do mar e ao pH baixo do solo. O ciclo biológico se completa com a ingestão de oocistos, pelo hospedeiro suscetível, geralmente associada à água e aos alimentos (FAYER, 2004).

A transmissão por via hídrica ocorre frequentemente no ciclo da criptosporidiose em todo o mundo. Surto de veiculação hídrica por este protozoário são amplamente relatados, sendo o protozoário mais frequentemente apontado como causador de surtos de veiculação hídrica (BALDURSSON; KARANIS, 2011; EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017). Este representa ainda um grande desafio no tratamento e desinfecção da água uma vez que é relativamente resistente aos processos comumente aplicados (FRANCO, 2007).

O oocisto é a única forma evolutiva deste hospedeiro descrita no ambiente, porém a caracterização de novos estágios extracelulares a partir de cultivo *in vitro* e a descoberta da multiplicação de *Cryptosporidium* em biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* apontam para a existência de outras formas evolutivas no ambiente, estas formas ainda só foram descritas *in vitro*, mas podem representar um grande desafio no controle desse parasito (KOH et al., 2013; RYAN et al., 2016).

A dose infectante para este protozoário é baixa, em condições experimentais humanos saudáveis desenvolveram quadro diarreico com apenas 30 oocistos, o número de oocistos eliminados alcançaram valores de  $10^6$  oocistos durante o período de infecção, em bezerros os valores chegam a  $10^7$  oocistos/grama de fezes (TEUNIS; CHAPPELL; OKHUYSEN, 2002).

O gênero *Cryptosporidium* é composto por mais de 35 espécies e mais de 60 genótipos. Destas, 17 espécies já foram encontradas em humanos (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C.*

1 *fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei* e *C. xiaoi*) e três genótipos  
2 (*Cryptosporidium* horse, skunk e chipmunk I) (RYAN; FAYER; XIAO, 2014; RYAN;  
3 ZAHEDI; PAPANINI, 2016). No entanto, *C. hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis* são os  
4 mais frequentemente detectados sendo, *C. parvum* reconhecido como o mais frequente em  
5 diferentes mamíferos e, portanto, com maior importância zoonótica (RYAN; FAYER; XIAO,  
6 2014; XIAO, 2010). Em razão da morfologia semelhante de oocistos de diferentes espécies, a  
7 distinção por meio de microscopia óptica é de difícil realização, métodos moleculares são  
8 indicados para essa diferenciação (FALL *et al.*, 2003).

9 Estudos demonstram diferenças na epidemiologia desta infecção; questões culturais,  
10 climáticas e geográficas resultam em mudanças na ocorrência e distribuição de espécies, e por  
11 consequência nas vias de transmissão (CACCIÒ; CHALMERS, 2016; KING; TYLER;  
12 HUNTER, 2019). Quanto a distribuição das duas principais espécies na infecção de seres  
13 humanos, *C. parvum* e *C. hominis*, a primeira é relatada com maior frequência em países  
14 subdesenvolvidos e em desenvolvimento, e em populações de áreas rurais, nestas por efeito de  
15 bovinos jovens serem os principais hospedeiros desta espécie, já *C. hominis* é mais frequente  
16 no ambiente urbano principalmente pela aglomeração entre humanos (LEARMONTH *et al.*,  
17 2004; KING; TYLER; HUNTER, 2019).

18 No Brasil, os poucos estudos que relatam a infecção por *Cryptosporidium* spp. em  
19 humanos são restritos às crianças e pacientes imunocomprometidos. Rolando *et al.* (2012)  
20 realizaram um estudo com 1197 amostras de fezes de crianças coletadas durante dez anos em  
21 uma creche e dois hospitais do Rio de Janeiro. Os autores relataram positividade em 3,17%  
22 (38/1197) das amostras por meio de coloração de Kinyon modificada e microscopia, todas as  
23 amostras foram confirmadas por qPCR. Ainda no Rio de Janeiro, Peralta *et al.* (2016), em  
24 pacientes HIV positivos, encontraram uma frequência de 19,1%, utilizando métodos de  
25 coloração e microscopia e 25,8% utilizando qPCR. Assis *et al.* (2013), em estudo envolvendo  
26 59 pacientes HIV positivos atendidos em um hospital de referência, encontraram, por meio de  
27 coloração de Ziehl-Neelsen modificada e microscopia, oocistos de *Cryptosporidium* em  
28 10,10% (6/59) dos pacientes, a confirmação por PCR ocorreu em dois casos.

29 Grande parte dos estudos brasileiros utilizaram como método de triagem para o  
30 diagnóstico de *Cryptosporidium* métodos de coloração diferencial aliada a microscopia óptica,  
31 considerada de baixa sensibilidade e especificidade quando comparada às técnicas  
32 moleculares (CHECKLEY *et al.*, 2015). A utilização de ferramentas moleculares pode levar  
33 ao melhor conhecimento da ocorrência deste protozoário mesmo quando os oocistos estão em  
34 baixo número nas amostras biológicas (ELSAFI *et al.*, 2013).

1 Os dados disponíveis sobre a distribuição de espécies de *Cryptosporidium* em  
2 humanos no Brasil em portadores do HIV e crianças, *C. hominis* é mais frequente frente ao *C.*  
3 *parvum*. Em estudos que abrangem a caracterização molecular em amostras de fezes positivas  
4 para *Cryptosporidium* spp., a espécie *C. hominis* é encontrada em frequências de 40% a 90%  
5 em pacientes HIV positivos e 57,1% a 73,6% em crianças; já para *C. parvum* as frequências  
6 variam de 10% a 20% em HIV positivos e 10,5% a 42,9% em crianças (ARAÚJO *et al.*,  
7 2008; BUSHEN *et al.*, 2007; LUCCA *et al.*, 2009; PERALTA *et al.*, 2016; ROLANDO *et al.*,  
8 2012). A ocorrência de outras espécies zoonóticas, além de *C. parvum*, já foi relatada em  
9 baixa frequência no Brasil em amostras fecais de pacientes HIV positivos, as espécies  
10 descritas até o momento são: *C. felis*, *C. canis* e *C. meleagridis* (ARAÚJO *et al.*, 2008;  
11 LUCCA *et al.*, 2009).

12

### 13 2.3 GIARDIA DUODENALIS

14

15 *Giardia* é um gênero de protozoário que infecta uma ampla gama de animais e  
16 necessita de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo. A infecção culmina na produção  
17 e eliminação de cistos nas fezes de seus hospedeiros, estas são formas ambientais resistentes  
18 responsáveis por novas infecções. A transmissão ocorre por via fecal-oral de forma direta ou  
19 indireta, na segunda a veiculação hídrica e alimentar são as mais relatadas (THOMPSON,  
20 2004).

21 A estrutura celular e metabólica deste protozoário difere de eucariotos comuns, há  
22 ausência de peroxissomos, diferenças no complexo de Golgi e ausência de mitocôndria  
23 (MARTI *et al.*, 2003). Portanto, sua taxonomia está em constante revisão afim de melhor  
24 alocar este gênero dentro dos eucariotos. Na mais recente atualização da taxonomia de  
25 eucariotos unicelulares o gênero *Giardia* foi inserido no novo Reino Excavata, Filo  
26 Metamonada, Subfilo Trichosoa, Superclasse Eopharyngea, Classe Trepomonadea, Subclasse  
27 Diplozoa, Ordem Diplomonadida e Família Giardiidae (ADL *et al.*, 2012).

28 Oito espécies de *Giardia* são descritas: *G. duodenalis*, *G. muris*, *G. microti*, *G.*  
29 *ardeae*, *G. psittaci*, *G. agilis*, *G. peramelis* e *G. cricetarum* e cinco delas, *G. duodenalis*, *G.*  
30 *muris*, *G. microti*, *G. peramelis* e *G. cricetarum* têm mamíferos como hospedeiros  
31 (CACCIÒ; LALLE; SVÄRD, 2017; LYU *et al.*, 2018). Apenas *G. duodenalis* é capaz de  
32 infectar uma ampla gama de mamíferos, incluindo os humanos, os animais de produção, os de  
33 companhia, o que a configura como a única espécie de interesse na saúde pública (READ;  
34 MONIS; THOMPSON, 2004).

1 Importantes diferenças entre isolados de *G. duodenalis* foram observadas a partir de  
 2 cultivo *in vitro* associado a ferramentas moleculares, isto motivou a discriminação desta  
 3 espécie em oito grupamentos genéticos (*assemblages*) nomeados a partir de letras do alfabeto  
 4 (A, B, C, D, E, F, G e H) (RYAN; CACCIÒ, 2013). Recentemente, com o avanço e aplicação  
 5 de métodos moleculares, vários estudos passaram a relatar uma vasta diferença genética entre  
 6 os *assemblages* motivando uma proposta para que esses grupamentos fossem então divididos  
 7 em diferentes espécies (Quadro 1) (THOMPSON; ASH, 2019).

8  
 9 **Quadro 1** - Diferentes grupos genéticos (*assemblages*) de *Giardia duodenalis*, nomenclatura  
 10 proposta para a discriminação dos grupos em espécies, e os principais  
 11 hospedeiros

Assemblage	Subassemblages	Espécie proposta	Principais Hospedeiros
A	AI, AII e AIII	<i>G. duodenalis</i>	Humanos e outros mamíferos
B	BIII e BIV	<i>G. enterica</i>	Humanos e outros mamíferos
C	-	<i>G. canis</i>	Cães e canídeos silvestres
D	-		Cães e canídeos silvestres
E	-	<i>G. bovis</i>	Ungulados
F	-	<i>G. cati</i>	Gatos
G	-	<i>G. simondi</i>	Roedores
H	-	-	Pinípedes

12 **Fonte:** Adaptado de Ryan *et al.*(2019) e Thompson e ASH (2019).

13  
 14 Dentre todos os *assemblages* descritos apenas os *assemblages* A (*G. duodenalis*) e B  
 15 (*G. enterica*) são comumente reportados em humanos e animais e, portanto, são considerados  
 16 com potencial zoonótico (RYAN; CACCIÒ, 2013). No entanto, a presença de *assemblages* C,  
 17 D, E e F já foi descrita em humanos, porém em casos raros e isolados, nesses casos não foi  
 18 possível confirmar se consistia de passagem de DNA pelas fezes ou realmente uma infecção  
 19 (CACCIÒ; LALLE; SVÄRD, 2017).

20 Análises de variabilidade genética do *assemblage* A permitem que esse grupamento  
 21 seja dividido em três *subassemblages*: AI, AII e AIII. Quando avaliada a distribuição nos  
 22 hospedeiros, é relatado que, isolados humanos, pertencem aos *subassemblages* AI e AII

1 enquanto que isolados mais comuns de outros mamíferos pertencem aos *subassemblages* AI e  
2 AIII (RYAN; CACCIÒ, 2013). O *assemblage* B é dividido entre BIII e BIV, ambos são  
3 descritos em animais e humanos (COLLI *et al.*, 2015; FENG; XIAO, 2011; RYAN;  
4 CACCIÒ, 2013).

5 Estudos de sequenciamento do genoma de isolados de *Giardia duodenalis*,  
6 descrevem que o *subassemblage* AI é altamente clonal, sendo que isolados de diferentes  
7 origens (humanos, animais e ambientais) formam um grande grupo que é consistente com a  
8 hipótese desse subtipo ser uma linhagem zoonótica distribuída em todo o mundo. No entanto,  
9 isolados do *assemblage* B são altamente variáveis e os agrupamentos filogenéticos tendem a  
10 se limitar geograficamente (TSUI *et al.*, 2018).

11 O diagnóstico de *G. duodenalis* a partir de microscopia ótica não é capaz de  
12 discriminar os isolados em *assemblages*, essa discriminação acontece a partir da  
13 caracterização de porções do genoma. As principais regiões utilizadas são os genes: TPI  
14 (triosefosfato isomerase), Beta-giardin, GDH (Glutamato desidrogenase). A adoção de  
15 métodos moleculares é recomendada uma vez que essa caracterização traz informações  
16 complementares ao diagnóstico e assim permite uma melhor compreensão da epidemiologia  
17 dessa protozoose (ADEYEMO *et al.*, 2018).

18 O uso de diferentes genes no diagnóstico e caracterização de isolados de *Giardia*  
19 revelaram discordância entre os *loci* utilizados na discriminação de *assemblages*, acredita-se  
20 que possa ocorrer viés na PCR por amplificação preferencial quando há mistura de  
21 *assemblages*. Estas evidências sugerem que a infecção pode ocorrer com um complexo de  
22 cepas de diferentes *assemblages* (BONHOMME *et al.*, 2011). Em ambientes com alta taxa de  
23 transmissão, há maior discordância das *assemblages* em diferentes marcadores, geralmente  
24 atribuídas à presença de misturas de espécies (BECK *et al.*, 2012). Considerando o  
25 *assemblage* B, além da mistura de genótipos em um mesmo paciente, é descrito ainda a  
26 presença de alelos heterozigotos nos genes utilizados para a caracterização molecular, esse  
27 fator pode dificultar e superestimar a diversidade de genótipos desse grupo (ANKARKLEV;  
28 SVÄRD; LEBBAD, 2012).

29 Os sintomas de giardíase incluem diarreia, distensão e dores abdominais, má  
30 absorção de nutrientes e perda de peso. A infecção pode ser assintomática, no entanto casos  
31 crônicos com diarreia persistente não responsiva a tratamento são relatados, já nos estágios  
32 iniciais de vida é conhecida por causar má nutrição e retardo de crescimento (EINARSSON;  
33 MA'AYEH; SVÄRD, 2016). A apresentação clínica pode variar com relação ao *assemblage*  
34 presente, há descrições que o *subassemblage* AII cause doença mais branda ou até

1 assintomática, e a infecção por *subassemblages* do grupo B infecções mais sintomáticas e até  
2 persistentes, porém esta associação ainda não é universal e há descrições contrárias (AL-  
3 MOHAMMED, 2011; CACCIÒ; LALLE; SVÄRD, 2017). A apresentação de diarreia  
4 persistente na infecção por *G. duodenalis* foi confirmada por um estudo de meta-análise com  
5 cinco estudos em que essa associação foi investigada (MUHSEN; LEVINE, 2012).

6 Esta protozoose é endêmica no Brasil, sua ocorrência varia em função da população,  
7 região geográfica estudada, além do método de diagnóstico empregado. Em uma revisão  
8 sistemática realizada com estudos publicados entre 1995 e 2015 a prevalência em humanos no  
9 Brasil variou de 1% a 69% a depender da população estudada. Com relação à caracterização  
10 molecular e distribuição de *assemblages*, é relatada uma grande variação entre os estudos da  
11 frequência dos *assemblages* encontrados e assim não há predominância de algum (A e B) no  
12 Brasil (COELHO *et al.*, 2017).

13 No Paraná, no município de Marialva foi relatada a prevalência de 1% em pacientes  
14 atendidos pelo programa Saúde da Família do Sistema Único de Saúde (SUS); na região de  
15 Paranaguá de 11% em população de zona urbana, periurbana e insular; em população geral de  
16 Londrina/PR foi relatada ocorrência de 3,74% (BENITEZ *et al.*, 2017; CASAVECHIA *et al.*,  
17 2016; SEGUÍ *et al.*, 2018). Em crianças em idade escolar é reportada uma ocorrência de  
18 14,4% em Jataizinho/PR; 8,93% em Cascavel/PR e 8,0% em São Jerônimo da Serra/PR  
19 (FRECKLETON *et al.*, 2019; RUIZ *et al.*, 2006; TAKIZAWA *et al.*, 2008).

20 Estudos buscam, com base na discriminação genética dos isolados, caracterizar a  
21 transmissão zoonótica e confirmar os principais hospedeiros de interesse na saúde pública  
22 (THOMPSON, 2013). Em cães, um dos animais mais próximos do homem, mesmo que a  
23 ocorrência de *assemblages* A e B seja relatada, as reportadas com maior frequência são as C e  
24 D (PAZ E SILVA *et al.*, 2012; SOMMER *et al.*, 2015; TYSNES; SKANCKE;  
25 ROBERTSON, 2014). No Brasil, o *assemblage* C já foi reportado em humanos hospitalizados  
26 em Campinas/SP (DURIGAN *et al.*, 2014). No entanto, um estudo que buscou caracterizar os  
27 *assemblages* em humanos, cães e rios de uma mesma localidade no estado de São Paulo este  
28 *assemblage* não foi encontrado em humanos e em cães foram encontrados os *assemblages* A,  
29 C e D (DAVID *et al.*, 2015). Há hipóteses de que a ocorrência de *assemblages* A e B nestes  
30 animais seja devido à alta ocorrência de contaminação ambiental por humanos,  
31 desencadeando a transmissão do ser humano ao animal (zooantroponótica) (FANTINATTI *et*  
32 *al.*, 2018; THOMPSON; ASH, 2016).

33 Quanto aos outros *assemblages* com potencial zoonótico, o *assemblage* E conhecida  
34 por estar restrito a ungulados já foi relatado em crianças no Rio de Janeiro, sugerindo um

1 ciclo antropozoonótico nesta população (FANTINATTI *et al.*, 2016).

2

#### 3 2.4 *CRYPTOSPORIDIUM* SPP E *GIARDIA DUODENALIS* EM ALIMENTOS E AMBIENTE NO BRASIL

4

5 Uma vez que a transmissão indireta por via hídrica e alimentar é de grande  
6 importância no ciclo da criptosporidiose e giardíase, estudos no Brasil buscam identificar a  
7 presença das formas ambientais de resistência em amostras ambientais e de alimentos, e a  
8 partir da caracterização molecular de espécies de *Cryptosporidium* e *assemblages* de *Giardia*  
9 estabelecer o risco desta presença para a saúde pública.

10

11 Em um estudo com água, solo e verduras de produção orgânica no norte do Paraná,  
12 *G. duodenalis* foi o parasita mais encontrado, a caracterização genética só foi possível em  
13 duas amostras de verduras e identificou a presença de *assemblage* E, uma vez que este  
14 *assemblage* é raramente encontrado em humanos, esta presença não implica em risco direto a  
15 humanos (FERREIRA *et al.*, 2018). No entanto, em outro estudo em verduras no Paraná  
16 houve a presença apenas de *assemblage* A com predominância de *subassemblage* AII (TIYO  
17 *et al.*, 2016). Quando estudado humanos, verduras e cães de uma mesma localidade em  
18 Maringá/PR, foi identificada a presença do sub-*assemblage* BIV nos três tipos de amostras,  
19 apontando para que este grupamento genético seja endêmico com diferentes formas de  
20 transmissão (COLLI *et al.*, 2015). Portanto os *assemblages* presentes em diferentes vegetais  
21 de consumo humano pode variar conforme características específicas de cada região ou  
22 propriedade produtora.

22

23 Com relação a outros alimentos, tem-se estudado o potencial de transmissão pelo  
24 consumo de ostras, em um estudo realizado em um estuário na região sul do litoral de São  
25 Paulo, foi identificada a presença de *subassemblage* AII em ostras após processo de  
26 depuração, evidenciando que ostras quando consumidas cruas ou levemente cozidas, mesmo  
27 após depuração, podem ter um papel na transmissão da giardíase em humanos (LEAL *et al.*,  
28 2018). Em outro estudo também no litoral de São Paulo, foi identificado a presença de  
29 oocistos de *Cryptosporidium* em ostras e berbigões em condições naturais (LEAL *et al.*,  
30 2008). Em amostras hídricas estes protozoários já foram reportados em água bruta de  
31 mananciais de abastecimento de Londrina e Maringá no Paraná, com a descrição de *C.*  
32 *parvum* em água bruta em Londrina/PR (ALMEIDA *et al.*, 2015; NISHI *et al.*, 2009). A partir  
33 de caracterização molecular de oocistos de *Cryptosporidium*, foi identificada a presença de *C.*  
34 *hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis* em amostras de água bruta no estado de São Paulo  
(ARAÚJO *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2018). Já em Campinas/SP a presença de *G*

1 *duodenalis* foi reportada em todas as amostras de água bruta de dois mananciais de  
2 abastecimento monitorados durante 10 meses; a partir da caracterização molecular, possível  
3 em uma das amostras, foi identificada a presença de *subassemblage* BIII (FRANCO *et al.*,  
4 2016). A identificação de espécies de *Cryptosporidium* e assemblages de *G. duodenalis*,  
5 comumente reportadas em humanos, em amostras e água bruta demonstra que estão  
6 circulantes e podem ser transmitidos através da transmissão hídrica.

7 Em amostras hídricas a partir da quantificação dos (oo)cistos, modelos de dose-  
8 resposta e estimativas de remoção destes em estações de tratamento de água, o risco para a  
9 população pode ser estimado. A partir dessa abordagem, em quatro grandes regiões do estado  
10 de São Paulo, a presença de *Cryptosporidium* foi identificada em 9,2% e de *Giardia* em  
11 49,5% das amostras analisadas; o risco para essa população foi maior que o recomendado de 1  
12 caso para cada 10.000 pessoas (SATO *et al.*, 2013).

13 A ocorrência destes protozoários em ambiente urbano também tem sido monitorada  
14 por meio da pesquisa em amostras de esgoto. Em Londrina/PR. *Cryptosporidium* foi  
15 identificado em 84% (21/25) e *Giardia* sp em 100% (25/25) das amostras de esgoto bruto  
16 durante um monitoramento anual, neste ambiente as espécies *C. muris* *C. parvum* e *C. suis*,  
17 zoonóticas, além de *C. hominis*, foram identificadas (MARTINS *et al.*, 2019). Outros estudos  
18 no Brasil também descreveram uma alta frequência destes dois gêneros em esgotos, em São  
19 Paulo, durante um monitoramento semestral, todas as amostras foram positivas para  
20 *Cryptosporidium* com concentrações entre 80 e 912 oocistos/L; ainda em São Paulo, *Giardia*  
21 *subassemblage* AII foi identificada em quatro e *assemblage* B em duas de um total de cinco  
22 amostras de esgoto bruto positivas para *G. duodenalis* (FARIAS; GAMBÁ; PELLIZARI,  
23 2002; FERNANDES *et al.*, 2011). Em Campinas/SP em uma estação de tratamento de esgoto  
24 de menor escala, foi identificada a presença de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium spp* em  
25 amostras de esgoto bruto, ao contrário do outro estudo em São Paulo neste houve presença de  
26 *subassemblage* BIV e *assemblage* C nas amostras (YAMASHIRO *et al.*, 2019). Ao  
27 considerar que o esgoto representa a população da região amostrada, a alta frequência destes  
28 protozoários nestas amostras indica uma importante ocorrência destes na população.

29 Visto a ocorrência diversa destes protozoários em ambientes e alimentos no Brasil,  
30 uma abordagem para identificar a ocorrência e as principais espécies de *Cryptosporidium* e  
31 *assemblages* de *Giardia* em humanos é necessária para, a partir da epidemiologia molecular,  
32 melhor compreendê-los e revelar o real impacto da transmissão zoonótica destas protozooses.



- 1 BECK, R.; SPRONG, H.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Genotyping *Giardia duodenalis*  
2 isolates from dogs: lessons from a multilocus sequence typing study. **Vector Borne and**  
3 **Zoonotic Diseases**, Larchmont, NY, v. 12, n. 3, p. 206-213, mar. 2012. DOI:  
4 10.1089/vbz.2011.0751.
- 5 BENITEZ, A. D. N.; MAREZE, M.; MIURA, A. C.; BRUNIERI, D. T. S. C.; FERREIRA, F.  
6 P.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Abordagem da saúde única na ocorrência  
7 de enteroparasitas em humanos de área urbana no norte do Paraná. **Arquivos de Ciências**  
8 **Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 4, p. 203-208, 2017.
- 9 BONHOMME, J.; LE GOFF, L.; LEMÉE, V.; GARGALA, G.; BALLEET, J. J.; FAVENNEC,  
10 L. Limitations of tpi and bg genes sub-genotyping for characterization of human *Giardia*  
11 *duodenalis* isolates. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 327–330, 2011.  
12 DOI: 10.1016/j.parint.2011.05.004.
- 13 BUSHEN, O. Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R. C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R. D.;  
14 SEARS, C. L.; FAYER, R.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Heavy cryptosporidial  
15 infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and  
16 *Cryptosporidium parvum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and**  
17 **Hygiene**, London, v. 101, n. 4, p. 378–384, abr. 2007. DOI: 10.1016/j.trstmh.2006.06.005.
- 18 CACCIÒ, S. M.; CHALMERS, R. M. Human cryptosporidiosis in Europe. **Clinical**  
19 **Microbiology and Infection**, Paris, v. 22, n. 6, p. 471–480, jun. 2016. DOI:  
20 10.1016/j.cmi.2016.04.021.
- 21 CACCIÒ, S. M.; LALLE, M.; SVÄRD, S. G. Host specificity in the *Giardia duodenalis*  
22 species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 66, p. 335–345, Dec.  
23 2017.
- 24 CÁRCAMO, C.; HOOTON, T.; WENER, M. H.; WEISS, N. S.; GILMAN, R.; AREVALO,  
25 J.; CARRASCO, J.; SEAS, C.; CABALLERO, M.; HOLMES, K. K. Etiologies and  
26 manifestations of persistent diarrhea in adults with hiv-1 infection: a case-control study in  
27 Lima, Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 191, n. 1, p. 11-19, 2005.
- 28 CASAVECHIA, M. T. G.; LONARDONI, M. V. C.; VENZAZZI, E. A. S.; CAMPANERUT-  
29 SÁ, P. A. Z.; DA COSTA BENALIA, H. R.; MATTIELLO, M. F.; MENECHINI, P. V. L.;  
30 DOS SANTOS, C. A.; TEIXEIRA, J. J. V. Prevalence and predictors associated with  
31 intestinal infections by protozoa and helminths in southern Brazil. **Parasitology Research**,  
32 Berlin, v. 115, n. 6, p. 2321–2329, Jun. 2016. DOI: 10.1007/s00436-016-4980-y.
- 33 CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine  
34 higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. **European Journal of**  
35 **Protistology**, Stuttgart, v. 50, n. 5, p. 472–495, 2014. DOI: 10.1016/j.ejop.2014.07.002.
- 36 CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Experimental**  
37 **Parasitology**, New York, v. 124, n. 1, p. 138-146, Jan. 2010. DOI:  
38 10.1016/j.exppara.2009.02.003.
- 39 CHECKLEY, W.; WHITE, A. C.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M. J.; CHALMERS, R.  
40 M.; CHEN, X. M.; FAYER, R.; GRIFFITHS, J. K.; GUERRANT, R. L.; HEDSTROM, L.;  
41 HUSTON, C. D.; KOTLOFF, K. L.; KANG, G.; MEAD, J. R.; MILLER, M.; PETRI, W. A.;  
42 PRIEST, J. W.; ROOS, D. S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R. C. A.; WARD, H. D.; VAN

- 1 VOORHIS, W. A.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUPPT, E. R. A review of the global burden, novel  
2 diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. **The Lancet Infectious**  
3 **Diseases**, New York, v. 15, n. 1, p. 85–94, 2015. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70772-8.
- 4 COELHO, C. H.; DURIGAN, M.; LEAL, D. A. G.; SCHNEIDER, A. de B.; FRANCO, R.  
5 M. B.; SINGER, S. M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20  
6 years of publications. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. 1–  
7 22, 2017.
- 8 COLLI, C. M.; BEZAGIO, R. C.; NISHI, L.; BIGNOTTO, T. S.; FERREIRA, É. C.;  
9 FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; GOMES, M. L. Identical assemblage of *Giardia*  
10 *duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a  
11 relationship among them. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0118065, 11 mar. 2015.  
12 DOI: 10.1371/journal.pone.0118065.
- 13 CUMMING, O.; ARNOLD, B. F.; BAN, R.; CLASEN, T.; ESTEVES MILLS, J.;  
14 FREEMAN, M. C.; GORDON, B.; GUITERAS, R.; HOWARD, G.; HUNTER, P. R.;  
15 JOHNSTON, R. B.; PICKERING, A. J.; PRENDERGAST, A. J.; PRÜSS-USTÜN, A.;  
16 ROSENBOOM, J. W.; SPEARS, D.; SUNDBERG, S.; WOLF, J.; NULL, C.; LUBY, S. P.;  
17 HUMPHREY, J. H.; COLFORD, J. M. The implications of three major new trials for the  
18 effect of water, sanitation and hygiene on childhood diarrhea and stunting: A consensus  
19 statement. **BMC Medicine**, London, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2019.
- 20 CUNHA, F. S.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. New insights into the detection and  
21 molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review.  
22 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 61, p. 1–12, abr.  
23 2019.
- 24 CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; WOOD, J. L. N. One health, emerging infectious  
25 diseases and wildlife: Two decades of progress? **Philosophical Transactions of the Royal**  
26 **Society B: Biological Sciences**, London, v. 372, n. 1725, 2017.
- 27 DAVID, É. B.; GUIMARÃES, S.; OLIVEIRA, A. P. de; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.  
28 de; NOGUEIRA BITTENCOURT, G.; NARDI, A. R. M.; RIBOLLA, P. E. M.; FRANCO, R.  
29 M. B.; BRANCO, N.; TOSINI, F.; BELLA, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Molecular  
30 characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo,  
31 Brazil. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 103, jan. 2015. Disponível em: DOI:  
32 10.1186/s13071-015-0714-8.
- 33 DEVLEESSCHAUWER, B.; BOUWKNEGT, M.; DORNY, P.; GABRIËL, S.;  
34 HAVELAAR, A. H.; QUOILIN, S.; ROBERTSON, L. J.; SPEYBROECK, N.;  
35 TORGERSON, P. R.; VAN DER GIESSEN, J. W. B.; TREVISAN, C. Risk ranking of  
36 foodborne parasites: state of the art. **Food and Waterborne Parasitology**, New York, v. 8-9,  
37 p. 1–13, Aug. 2017.
- 38 DIXON, B. R. Parasitic illnesses associated with the consumption of fresh produce - an  
39 emerging issue in developed countries. **Current Opinion in Food Science**, Amsterdam, v. 8,  
40 p. 104–109, 2016. DOI: 10.1016/j.cofs.2016.04.009.
- 41 DUPONT, H. L. Persistent diarrhea: a clinical review. **JAMA**, Chicago, v. 315, n. 24, p.  
42 2712, Jun. 2016. DOI: 10.1001/jama.2016.7833.

- 1 DURIGAN, M.; ABREU, A. G.; ZUCCHI, M. I.; FRANCO, R. M. B.; DE SOUZA, A. P.  
2 Genetic Diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus Genotyping Reveals Zoonotic Potential  
3 between Clinical and Environmental Sources in a Metropolitan Region of Brazil. **PLoS ONE**,  
4 San Francisco, v. 9, n. 12, p. e115489, 23 dez. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0115489.
- 5 EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan  
6 parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2011–2016. **Water Research**, Oxford,  
7 v. 114, p. 14–22, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>.
- 8 EINARSSON, E.; MA'AYEH, S.; SVÄRD, S. G. An up-date on *Giardia* and giardiasis.  
9 **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 34, p. 47–52, dez. 2016. DOI:  
10 10.1016/j.mib.2016.07.019.
- 11 ELSAFI, S. H.; AL-MAQATI, T. N.; HUSSEIN, M. I.; ADAM, A. A.; HASSAN, M. M. A.;  
12 AL ZHRANI, E. M. Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular  
13 techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology**  
14 **Research**, Berlin, v. 112, n. 4, p. 1641–6, 15 abr. 2013. DOI: 10.1007/s00436-013-3319-1.
- 15 ERICKSON, M. C.; ORTEGA, Y. R. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and  
16 environmental systems. **Journal of Food Protection**, United States, v. 69, n. 11, p. 2786–  
17 2808, nov. 2006. DOI: 10.4315/0362-028x-69.11.2786.
- 18 FALL, A.; THOMPSON, R. C. A.; HOBBS, R. P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not  
19 a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **The Journal of Parasitology**,  
20 Lawrence, v. 89, n. 2, p. 399–402, abr. 2003. DOI: 10.1645/0022-  
21 3395(2003)089[0399:MINART]2.0.CO;2.
- 22 FANTINATTI, M.; BELLO, A. R.; FERNANDES, O.; DA-CRUZ, A. M. Identification of  
23 *Giardia lamblia* Assemblage e in Humans Points to a New Anthroozoonotic Cycle. **The**  
24 **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 214, n. 8, p. 1256–1259, 2016. DOI:  
25 10.1093/infdis/jiw361
- 26 FANTINATTI, M.; CASECA, A. C.; BELLO, A. R.; FERNANDES, O.; DA-CRUZ, A. M.;  
27 FANTINATTI, M.; FERNANDES, O. The presence of *Giardia lamblia* assemblage A in dogs  
28 suggests an anthroozoonotic cycle of the parasite in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection**,  
29 **Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 65, n. July, p. 265–269, nov. 2018. DOI:  
30 10.1016/j.meegid.2018.07.025.
- 31 FARIAS, E. W. C.; GAMBA, R. C.; PELLIZARI, V. H. Detection of *cryptosporidium* spp.  
32 oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of**  
33 **Microbiology**, São paulo, v. 33, p. 41–43, 2002. DOI: 10.1590/S1517-83822002000100008.
- 34 FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**,  
35 Amsterdam, v. 126, p. 37–56, 2004. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.09.004
- 36 FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and  
37 giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 24, n. 1, p. 110–40, jan.  
38 2011. DOI: 10.1128/CMR.00033-10.
- 39 FERNANDES, L. N.; DE SOUZA, P. P.; DE ARAÚJO, R. S.; RAZZOLINI, M. T. P.;  
40 SOARES, R. M.; SATO, M. I. Z.; HACHICH, E. M.; CUTOLO, S. A.; MATTÉ, G. R.;  
41 MATTÉ, M. H. Detection of assemblages A and B of *Giardia duodenalis* in water and sewage

- 1 from São Paulo state, Brazil. **Journal of Water and Health**, London, v. 9, n. 2, p. 361–367,  
2 jun. 2011. DOI: 10.2166/wh.2011.098.
- 3 FERREIRA, F. P.; CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; DE  
4 FREITAS, F. M.; MIURA, A. C.; MAREZE, M.; MARTINS, F. D. C.; URBANO, M. R.;  
5 SEIFERT, A. L.; NAVARRO, I. T. The effect of water source and soil supplementation on  
6 parasite contamination in organic vegetable gardens. **Revista Brasileira de Parasitologia**  
7 **Veterinária**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 327–337, 2018. DOI: 10.1590/s1984-296120180050.
- 8 FLETCHER, S. M.; STARK, D.; ELLIS, J. Prevalence of gastrointestinal pathogens in Sub-  
9 Saharan Africa: systematic review and meta-analysis. **Journal of Public Health in Africa**,  
10 Pavia, v. 2, n. 2, p. 30, 5 set. 2011. DOI: 10.4081/jphia.2011.e30
- 11 FLETCHER, S. M.; STARK, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. Enteric protozoa in the  
12 developed world: A public health perspective. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington,  
13 DC, v. 25, n. 3, p. 420–449, 2012.
- 14 FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista**  
15 **Panamericana de Infectología**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 36–43, 2007.
- 16 FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; AMARO, B. C. T.; CANTUSIO NETO, R.; FIUZA, V.  
17 R. S. Cryptosporidium species and giardia genotypes detected in surface water supply of  
18 campinas, southeast Brazil, by molecular methods. **Journal of Veterinary Medicine and**  
19 **Research**, San Diego, v. 3, n. 3, p. 1–7, 2016.
- 20 FRECKLETON, J. T.-A. V.; OLIVEIRA, F. J. A.; COSTA, I. N.; PAVANELLI, W. R.;  
21 CONCHON-COSTA, I.; MELANDA, F. N. Prevalência de enteroparasitoses em crianças de  
22 uma cidade do norte do Paraná e fatores associados. **Semina: Ciências Biológicas e da**  
23 **Saúde**, Londrina, v. 40, n. 1, p. 89, 2019.
- 24 HATALOVÁ, E.; VALENČÁKOVÁ, A.; LUPTÁKOVÁ, L.; ŠPALKOVÁ, M.;  
25 KALINOVÁ, J.; HALÁNOVÁ, M.; BEDNÁROVÁ, V.; GABZDILOVÁ, J.; DEDINSKÁ,  
26 K.; ONDRISKA, F.; BOLDIŠ, V. The first report of animal genotypes of *Cryptosporidium*  
27 *parvum* in immunosuppressed and immunocompetent humans in Slovakia. **Transboundary**  
28 **and Emerging Diseases**, Berlin, v. 66, n. 1, p. 243–249, 2019. DOI: 10.1111/tbed.13009.
- 29 HOTEZ, P. J. Could Nitazoxanide Be Added to Other Essential Medicines for Integrated  
30 Neglected Tropical Disease Control and Elimination? **PLoS Neglected Tropical Diseases**,  
31 San Francisco, v. 8, n. 3, p. 8–10, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002758.
- 32 HOTEZ, P. J.; ALVARADO, M.; BASÁÑEZ, M. G.; BOLLIGER, I.; BOURNE, R.;  
33 BOUSSINESQ, M.; BROOKER, S. J.; BROWN, A. S.; BUCKLE, G.; BUDKE, C. M.;  
34 CARABIN, H.; COFFENG, L. E.; FÈVRE, E. M.; FÜRST, T.; HALASA, Y. A.;  
35 JASRASARIA, R.; JOHNS, N. E.; KEISER, J.; KING, C. H.; LOZANO, R.; MURDOCH,  
36 M. E.; O'HANLON, S.; PION, S. D. S.; PULLAN, R. L.; RAMAIAH, K. D.; ROBERTS, T.;  
37 SHEPARD, D. S.; SMITH, J. L.; STOLK, W. A.; UNDURRAGA, E. A.; UTZINGER, J.;  
38 WANG, M.; MURRAY, C. J. L.; NAGHAVI, M. The Global burden of disease study 2010:  
39 interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Neglected Tropical**  
40 **Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 7, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002865.
- 41 IGNACIO, C. F.; SILVA, M. E. C.; HANDAM, N. B.; ALENCAR, M. F. L.; SOTERO-  
42 MARTINS, A.; BARATA, M. M. L.; MORAES NETO, A. H. A. Socioenvironmental

- 1 conditions and intestinal parasitic infections in Brazilian urban slums: a cross-sectional study.  
2 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 59, p. 1–10, 7 ago.  
3 2017.
- 4 INNES, E. A.; CHALMERS, R. M.; WELLS, B.; PAWLOWIC, M. C. A One Health  
5 approach to tackle cryptosporidiosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, p. 1–14, jan. 2020.  
6 DOI: 10.1016/j.pt.2019.12.016.
- 7 KING, P.; TYLER, K. M.; HUNTER, P. R. Anthroponotic transmission of *Cryptosporidium*  
8 *parvum* predominates in countries with poorer sanitation: a systematic review and meta-  
9 analysis. **Parasites & Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 16, 8 dez. 2019. DOI: 10.1186/s13071-  
10 018-3263-0.
- 11 KOH, W.; CLODE, P. L.; MONIS, P.; THOMPSON, R. Multiplication of the waterborne  
12 pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. **Parasites & Vectors**,  
13 London, v. 6, n. 1, p. 270, 2013. DOI: 10.1186/1756-3305-6-270.
- 14 KOTLOFF, K. L. The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries.  
15 **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 64, n. 4, p. 799–814, ago. 2017.  
16 Disponível em: DOI: 10.1016/j.pcl.2017.03.006.
- 17 KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.;  
18 PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A.  
19 S.; ZAIDI, A. K.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.;  
20 ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J.  
21 B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.;  
22 QUADRI, F.; ADEGBOLA, R. A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; AKINSOLA, A.;  
23 MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C. E.;  
24 MINTZ, E. D.; BERKELEY, L. Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-  
25 BROWNE, R. M.; LEVINE, M. M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and  
26 young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a  
27 prospective, case-control study. **The Lancet**, London, v. 382, n. 9888, p. 209–222, jul. 2013.  
28 DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2.
- 29 LEAL, D. A. G.; PEREIRA, M. A.; FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; NETO, R. C. First  
30 report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles  
31 (*Tivela mactroides*) in Brazil. **Journal of Water and Health**, London, v. 6, n. 4, p. 527–532,  
32 2008. DOI: 10.2166/wh.2008.065
- 33 LEAL, D. A. G.; SOUZA, D. S. M.; CAUMO, K. S.; FONGARO, G.; PANATIERI, L. F.;  
34 DURIGAN, M.; ROTT, M. B.; BARARDI, C. R. M.; FRANCO, R. M. B. Genotypic  
35 characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from  
36 oysters and estuarine waters in Brazil. **Water Research**, Oxford, v. 137, p. 273–280, Apr.  
37 2018. DOI: 10.1016/j.watres.2018.03.024.
- 38 LEARMONTH, J. J.; IONAS, G.; EBBETT, K. A.; KWAN, E. S. Genetic characterization  
39 and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand.  
40 **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 3973–3978, 2004.  
41 DOI: 10.1128/AEM.70.7.3973-3978.2004.
- 42 LIN, A.; ERCUMEN, A.; BENJAMIN-CHUNG, J.; ARNOLD, B. F.; DAS, S.; HAQUE, R.;

- 1 ASHRAF, S.; PARVEZ, S. M.; UNICOMB, L.; RAHMAN, M.; HUBBARD, A. E.;  
 2 STEWART, C. P.; COLFORD, J. M.; LUBY, S. P. Effects of water, sanitation, handwashing,  
 3 and nutritional interventions on child enteric protozoan infections in rural Bangladesh: A  
 4 cluster-randomized controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 67, n. 10, p.  
 5 1515–1522, 2018. DOI: 10.1093/cid/ciy320.
- 6 LUCCA, P.; DE GASPARI, E. N.; BOZZOLI, L. M.; FUNADA, M. R.; SILVA, S. O. S.;  
 7 IULIANO, W.; SOARES, R. M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from  
 8 HIV infected patients from an urban area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina**  
 9 **Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 6, p. 341–343, dez. 2009. DOI: 10.1590/S0036-  
 10 46652009000600006.
- 11 LYU, Z.; SHAO, J.; XUE, M.; YE, Q.; CHEN, B.; QIN, Y.; WEN, J. A new species of  
 12 *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora: Hexamitidae) in hamsters. **Parasites and**  
 13 **Vectors**, London, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2786-8.
- 14 MARTI, M.; REGÖS, A.; LI, Y.; SCHRANER, E. M.; WILD, P.; MÜLLER, N.; KNOPF, L.  
 15 G.; HEHL, A. B. An Ancestral Secretory Apparatus in the Protozoan Parasite *Giardia*  
 16 *intestinalis*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 27, p. 24837–24848, 4  
 17 jul. 2003. DOI: 10.1074/jbc.M302082200.
- 18 MARTINS, F. D. C.; LADEIA, W. A.; TOLEDO, R. S.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.;  
 19 FREIRE, R. L. Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage from an urban area in  
 20 Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 291–297,  
 21 2019. DOI: 10.1590/s1984-29612019037.
- 22 MUHSEN, K.; LEVINE, M. M. A systematic review and meta-analysis of the association  
 23 between giardia lamblia and endemic pediatric diarrhea in developing countries. **Clinical**  
 24 **Infectious Diseases**, Chicago, v. 55, p. S271–S293, 15 dez. 2012. Suppl. 4. DOI:  
 25 10.1093/cid/cis762.
- 26 MURRAY, C. J. L.; SALOMON, J. A.; MATHERS, C. A critical examination of summary  
 27 measures of population health. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 78,  
 28 n. 8, p. 981-94, 2000.
- 29 MWANGI, W.; DE FIGUEIREDO, P.; CRISCITIELLO, M. F. One Health: Addressing  
 30 Global Challenges at the Nexus of Human, Animal, and Environmental Health. **PLOS**  
 31 **Pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 9, p. e1005731, 2016. DOI:  
 32 10.1371/journal.ppat.1005731.
- 33 NISHI, L.; BAESSO, M. L.; SANTANA, R. G.; FREGADOLLI, P.; FALAVIGNA, D. L.  
 34 M.; FALAVIGNA-GUILHERME, a L. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia*  
 35 spp. in a public water-treatment system. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 56, n. 5, p.  
 36 221–8, jun. 2009. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01189.x.
- 37 OLIVEIRA, Y. L. M. Y. L. D. C.; OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, Y. L. M. Y. L. D. C.;  
 38 NASCIMENTO, A. M. D.; LA CORTE, R.; GERALDI, R. M.; BARBOSA, L.;  
 39 GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; FUJIWARA, R. T.; BUENO, L. L.; DOLABELLA, S.  
 40 S. Changes in the epidemiological profile of intestinal parasites after a school-based large-  
 41 scale treatment for soil-transmitted helminths in a community in northeastern Brazil. **Acta**  
 42 **Tropica**, Basel, v. 202, p. 105279, Feb. 2020.

- 1 PAZ E SILVA, F. M.; MONOBE, M. M.; LOPES, R. S.; ARAUJO, J. P. Molecular  
2 characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v.  
3 110, n. 1, p. 325–34, 22 jan. 2012. DOI: 10.1007/s00436-011-2492-3.
- 4 PERALTA, R. H. S.; VELÁSQUEZ, J. N.; CUNHA, F. S.; PANTANO, M. L.; SODRÉ, F.  
5 C.; SILVA, S.; ASTUDILLO, O. G.; PERALTA, J. M.; CARNEVALE, S. Genetic diversity  
6 of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina.  
7 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 1, p. 30–36, jan. 2016.  
8 DOI: 10.1590/0074-02760150303.
- 9 READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. Discrimination of all genotypes of  
10 *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection*,  
11 *Genetics and Evolution*, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 125–30, jun. 2004.
- 12 ROLANDO, R. F. R.; SILVA, S. da; PERALTA, R. H. S.; SILVA, A. J. da; CUNHA, F. de  
13 S.; BELLO, A. R.; PERALTA, J. M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by  
14 real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil.  
15 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 4, p. 476–479, jun. 2012.  
16 DOI: 10.1590/S0074-02762012000400006.
- 17 RUIZ, F. M. L.; GONÇALVES, D. D.; REIS, C. R. Dos; BREGANÓ, R. M.; FILHO, F. A.;  
18 MURAD, V. A.; NORONHA DUTRA DE MENEZES, M. C.; FREIRE, R. L.; DE  
19 FREITAS, J. C.; SANTANA, M. A. Z.; NAVARRO, I. T. Ocorrência de enteroparasitoses em  
20 escolares do município de Jataizinho, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health**  
21 **Science**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 107–111, 13 mar. 2006.
- 22 RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International journal for**  
23 **parasitology**, Oxford, v. 43, n. 12–13, p. 943–56, nov. 2013. DOI:  
24 10.1016/j.ijpara.2013.06.001.
- 25 RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current  
26 understanding and research needs. **Parasitology**, London, v. 141, n. 13, p. 1667–1685, Nov.  
27 2014. DOI: 10.1017/S0031182014001085.
- 28 RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. **International**  
29 **Journal for Parasitology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 367–373, maio 2015. DOI:  
30 10.1016/j.ijpara.2015.01.009.
- 31 RYAN, U.; HIJJAWI, N.; FENG, Y.; XIAO, L. *Giardia*: an under-reported foodborne  
32 parasite. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 1–11, jan. 2019.  
33 DOI: 10.1016/j.ijpara.2018.07.003.
- 34 RYAN, U.; HIJJAWI, N.; XIAO, L. Foodborne cryptosporidiosis. **International Journal for**  
35 **Parasitology**, Oxford, Sep. 2017. DOI: 10.1016/j.ijpara.2017.09.004.
- 36 RYAN, U.; PAPANINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. It's official – *cryptosporidium* is a  
37 gregarine: what are the implications for the water industry? **Water Research**, Oxford, v. 105,  
38 p. 305–313, Nov. 2016. DOI: 10.1016/j.watres.2016.09.013.
- 39 RYAN, U.; ZAHEDI, A.; PAPANINI, A. *Cryptosporidium* in humans and animals—a one  
40 health approach to prophylaxis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 38, n. 9, p. 535–547, 2016.  
41 DOI: 10.1111/pim.12350.

- 1 SATO, M. I. Z.; GALVANI, A. T.; PADULA, J. A.; NARDOCCI, A. C.; LAURETTO, M.  
 2 S.; PEPE RAZZOLINI, M. T.; HACHICH, E. M.; RAZZOLINI, M. T. P.; HACHICH, E. M.  
 3 Assessing the infection risk of Giardia and Cryptosporidium in public drinking water  
 4 delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Science of the Total**  
 5 **Environment**, Amsterdam, v. 442, p. 389–396, jan. 2013. DOI:  
 6 10.1016/j.scitotenv.2012.09.077.
- 7 SCHURER, J. M.; MOSITES, E.; LI, C.; MESCHKE, S.; RABINOWITZ, P. Community-  
 8 based surveillance of zoonotic parasites in a ‘One Health’ world: A systematic review. **One**  
 9 **Health**, Amsterdam, v. 2, p. 166–174, 2016. DOI: 10.1016/j.onehlt.2016.11.002.
- 10 SEGUÍ, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; KLISIEWICZ, D. R.; OISHI, C. Y.; KÖSTER, P. C.; DE  
 11 LUCIO, A.; HERNÁNDEZ-DE-MINGO, M.; PUENTE, P.; TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G.;  
 12 CARMENA, D. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular  
 13 epidemiology of Giardia duodenalis and Blastocystis sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: A  
 14 community survey. **Parasites and Vectors**, London, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2018. DOI:  
 15 10.1186/s13071-018-3054-7.
- 16 SOMMER, M. F.; BECK, R.; IONITA, M.; STEFANOVSKA, J.; VASIĆ, A.;  
 17 ZDRAVKOVIĆ, N.; HAMEL, D.; REHBEIN, S.; KNAUS, M.; MITREA, I. L.;  
 18 SHUKULLARI, E.; KIRKOVA, Z.; RAPTI, D.; CAPÁRI, B.; SILAGHI, C. Multilocus  
 19 sequence typing of canine Giardia duodenalis from South Eastern European countries.  
 20 **Parasitology Research**, Berlin, v. 114, n. 6, p. 2165–2174, 2015. DOI: 10.1007/s00436-015-  
 21 4405-3.
- 22 SPEICH, B.; CROLL, D.; FÜRST, T.; UTZINGER, J.; KEISER, J. Effect of sanitation and  
 23 water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis. **The**  
 24 **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 1, p. 87–99, 2016. DOI: 10.1016/S1473-  
 25 3099(15)00349-7.
- 26 TAKIZAWA, M. G. M. H.; SILVAR, L. L.; CELINSKINKI, B. F.; LIBERALI, G.;  
 27 GANASSIN, L.; PROKOSKI, K.; MENEZES, V. C. Ocorrência de giardíase em crianças de  
 28 duas creches do Município de Cascavel, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**,  
 29 Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 63, 2008.
- 30 TEUNIS, P. F. M.; CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C. Cryptosporidium dose-response  
 31 studies: Variation between hosts. **Risk Analysis**, New York, v. 22, n. 3, p. 475–485, 2002.  
 32 DOI: 10.1111/0272-4332.00046.
- 33 THOMPSON, R. C. A. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human  
 34 activity. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 43, n. 12–13, p. 1079–1088,  
 35 nov. 2013. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.06.007.
- 36 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium  
 37 infections. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 40, p. 315–323, jun. 2016.  
 38 DOI: 10.1016/j.meegid.2015.09.028.
- 39 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium  
 40 infections – What’s new? **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 75, n. July, p.  
 41 103951, nov. 2019. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103951.
- 42 THOMPSON, R. C. A.; KOH, W. H.; CLODE, P. L. Cryptosporidium — What is it? **Food**

- 1 **and Waterborne Parasitology**, New York, v. 4, p. 54–61, 2016. DOI:  
2 10.1016/j.fawpar.2016.08.004.
- 3 THOMPSON, R. C. A.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. **Veterinary Parasitology**,  
4 Amsterdam, v. 182, n. 1, p. 70–78, nov. 2011. Disponível em: DOI:  
5 10.1016/j.vetpar.2011.07.016.
- 6 THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and  
7 giardiasis. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 126, n. 1–2, p. 15–35, 9 dez. 2004.
- 8 TIYO, R.; DE SOUZA, C. Z.; ARRUDA PIOVESANI, A. F.; TIYO, B. T.; COLLI, C. M.;  
9 MARCHIORO, A. A.; GOMES, M. L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Predominance  
10 of Giardia duodenalis assemblage AII in fresh leafy vegetables from a market in Southern  
11 Brazil. **Journal of Food Protection**, United States, v. 79, n. 6, p. 1036–1039, 2016.
- 12 TSUI, C. K.-M.; MILLER, R.; UYAGUARI-DIAZ, M.; TANG, P.; CHAUVE, C.; HSIAO,  
13 W.; ISAAC-RENTON, J.; PRYSTAJECKY, N. Beaver Fever: Whole-Genome  
14 Characterization of Waterborne Outbreak and Sporadic Isolates To Study the Zoonotic  
15 Transmission of Giardiasis. **mSphere**, Washington, DC, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2018. DOI:  
16 10.1128/mSphere.00090-18.
- 17 TURKELTAUB, J. A.; MCCARTY, T. R.; HOTEZ, P. J. The intestinal protozoa: Emerging  
18 impact on global health and development. **Current Opinion in Gastroenterology**, London,  
19 v. 31, n. 1, p. 38–44, 2015. DOI: 10.1097/MOG.000000000000135.
- 20 TYSNES, K. R.; SKANCKE, E.; ROBERTSON, L. J. Subclinical Giardia in dogs: a  
21 veterinary conundrum relevant to human infection. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 30, n.  
22 11, p. 520–527, Nov. 2014. DOI: 10.1016/j.pt.2014.08.007.
- 23 WARREN, J. J.; BLANCHETTE, D.; DAWSON, D. V.; TERESA, A.; PHIPPS, K. R.;  
24 STARR, D.; DRAKE, D. R. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, London,  
25 v. 44, n. 2, p. 319–335, 2008. DOI: 10.14745/ccdr.v43i10a03.
- 26 WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Integrating neglected tropical diseases into  
27 global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. 2017.  
28 Disponível em: [https://www.who.int/neglected\\_diseases/resources/9789241565448/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241565448/en/).  
29 Acesso em: 20 maio 2019.
- 30 XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental**  
31 **parasitology**, New York, v. 124, n. 1, p. 80–9, jan. 2010. DOI:  
32 10.1016/j.exppara.2009.03.018.
- 33 YAMASHIRO, S.; FOCO, M. L. R.; PINEDA, C. O.; JOSÉ, J.; NOUR, E. A. A.;  
34 SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V.; FRANCO, R. M. B. Giardia spp. and Cryptosporidium spp.  
35 removal efficiency of a combined fixed-film system treating domestic wastewater receiving  
36 hospital effluent. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, Germany, v.  
37 26, n. 22, p. 22756–22771, 2019. DOI: 10.1007/s11356-019-05500-8.

### 1 3 OBJETIVOS

2

#### 3 3.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Identificar a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em pacientes atendidos no  
6 âmbito do Sistema Público de Saúde brasileiro.

7

#### 8 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

- 10 – Diagnosticar a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* em pacientes internados no  
11 setor de Moléstias Infeciosas do Hospital Universitário Regional/UEL
- 12 – Caracterizar as espécies de *Cryptosporidium* em pacientes internados no setor de  
13 Moléstias Infeciosas do Hospital Universitário Regional/UEL.
- 14 – Diagnosticar a presença e caracterizar as espécies de *Cryptosporidium* e os  
15 *assemblages* de *Giardia* em pacientes com diarreia não hospitalizados.
- 16 – Determinar os fatores associados à presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* em  
17 pacientes não hospitalizados.

18

1 **4 ARTIGOS**

2

3 4.1 ARTIGO A - OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. E *GIARDIA DUODENALIS* EM  
4 PACIENTES INTERNADOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA REGIONAL PARA  
5 DOENÇAS INFECCIOSAS

6

1 **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em pacientes internados**  
2 **em um centro de referência regional para doenças infecciosas**

3  
4 **Resumo**

5  
6 A infecção por protozoários intestinais emergiu como uma importante causa de diarreia em  
7 pacientes imunocomprometidos, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* são protozoários  
8 zoonóticos causadores de diarreia em seus hospedeiros, ambos são descritos em pacientes  
9 portadores de HIV. O diagnóstico molecular destes protozoários permite uma melhor  
10 caracterização da ocorrência e a partir da epidemiologia molecular é possível identificar o  
11 impacto da transmissão zoonótica. Este estudo teve como objetivo determinar a frequência de  
12 *Giardia duodenalis* e espécies de *Cryptosporidium* em pacientes internados no setor de  
13 moléstias infecciosas do Hospital Universitário Regional/UEL. Foram coletadas amostras de  
14 fezes de 54 pacientes hospitalizados, e dados referentes a idade, sexo, endereço, afecção que  
15 levou ao internamento, tempo de internação e histórico clínico. Para o diagnóstico de  
16 *Cryptosporidium* e *Giardia*, o DNA extraído das amostras de fezes foi submetido a PCR para  
17 o gene 18s rRNA, os produtos obtidos foram sequenciados para a confirmação e determinação  
18 da espécie. Dos pacientes avaliados 68,51% (37/54) eram portadores da infecção pelo HIV,  
19 destes 81,08% (30/37) manifestavam Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).  
20 *Cryptosporidium* foi identificado em dois pacientes (3,07%, 02/54) e *Giardia* em três (5,55%,  
21 03/54), todos pacientes positivos manifestavam a síndrome da imunodeficiência adquirida. A  
22 análise do sequenciamento foi possível em uma amostra para *Cryptosporidium*, este revelou a  
23 presença da espécie *Cryptosporidium suis*, para *Giardia* as três amostras foram confirmadas  
24 como *Giardia duodenalis*. *Cryptosporidium* e *Giardia* ocorreram apenas em pacientes que  
25 manifestavam AIDS. A presença de *C. suis* evidencia a existência de um ciclo zoonótico em  
26 imunocomprometidos e esta é a primeira descrição de *Cryptosporidium suis* em humanos no  
27 Brasil.

28  
29 **Palavras-chave:** HIV. Hospedeiro imunocomprometido. Diarreia. Zoonoses. AIDS.

30  
31  
32 ***Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in hospitalized patients in a regional**  
33 **reference center for infectious diseases.**

34  
35 **Abstract**

36  
37 Intestinal protozoa infection emerged as an important cause of diarrhea in  
38 immunocompromised patients, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* are zoonotic  
39 protozoa that cause diarrhea in their hosts, both of which have been described in patients with  
40 HIV. The molecular diagnosis of these protozoa allows a better occurrence characterization  
41 by means of molecular epidemiology it is possible to identify the impact of zoonotic  
42 transmission. This study aimed to determine the frequency of *Giardia duodenalis* and  
43 *Cryptosporidium* species in patients admitted to the infectious diseases sector of the Hospital  
44 Universitário Regional/UEL. Stool samples were collected from 54 hospitalized patients, and  
45 also data on age, sex, address, condition that led to hospitalization, duration of hospitalization  
46 and clinical history. For the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*, the samples stool  
47 DNA were extracted and submitted to PCR for the 18s rRNA gene, the products obtained  
48 were sequenced for confirmation and species determination. 68.51% (37/54) of evaluated  
49 patients had HIV infection, of these 81.08% (30/37) had Acquired Immunodeficiency

1 Syndrome (AIDS), *Cryptosporidium* was identified in two patients (3.07%, 02/54) and  
2 *Giardia* in three (5.55%, 03/54), all positive patients manifested acquired immunodeficiency  
3 syndrome. Sequencing analysis was possible in one sample for *Cryptosporidium*, identified as  
4 *Cryptosporidium suis*, for *Giardia* the three samples were confirmed as *Giardia duodenalis*.  
5 *Cryptosporidium* and *Giardia* occurred only in patients with AIDS. The presence of *C. suis*  
6 points to the existence of a zoonotic cycle in immunocompromised individuals and this is the  
7 first description of *Cryptosporidium suis* in humans in Brazil.

8  
9 **Keywords:** HIV. Immunocompromised host. Diarrhea. Zoonosis. AIDS.

## 10 11 **Introdução**

12  
13 Em pacientes imunocomprometidos os protozoários emergiram como uma  
14 importante etiologia de diarreia a partir da pandemia da Síndrome da Imunodeficiência  
15 Adquirida (AIDS) em portadores do HIV na década de 80. *Cryptosporidium* e *Giardia* estão  
16 entres os principais protozoários de transmissão zoonótica associados a esse grupo  
17 (CIMERMAN; CIMERMAN; LEWI, 1999; FARIA *et al.*, 2017). Com o desenvolvimento e  
18 popularização de terapias anti-retrovirais (TARV), a incidência e os impactos desses  
19 protozoários reduziram substancialmente nessa população, no entanto essas infecções ainda  
20 são descritas e o uso irregular de TARV pode acarretar casos graves e persistentes (LOW *et*  
21 *al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013).

22 *Cryptosporidium* é um importante protozoário que afeta pacientes com HIV/AIDS,  
23 causando diarreia persistente com perda de peso e redução da qualidade de vida (WANG, R.  
24 *et al.*, 2018) O gênero *Cryptosporidium* é dividido em mais de 35 espécies, as principais que  
25 acometem os humanos são *C. hominis* (antroponótica) e *C. parvum* (zoonótica) (FENG;  
26 RYAN; XIAO, 2018). Em humanos com HIV no Brasil, as espécies de *Cryptosporidium*  
27 relatadas com maior frequência também são *C. hominis* e *C. parvum* (PERALTA *et al.*, 2016;  
28 ROLANDO *et al.*, 2012). Mesmo que a maior parte dos achados sugiram que a transmissão  
29 antroponótica seja a mais frequente nesses pacientes nas Américas, espécies de caráter  
30 zoonótico como *C. parvum*, *C. felis*, *C. canis* e *C. meleagridis* já foram relatadas em pacientes  
31 com HIV no Brasil (ARAÚJO *et al.*, 2008; LUCCA *et al.*, 2009; WANG, R. *et al.*, 2018). Em  
32 outros países, a transmissão zoonótica tem um importante papel na criptosporidiose em  
33 pacientes HIV positivos (SANNELLA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2013).

34 *Giardia duodenalis* é um protozoário capaz de infectar humanos e outros mamíferos.  
35 Esta espécie compreende vários grupamentos genéticos, dentre os quais o *assemblage* A e  
36 *assemblages* B são os com maior potencial zoonótico (THOMPSON; ASH, 2019). Este

1 protozoário é endêmico no Brasil, é amplamente descrito em amostras hídricas e de alimentos,  
2 e é relatado em portadores de HIV (COELHO *et al.*, 2017; FARIA *et al.*, 2017; FEITOSA *et*  
3 *al.*, 2001).

4 A transmissão destes protozoários ocorre pela via fecal-oral, (oo)cistos eliminados  
5 nas fezes de seus hospedeiros são formas ambientais de resistência responsáveis por novas  
6 infecções. esses são os principais protozoários causadores de surtos de veiculação hídrica no  
7 mundo, porém a transmissão pode ocorrer de forma direta nesta o ambiente intradomiciliar é  
8 crucial (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017; FAYER, 2004).

9 Para o diagnóstico destes protozoários, métodos de coloração diferencial e  
10 microscopia óptica são aplicados, porém são considerados de baixa sensibilidade e  
11 especificidade quando comparados às técnicas moleculares (CHECKLEY *et al.*, 2015;  
12 GOTFRED-RASMUSSEN *et al.*, 2016). A utilização de ferramentas moleculares no  
13 diagnóstico leva a uma melhor caracterização da ocorrência destes protozoários e por meio da  
14 caracterização de espécies e epidemiologia molecular, pode-se identificar o impacto da  
15 transmissão zoonótica (THOMPSON; ASH, 2019).

16 Este estudo teve como objetivo determinar a frequência de *Giardia duodenalis* e  
17 espécies de *Cryptosporidium* em pacientes internados no setor de moléstias infecciosas do  
18 Hospital Universitário Regional, em Londrina PR.

19

## 20 **Material e Métodos**

21

### 22 **Local de estudo**

23

24 O estudo foi realizado com pacientes internados no setor de moléstias infecciosas do  
25 Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, PR. Este é um hospital terciário  
26 de referência para o Sistema Único de Saúde (SUS) situado em Londrina/PR, e abrange  
27 pacientes de toda região norte do Paraná. Este município tem um Índice de Desenvolvimento  
28 Humano de 0,778 e está situado em uma região metropolitana com população estimada de  
29 1.101.595 de habitantes (IBGE, 2019).

30

### 31 **Coleta e Processamento das Amostras de Fezes**

32

33 Foram incluídos no estudo todos os pacientes internados entre 04/2017 e 09/2018 no  
34 setor que consentiram com a participação o estudo. No total 54 pacientes foram incluídos e 62

1 amostras de fezes foram colhidas. Oito pacientes tiveram duas amostras coletadas em uma  
2 mesma internação. As amostras foram colhidas em recipientes plásticos sem conservante,  
3 etiquetadas e conservadas a 4°C. Semanalmente as amostras foram separadas em alíquotas e  
4 armazenadas a -20°C até a extração de DNA.

5 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres  
6 Humanos (CEP-UEL) da Universidade Estadual de Londrina, sob parecer N° 2.347.824/2017.  
7 Os pacientes foram informados quanto ao projeto e tiveram suas amostras colhidas após o  
8 aceite e a assinatura de um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

9

## 10 **Dados clínicos e epidemiológicos**

11

12 Uma consulta ao prontuário do paciente foi realizada para a aquisição de dados de  
13 idade, sexo, endereço, afecções, tempo de internação e histórico clínico. Quando da  
14 ocorrência de óbito durante a internação, coletou-se a data e a causa da morte. Os dados foram  
15 tabulados no Microsoft Excel do pacote Office para a realização das análises descritivas de  
16 média, desvio padrão, mediana, amplitude e frequências.

17

## 18 **Extração do DNA**

19

20 Para a extração do DNA do material fecal, 200 a 250 mg de fezes foram pesadas e  
21 submetidas à extração por meio de kit comercial (*Machery-Nagel, NucleSpin Tissue*)  
22 seguindo protocolo do fabricante com incremento de 3 ciclos de congelamento e  
23 descongelamento antes da etapa de *lise*. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o  
24 momento das análises.

25

## 26 **Reação em cadeia da polimerase**

27

28 Para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp foi realizada a *Nested-PCR* (nPCR) tendo  
29 como alvo uma porção de 820 a 840pb do gene 18S rRNA composta de: 1X PCR Buffer  
30 Invitrogen®; 200 µM de dNTPs; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 400 nM de cada oligonucleotideo; 1,25  
31 U de Platinum® Taq DNA Polimerase; 2 µg BSA 2,0 µL do DNA extraído e água ultra pura  
32 para compor o volume final de 25 µL (XIAO *et al.*, 2001). O produto da primeira reação foi  
33 diluído em 50µL de água ultrapura para a segunda reação. As condições de amplificação para  
34 as duas reações foram: 5min a 95°C; seguidos por 35 ciclos de 45s a 94°C; 45s a 55°C; 60s a

1 72°C e 5min a 72°C.

2 Para o diagnóstico de *Giardia* spp. a nPCR foi realizada para a amplificação de um  
3 fragmento do gene 18S rRNA (LANGKJÆR *et al.*, 2007), constituída de: 1X PCR Buffer  
4 Invitrogen®; 200 µM de cada dNTPs; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 nM de cada oligonucleotideo;  
5 5% de DMSO (dimetilsulfóxido); 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase; 1 µL de DNA  
6 e água ultra pura para compor um volume de 25 µL. O produto da primeira reação foi diluído  
7 em 25 µL de água ultrapura para dar sequência à segunda reação. As condições de  
8 amplificação para ambas reações foram: 5min a 95°C; seguidos por 35 ciclos de 30s a 95°C;  
9 30s a 55°C; 30s a 72°C e 5min a 72°C.

10 Foi utilizado controle negativo composto por água ultrapura e controle positivo  
11 composto por DNA de *C. parvum* e DNA de *Giardia duodenalis assemblage C*. Os produtos  
12 foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com SYbR Safe® e a  
13 imagem capturada por fotodocumentador.

14

#### 15 **Sequenciamento do material amplificado**

16

17 Em amostras positivas o produto da nPCR foi novamente submetido à eletroforese e  
18 após identificação do produto amplificado este foi recortado e purificado utilizando kit  
19 comercial (*Purelink gel extration kit*). O produto purificado foi enviado para o  
20 sequenciamento, para cada amostra foram submetidas duas fitas (senso e anti-senso).

21 Após o sequenciamento os cromatogramas foram inspecionados visualmente com o  
22 programa Chromas Lite®, foi realizado um *contig* das duas fitas (senso e anti-senso) da  
23 mesma amostra com o programa BioEdit® v7.1 (*Biological Sequence Alignment Editor*). Os  
24 *contigs* foram comparados com as sequencias padrões de *Giardia* e *Cryptosporidium*  
25 depositadas no *Genbank*, por meio do sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search*  
26 *Tool*) e por alinhamento manual utilizando-se o programa BioEdit (RUECKER *et al.*, 2011).

27

#### 28 **Resultados**

29

30 Dos 54 pacientes avaliados, 53,70% (29/54) eram do sexo masculino. A idade variou  
31 de 11 a 71 anos, média de 41,13 (±15,34; mediana = 40,55), 37 pacientes eram portadores da  
32 infecção pelo HIV, destes 30 manifestavam AIDS. As causas mais frequentes de  
33 hospitalização foram: diarreia (11 pacientes), tuberculose (10 pacientes) e pneumocistose (7  
34 pacientes). O tempo de internação variou entre 1 e 58 dias, média de 20,00 (±13,47; mediana

1 = 17,50). Oito pacientes foram a óbito durante a internação. O tempo de internação dos  
2 pacientes que vieram a óbito variou de 5 a 41 dias (média = 20,13 ±12,13; mediana = 18,00).

3 A presença de DNA de *Cryptosporidium* foi identificada em dois pacientes (3,07%;  
4 02/54) e a presença de *Giardia* em três (5,55%; 03/54). Não foi observada co-infecção. Todos  
5 os pacientes positivos eram portadores do HIV e manifestavam AIDS. A frequência entre os  
6 pacientes portadores de HIV foi de 5,40% (2/37) para *Cryptosporidium* e 8,10% (3/37) para  
7 *Giardia*, e entre os que manifestavam AIDS foi de 6,66% (2/30) para *Cryptosporidium* e 10%  
8 (3/30) para *Giardia*.

9 O sequenciamento do material amplificado para *Cryptosporidium* foi possível em  
10 uma amostra, este revelou a presença da espécie *C. suis* com 100% de identidade com a  
11 sequência MN715857 depositada no *Genbank*, a sequência gerada nesse estudo foi depositada  
12 sob acesso MT040892. Quanto à outra amostra, não foi possível determinar a espécie devido  
13 à baixa quantidade de DNA.

14 Com relação à *Giardia*, foi possível o sequenciamento da porção do gene 18S rRNA  
15 dos três pacientes positivos e houve a confirmação da presença de *Giardia duodenalis* com  
16 100% de identidade com o acesso MN174122 no *GenBank*; as sequencias geradas neste  
17 estudo foram depositadas no *GenBank* sobre acesso MT053343 - MT053344.

18 Os dois pacientes com *Cryptosporidium* manifestavam AIDS e foram internados com  
19 queixa de diarreia persistente. *Cryptosporidium suis* foi diagnosticado em uma paciente que  
20 fazia uso irregular de Terapia Antirretroviral (TARV), apresentava quadro de desnutrição,  
21 imunodepressão, herpes genital e suspeita de síndrome da reconstituição imune.

22 Os três pacientes positivos para *G. duodenalis* relatavam uso irregular de TARV,  
23 manifestavam AIDS com uma doença oportunista, neurotoxoplasmose, pneumocistose ou  
24 neurocriptococose e as internações duraram 11, 27 e 58 dias, respectivamente. Dentre as  
25 causas de internação apenas um paciente positivo foi hospitalizado com diarreia, este também  
26 apresentava neurotoxoplasmose e foi a óbito no 11º dia de internação por parada  
27 cardiorrespiratória.

28

## 29 **Discussão**

30

31 A maioria dos pacientes avaliados eram portadores da infecção pelo HIV (68,51% -  
32 37/54), dentre os quais 81,08% (30/37) apresentavam AIDS. Em hospedeiros  
33 imunocomprometidos, o *Cryptosporidium* é um protozoário oportunista conhecido por causar  
34 diarreia persistente, com duração maior que 14 dias (WANG, R. *et al.*, 2018). Este

1 protozoário foi diagnosticado em 6,66% dos pacientes com AIDS, semelhante a outro estudo  
2 no Brasil com pacientes HIV positivos referidos a um hospital em que a frequência de 10,1%  
3 (6/59) foi relatada (ASSIS *et al.*, 2013). Dentre as causas de hospitalização de pacientes com  
4 HIV, as doenças oportunistas relacionadas com a AIDS tem uma alta frequência mesmo após  
5 a popularização de TARV (FORD *et al.*, 2015).

6 Em pacientes portadores de HIV com suspeita de criptosporidiose uma maior  
7 frequência de *Cryptosporidium* spp é relatada, 19,1% por meio de métodos de coloração e  
8 microscopia e 25,8% com qPCR (PERALTA *et al.*, 2016). Uma vez que foram incluídos  
9 neste estudo não só pacientes com suspeita de criptosporidiose, a frequência encontrada foi  
10 menor mesmo com a utilização de PCR para diagnóstico. O diagnóstico molecular de  
11 *Cryptosporidium* apresenta uma maior sensibilidade quando comparada às técnicas de  
12 coloração e microscopia comumente utilizadas em laboratórios clínicos, porém inibidores da  
13 PCR presentes em amostras de fezes podem prejudicar a eficácia (CHECKLEY *et al.*, 2015).

14 *Giardia duodenalis* além de ser um parasita negligenciado e endêmico no Brasil, é  
15 um achado frequente em crianças internadas (COELHO *et al.*, 2017; PEREIRA; ATWILL;  
16 BARBOSA, 2007). No Peru foi relatada associação entre *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* e  
17 diarreia em pacientes portadores de HIV, no presente estudo todos os pacientes positivos para  
18 *Giardia* apresentavam AIDS (CÁRCAMO *et al.*, 2005). Mesmo com uma amostra pequena  
19 (30 pacientes hospitalizados com AIDS) essa ocorrência pode indicar que este é um  
20 protozoário presente na região, e reforça a importância da avaliação de outras etiologias de  
21 diarreia nestes pacientes.

22 Pacientes com HIV são mais suscetíveis à ocorrência de diarreia em relação à  
23 população geral, etiologias infecciosas e não infecciosas são apontadas como causa  
24 (DIKMAN *et al.*, 2015). Todos os pacientes internados positivos para *Cryptosporidium* eram  
25 pacientes com AIDS que referiram diarreia persistente no início da internação, reafirmando a  
26 relação entre AIDS, diarreia persistente e infecção por *Cryptosporidium* (WANG, Z. *et al.*,  
27 2018). Visto que 29,72% (11/37) dos pacientes portadores de HIV referidos tinham queixa de  
28 diarreia e destes 27,27% (3/11) foram diagnosticados com *Cryptosporidium* (18,18% - 2/11)  
29 ou *Giardia* (9,09% - 1/11), há uma importante frequência deste quadro nessa população, e  
30 outras etiologias de diarreia podem estar presentes nesses pacientes.

31 Mesmo que no Brasil as principais espécies de *Cryptosporidium* relatadas em  
32 humanos com HIV/AIDS sejam *C. hominis* e em menor frequência *C. parvum*, a importância  
33 do ciclo zoonótico na epidemiologia de *Cryptosporidium* em pacientes portadores de HIV já  
34 foi descrita (PERALTA *et al.*, 2016; ROLANDO *et al.*, 2012). Outros estudos verificaram

1 que as espécies zoonóticas encontradas foram *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. felis* as  
2 quais os principais hospedeiros são os bezerros, aves, cães e felinos, respectivamente  
3 (ARAÚJO *et al.*, 2008; LUCCA *et al.*, 2009)

4 A espécie *C. suis* é relatada raramente em humanos no mundo, há relatos em uma  
5 criança na Inglaterra, um humano em Madagascar e em dois pacientes portadores de HIV, um  
6 no Peru e outro na China (BODAGER *et al.*, 2015; CAMA *et al.*, 2003; LEONI *et al.*, 2006;  
7 WANG *et al.*, 2013). Essa espécie também foi descrita, em baixa frequência, em esgoto da  
8 mesma região do presente estudo; a ocorrência em esgoto e humanos imunocomprometidos  
9 aponta para a existência de um ciclo zoonótico na região uma vez que o principal hospedeiro  
10 desta espécie são os suínos (MARTINS *et al.*, 2019; RYAN *et al.*, 2004; RYAN; FAYER;  
11 XIAO, 2014). Como não há presença frequente de suínos na área urbana do município, a  
12 transmissão zoonótica desta espécie pode estar ocorrendo de forma indireta por via alimentar,  
13 uma vez que diferentes tipos de esterco são utilizados como adubo em produções de hortaliças  
14 na região (FERREIRA *et al.*, 2018). Esta é a primeira descrição de *C. suis* em humanos no  
15 Brasil.

## 17 Conclusão

18  
19 *Cryptosporidium* e *Giardia* foram diagnosticados apenas em pacientes que  
20 manifestavam AIDS. A presença de *C. suis* alerta para a existência de um ciclo zoonótico em  
21 populações vulneráveis, como de imunocomprometidos. Esta é a primeira descrição de *C. suis*  
22 em humanos no Brasil.

## 24 Referências

- 25  
26 ARAÚJO, A. J. U. D. S.; KANAMURA, H. Y.; DE ALMEIDA, M. E.; GOMES, A. H. D. S.;  
27 PINTO, T. H. L.; DA SILVA, A. J. Genotypic identification of cryptosporidium spp. isolated  
28 from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do**  
29 **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 139-143, 2008.
- 30 ASSIS, D. C.; RESENDE, D. V.; CABRINE-SANTOS, M.; CORREIA, D.; OLIVEIRA-  
31 SILVA, M. B. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and  
32 *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de**  
33 **São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 149–154, jun. 2013. DOI: 10.1590/S0036-  
34 46652013000300002.
- 35 BODAGER, J. R.; PARSONS, M. B.; WRIGHT, P. C.; RASAMBAINARIVO, F.;  
36 ROELLIG, D.; XIAO, L.; GILLESPIE, T. R. Complex epidemiology and zoonotic potential

- 1 for *Cryptosporidium suis* in rural Madagascar. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 207,  
2 n. 1–2, p. 140–143, Jan. 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.11.013.
- 3 CAMA, V. a.; BERN, C.; SULAIMAN, I. M.; GILMAN, R. H.; TICONA, E.; VIVAR, A.;  
4 KAWAI, V.; VARGAS, D.; ZHOU, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and genotypes in  
5 HIV-positive patients in Lima, Peru. **The Journal of eukaryotic microbiology**, Lawrence, v.  
6 50, n. s1, p. 531–533, Jul. 2003. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2003.tb00620.x.
- 7 CÁRCAMO, C.; HOOTON, T.; WENER, M. H.; WEISS, N. S.; GILMAN, R.; AREVALO,  
8 J.; CARRASCO, J.; SEAS, C.; CABALLERO, M.; HOLMES, K. K. Etiologies and  
9 manifestations of persistent Diarrhea in adults with HIV-1 infection: a case-control study in  
10 Lima, Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 191, n. 1, p. 11–19, 2005.
- 11 CHECKLEY, W.; WHITE, A. C.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M. J.; CHALMERS, R.  
12 M.; CHEN, X. M.; FAYER, R.; GRIFFITHS, J. K.; GUERRANT, R. L.; HEDSTROM, L.;  
13 HUSTON, C. D.; KOTLOFF, K. L.; KANG, G.; MEAD, J. R.; MILLER, M.; PETRI, W. A.;  
14 PRIEST, J. W.; ROOS, D. S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R. C. A.; WARD, H. D.; VAN  
15 VOORHIS, W. A.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUP, E. R. A review of the global burden, novel  
16 diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *cryptosporidium*. **The Lancet Infectious**  
17 **Diseases**, New York, v. 15, n. 1, p. 85–94, 2015. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70772-8.
- 18 CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D. S. Enteric parasites and AIDS. **São Paulo**  
19 **Medical Journal**, São Paulo, v. 117, n. 6, p. 266–273, nov. 1999. DOI: 10.1590/S1516-  
20 31801999000600007.
- 21 COELHO, C. H.; DURIGAN, M.; LEAL, D. A. G.; SCHNEIDER, A. de B.; FRANCO, R.  
22 M. B.; SINGER, S. M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: systematic review of 20  
23 years of publications. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. 1–  
24 22, 2017.
- 25 DIKMAN, A. E.; SCHONFELD, E.; SRISARAJIVAKUL, N. C.; POLES, M. A. Human  
26 immunodeficiency virus-associated diarrhea: still an issue in the era of antiretroviral therapy.  
27 **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 60, n. 8, p. 2236–2245, 2015. DOI:  
28 10.1007/s10620-015-3615-y.
- 29 EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan  
30 parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. **Water Research**, Oxford,  
31 v. 114, p. 14–22, 2017. DOI: 10.1016/j.watres.2017.01.036.
- 32 FARIA, C. P.; ZANINI, G. M.; DIAS, G. S.; SOUSA, M. C. Associations of *Giardia lamblia*  
33 assemblages with HIV infections and symptomatology: HIV virus and assemblage B were  
34 they born to each other? **Acta Tropica**, Basel, v. 172, p. 80–85, Ago. 2017. DOI:  
35 10.1016/j.actatropica.2017.04.026.
- 36 FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**,  
37 Amsterdam, v. 126, p. 37–56, 2004.
- 38 FEITOSA, G.; BANDEIRA, A. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARÓ, R.; BRITES, C. High  
39 prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil.  
40 **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 5, n. 6, p. 339-344, 2001.
- 41 FENG, Y.; RYAN, U. M.; XIAO, L. Genetic diversity and population structure of

- 1 Cryptosporidium. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 997–1011, 2018. DOI:  
2 10.1016/j.pt.2018.07.009.
- 3 FERREIRA, F. P.; CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; DE  
4 FREITAS, F. M.; MIURA, A. C.; MAREZE, M.; MARTINS, F. D. C.; URBANO, M. R.;  
5 SEIFERT, A. L.; NAVARRO, I. T. The effect of water source and soil supplementation on  
6 parasite contamination in organic vegetable gardens. **Revista Brasileira de Parasitologia**  
7 **Veterinária**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 327–337, 2018. DOI: 10.1590/s1984-296120180050.
- 8 FORD, N.; VITORIA, M.; PENAZZATO, M.; DOHERTY, M.; SHUBBER, Z.; MEINTJES,  
9 G.; GRINSZTEJN, B.; EHOLIE, S.; MILLS, E. J.; FORD, N.; DAVIES, M. A.;  
10 NSANZIMANA, S.; NSANZIMANA, S.; FRIGATI, L.; O'BRIEN, D.; O'BRIEN, D.;  
11 ELLMAN, T.; AJOSE, O.; CALMY, A. Causes of hospital admission among people living  
12 with HIV worldwide: systematic review and meta-analysis. **The Lancet HIV**, Amsterdam, v.  
13 2, n. 10, p. e438–e444, 2015. DOI: 10.1016/S2352-3018(15)00137-X.
- 14 GOTFRED-RASMUSSEN, H.; LUND, M.; ENEMARK, H. L.; ERLANDSEN, M.;  
15 PETERSEN, E. Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of  
16 *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of  
17 concentrated iodine-stained samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New  
18 York, v. 84, n. 3, p. 187–190, 2016. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.005.
- 19 IBGE. Cidades. **Londrina/PR**. Disponível em:  
20 <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/londrina/panorama>. Acesso em: 5 dez. 2019.
- 21 LANGKJÆR, R. B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H. L.; MADDOX-HYTTEL, C. Molecular  
22 and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in  
23 Denmark. **Parasitology**, London, v. 134, n. 3, p. 339–350, 2007. DOI:  
24 10.1017/S0031182006001533.
- 25 LEONI, F.; AMAR, C.; NICHOLS, G.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; MCLAUCHLIN, J. Genetic  
26 analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and  
27 2000. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 55, n. 6, p. 703–7, 1 jun. 2006. DOI:  
28 10.1099/jmm.0.46251-0v.
- 29 LOW, A.; GAVRIILIDIS, G.; LARKE, N.; B-LAJOIE, M. R.; DROUIN, O.; STOVER, J.;  
30 MUHE, L.; EASTERBROOK, P. Incidence of opportunistic infections and the impact of  
31 antiretroviral therapy among hiv-infected adults in low- and middle-income countries: a  
32 systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 62, n. 12, p.  
33 1595–1603, 2016. DOI: 10.1093/cid/ciw125.
- 34 LUCCA, P.; DE GASPARI, E. N.; BOZZOLI, L. M.; FUNADA, M. R.; SILVA, S. O. S.;  
35 IULIANO, W.; SOARES, R. M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from  
36 HIV infected patients from an urban area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina**  
37 **Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 6, p. 341–343, dez. 2009. DOI: 10.1590/S0036-  
38 46652009000600006.
- 39 MARTINS, F. D. C.; LADEIA, W. A.; TOLEDO, R. S.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.;  
40 FREIRE, R. L. Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage from an urban area in  
41 Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 291–297,  
42 2019. DOI: 10.1590/s1984-29612019037.

- 1 PERALTA, R. H. S.; VELÁSQUEZ, J. N.; CUNHA, F. S.; PANTANO, M. L.; SODRÉ, F.  
2 C.; SILVA, S.; ASTUDILLO, O. G.; PERALTA, J. M.; CARNEVALE, S. Genetic diversity  
3 of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina.  
4 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 1, p. 30–36, jan. 2016.  
5 DOI: 10.1590/0074-02760150303.
- 6 PEREIRA, M. D. G. C.; ATWILL, E. R.; BARBOSA, A. P. Prevalence and associated risk  
7 factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia,  
8 Goiás State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.  
9 49, n. 3, p. 139–145, jun. 2007.
- 10 ROLANDO, R. F. R.; SILVA, S.; PERALTA, R. H. S.; SILVA, A. J.; CUNHA, F. S.;  
11 BELLO, A. R.; PERALTA, J. M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-  
12 time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil.  
13 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 4, p. 476–479, jun. 2012.  
14 DOI: 10.1590/S0074-02762012000400006.
- 15 RUECKER, N. J.; HOFFMAN, R. M.; CHALMERS, R. M.; NEUMANN, N. F. Detection  
16 and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested  
17 PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning.  
18 **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 12, p. 3998–4007, jun.  
19 2011. DOI: 10.1128/AEM.02706-10.
- 20 RYAN, U. M.; MONIS, P.; ENEMARK, H. L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.;  
21 READ, C.; BUDDLE, R.; ROBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R. C. A.; XIAO, L.  
22 *Cryptosporidium suis* N. SP. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) IN Pigs (*SUS Scrofa*).  
23 **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 4, p. 769–773, 2004. DOI: 10.1645/GE-202R1.
- 24 RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current  
25 understanding and research needs. **Parasitology**, London, v. 141, n. 13, p. 1667–1685, Nov.  
26 2014. DOI: 10.1017/S0031182014001085.
- 27 SANNELLA, A. R.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; WONGSAWAT, E.; CACCIÒ, S. M. A  
28 retrospective molecular study of *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-infected  
29 patients from Thailand. **Parasites and Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2019. DOI:  
30 10.1186/s13071-019-3348-4.
- 31 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium*  
32 infections – What’s new? **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 75, n. July, p.  
33 103951, nov. 2019. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103951.
- 34 WANG, L.; ZHANG, H.; ZHAO, X.; ZHANG, L.; ZHANG, G.; GUO, M.; LIU, L.; FENG,  
35 Y.; XIAO, L. Zoonotic *cryptosporidium* species and enterocytozoon *bieneusi* genotypes in  
36 HIV-positive patients on antiretroviral therapy. **Journal of Clinical Microbiology**,  
37 Washington, v. 51, n. 2, p. 557–563, 2013. DOI: 10.1128/JCM.02758-12.
- 38 WANG, R. jun; LI, J. qiang; CHEN, Y. cai; ZHANG, L. xian; XIAO, L. hua. Widespread  
39 occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical  
40 feature, diagnosis, and therapy. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 187, p. 257–263, June 2018.  
41 DOI: 10.1016/j.actatropica.2018.08.018.
- 42 WANG, Z. D.; LIU, Q.; LIU, H. H.; LI, S.; ZHANG, L.; ZHAO, Y. K.; ZHU, X. Q.

- 1 Prevalence of Cryptosporidium, microsporidia and Isospora infection in HIV-infected people:  
2 A global systematic review and meta-analysis. **Parasites and Vectors**, London, v. 11, n. 1, p.  
3 1–19, 2018.
  
- 4 XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T. K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular  
5 Characterization of Cryptosporidium Oocysts in Samples of Raw Surface Water and  
6 Wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1097–  
7 1101, mar. 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.3.1097-1101.2001.
  
- 8

- 1 4.2 ARTIGO B - OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *GIARDIA DUODENALIS* E
- 2 *CRYPTOSPORIDIUM* EM PACIENTES COM DIARREIA ATENDIDOS NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À
- 3 SAÚDE
- 4

1 **Ocorrência e caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* em**  
2 **pacientes com diarreia atendidos na atenção primária à saúde.**  
3

4 **Resumo**

5  
6 Doenças diarreicas são endêmicas no Brasil, os protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* são  
7 importantes etiologias zoonóticas desta afecção. Estudos no Brasil descrevem uma ampla  
8 ocorrência destes protozoários em amostras ambientais e de alimentos. A caracterização  
9 molecular destes protozoários em humanos com diarreia permite por meio da epidemiologia  
10 molecular melhor entender a transmissão destes protozoários. Este estudo teve como objetivo  
11 identificar a ocorrência de *Giardia* e *Cryptosporidium* e caracterizar molecularmente espécies  
12 e grupamentos genéticos (*assemblages*) em pacientes com diarreia atendidos no serviço  
13 público de saúde. Amostras de fezes pastosas ou diarreicas, encaminhadas pelas unidades  
14 básicas de saúde de Londrina/PR, foram coletadas entre agosto/2017 e abril/2018 totalizando  
15 112 amostras, 102 da área urbana e 10 de distritos rurais. Dados dos pacientes (idade, sexo e  
16 endereço) foram coletados do cadastro municipal. O DNA das fezes foi extraído e submetido  
17 a *nested*-PCR para o gene 18SrRNA dos dois protozoários, amostras positivas foram  
18 submetidas à nova PCR para os genes TPI, Beta-giardin e GDH para *Giardia*, os produtos  
19 obtidos foram sequenciados juntamente com os produtos do gene 18S rRNA para  
20 *Cryptosporidium*. No total 19,64% (22/112) foram positivas para *Giardia*. A ocorrência foi  
21 de 18,62% (19/112) em residentes da área urbana e nos distritos 30% (3/10), com relação ao  
22 sexo foi de 20,33% (12/59) em pacientes do sexo feminino e 18,86% (10/53) em pacientes do  
23 sexo masculino, quanto aos grupos etários a menor ocorrência foi 14,28% (1/7) no grupo de  
24 0-5 anos, não houve diferença estatística significativa entre a localização, sexo e idade. A  
25 caracterização molecular foi possível em nove amostras de *Giardia* e todas pertenciam ao  
26 *assemblage* B, no gene TPI uma foi caracterizada como *subassemblage* BIII e outra como  
27 BIV, e no gene GDH uma como BIV. Uma amostra foi positiva para *C. hominis*, não foi  
28 observada coinfeção entre os protozoários analisados. Concluindo, uma alta frequência de  
29 *Giardia* foi identificada, *assemblage* B, *subassemblages* BIII e BIV, estão presentes em  
30 quadros diarreicos na região. *Cryptosporidium* ocorre em baixa frequência e há ciclo  
31 antroponótico na região estudada.  
32

33 **Palavras-chave:** Zoonoses. Infecções por protozoários. Giardíase. Criptosporidiose.  
34  
35

36 **Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium***  
37 **in diarrheic patients from primary health care.**  
38

39 **Abstract**

40  
41 Diarrheal diseases are endemic in Brazil, the protozoa *Giardia* and *Cryptosporidium* are  
42 important zoonotic etiologies of this condition. Studies in Brazil describe a wide occurrence  
43 of these protozoa in environmental and food samples, the molecular characterization of these  
44 protozoa in humans with diarrhea allows, through molecular epidemiology, to better  
45 understand the transmission of these protozoa. This study aimed to identify the occurrence of  
46 *Giardia* and *Cryptosporidium* and to characterize species and genetic groups (*assemblages*) in  
47 patients with diarrhea treated at the public health service. Samples of loose or diarrheal stools,  
48 sent by the basic health units of Londrina / PR, were collected between August/2017 and  
49 April/2018, totaling 112 samples, 102 from the urban area and 10 from the districts. Patient  
50 data (age, sex and address) were collected from the municipal registry. The fecal DNA was

1 extracted and submitted to diagnostic by PCR for the 18SrRNA gene of the two protozoa,  
2 positive samples were submitted to PCR and sequencing of the TPI, Beta-giardin and GDH  
3 genes for *Giardia* and 18S rRNA for *Cryptosporidium*. In total, 19.64% (22/112) were  
4 positive for *Giardia*. The occurrence was 18.62% (19/112) in urban residents and in the  
5 districts 30% (3/10), with respect to sex it was 20.33% (12/59) in female patients and 18.86%  
6 (10/53) in male patients, regarding age groups the lowest occurrence was 14.28% (1/7) in the  
7 0-5 group, there was no statistically significant difference between location, sex and age.  
8 Molecular characterization was possible in nine positive samples for *Giardia* and all belonged  
9 to *assemblage* B, in the TPI gene one was characterized as *subassemblage* BIII and the other  
10 as BIV, and in the GDH gene one as BIV. One sample was positive for *C. hominis*, no co-  
11 infection was observed. In conclusion, a high frequency of *Giardia* has been identified,  
12 *assemblage* B, *subassemblages* BIII and BIV, are present in diarrheal conditions in the region.  
13 *Cryptosporidium* occurs in low frequency and there is an anthroponotic cycle in the studied  
14 region.

15  
16 **Key-words:** Zoonosis. Protozoan Infections. Giardiasis. Cryptosporidiosis.

## 18 **Introdução**

19  
20 Doenças diarreicas são endêmicas e de grande importância no Brasil, mesmo com  
21 iniciativas para a diminuição da ocorrência e impacto das parasitoses intestinais em geral, os  
22 protozoários intestinais ainda emergem como etiologia de diarreia aguda e persistente (AW *et*  
23 *al.*, 2019; COELHO *et al.*, 2017). Dentre os protozoários, *Giardia duodenalis* e  
24 *Cryptosporidium* spp são uma das principais etiologias desta afecção (PAWLOWSKI;  
25 WARREN; GUERRANT, 2009).

26 *Giardia* é um gênero de protozoários composto de oito espécies, a principal delas em  
27 relação a humanos e outros mamíferos é *Giardia duodenalis*. Esta espécie compreende vários  
28 grupamentos genéticos, dentre os quais o *assemblage* A e *assemblage* B que são os mais  
29 frequentemente encontrados em humanos, são também relatados em outros mamíferos o que  
30 faz deles os de maior importância na transmissão zoonótica (THOMPSON; ASH, 2019).  
31 Estes grupamentos ainda são divididos em diferentes subassemblages, o *assemblage* A em AI,  
32 AII e AIII; e o *assemblage* B em BIII e BIV (CACCIÒ; LALLE; SVÄRD, 2017).

33 Diferenças de apresentações clínicas entre os *assemblages* tem sido relatadas. O  
34 *assemblage* B é associado à presença de sinais clínicos, principalmente diarreia, enquanto que  
35 o *assemblage* A é associado a infecções subclínicas (ROBERTSON *et al.*, 2010). No entanto,  
36 diferenças quanto ao delineamento de pesquisa, população amostrada, definição de sintomas,  
37 diagnóstico e exclusão de coinfeções, resultam em resultados conflitantes (CACCIÒ;  
38 LALLE; SVÄRD, 2017).

39 O gênero *Cryptosporidium* é composto de 38 espécies, o desenvolvimento de

1 métodos de diagnóstico e caracterização molecular fez com que um grande número de  
2 espécies não diferenciadas morfológicamente começassem a ser descritas (FENG; RYAN;  
3 XIAO, 2018). As principais espécies que acometem os humanos são *C. hominis* e *C. parvum*,  
4 sendo a primeira antroponótica e a segunda zoonótica. Outras espécies zoonóticas são  
5 relatadas em menor frequência como *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. canis*, *C. felis* e *C. suis*  
6 (RYAN; FAYER; XIAO, 2014).

7 Os métodos de diagnóstico convencionais utilizados para estas protozooses são  
8 baseados na visualização de formas parasitárias em microscópio ótico, com algumas técnicas  
9 empregadas antes da visualização com objetivo de concentrar essas formas. No entanto, essas  
10 técnicas são limitadas em sensibilidade e especificidade quando comparadas às técnicas  
11 moleculares (VAN DEN BOSSCHE *et al.*, 2015). Os diferentes métodos de diagnóstico  
12 empregados e as populações e regiões que compõe os estudos resultam em uma grande  
13 variação nas estimativas da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* em pessoas com diarreia.

14 A ocorrência destes protozoários é relatada em ambientes e populações no Brasil,  
15 incluindo as mais vulneráveis, porém a falta padronização de métodos e a seleção de  
16 populações específicas (crianças e pacientes imunocomprometidos) dificultam uma melhor  
17 compreensão da epidemiologia. Ainda há uma carência de dados sobre a frequência e a  
18 caracterização molecular destes protozoários em pacientes com gastroenterite atendidos pela  
19 atenção primária a saúde (COELHO *et al.*, 2017; CUNHA; PERALTA; PERALTA, 2019).

20 Este estudo teve como objetivo identificar a frequência de *Giardia* e  
21 *Cryptosporidium* e caracterizar molecularmente grupamentos genéticos (*assemblages*) e  
22 espécies em pacientes com diarreia atendidos no serviço público de saúde.

23

## 24 **Material e Métodos**

25

### 26 **Local de estudo e coleta das amostras**

27

28 Londrina (23°18'36"S, 51°09'46"W) é o segundo maior município do estado do  
29 Paraná, com população em 2019 estimada em 569.733 mil habitantes, densidade demográfica  
30 de 306,52 hab/km<sup>2</sup> e Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 0,778 (IBGE, 2019). O  
31 município possui ótimos indicadores de saneamento, indicador de atendimento total de água  
32 de 100% e indicador de atendimento total de esgoto de 99,98% (BRASIL, 2019).

33 Foram coletadas entre agosto/2017 e abril/2018 112 amostras de fezes de  
34 consistência pastosa ou diarreica, encaminhadas pelas unidades básicas de saúde do município

1 para realização de exame coproparasitológico no laboratório clínico do município. As  
2 amostras foram aliquotadas e armazenadas a -20° C até o momento da extração de DNA.

3 Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa de seres humanos da  
4 Universidade Estadual de Londrina, parecer N° 2.347.824/2017, pela Secretaria Municipal de  
5 Saúde do município de Londrina/PR.

## 6 7 **Coleta de dados**

8  
9 A partir do cadastro municipal do pacientes atendido pelas Unidade Básicas de  
10 Saúde, foi realizada a coleta da data de nascimento, sexo, e endereço dos pacientes, os  
11 endereços foram geocodificados no Google Earth, e pelo qGIS v2.18.13 foram plotados em  
12 mapa e realizado um mapa de calor pela estimativa de Kernel.

## 13 14 **Extração de DNA**

15  
16 Uma alíquota de 200 a 250mg de fezes foi utilizada para extração de DNA utilizando  
17 kit comercial (*Nucleospin Tissue, Macherey Nagel*) seguindo o protocolo do fabricante com  
18 incremento de três ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento (56°C) antes da  
19 incubação com Proteinase K.

## 20 21 **Nested-PCR**

22  
23 Para o diagnóstico de *Cryptosporidium* foi realizada uma *nested*-PCR (n-PCR) para  
24 amplificar uma porção de 820 a 840pb do gene 18SrRNA (XIAO *et al.*, 2001). Utilizou-se 1X  
25 PCR Buffer Invitrogen®; 200 µM de dNTPs; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 400 nM de cada  
26 oligonucleotídeo; 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase; 2 µg BSA; 2,0 µL do DNA  
27 extraído e água ultra pura para compor o volume final de 25 µL. O produto da primeira reação  
28 foi diluído em 50 µL de água ultrapura antes da segunda reação. Foram utilizadas as seguintes  
29 condições para amplificação: 5min a 95°C; seguidos por 35 ciclos de 45s a 94°C; 45s a 55°C;  
30 60s a 72°C e 5min a 72°C.

31 Para o diagnóstico de *Giardia* a n-PCR foi realizada pra amplificar uma região de  
32 175 pb do gene 18S rRNA específico do gênero, foi utilizado em cada reação: 1X PCR Buffer  
33 Invitrogen®; 200 µM de cada dNTPs; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 nM de cada oligonucleotídeo;

1 5% de DMSO (dimetilsulfóxido); 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase; 1 µL de DNA  
2 e água ultra pura para compor um volume de 25 µL (LANGKJÆR *et al.*, 2007). O produto da  
3 primeira reação foi diluído em 25 µL de água ultrapura para dar sequência à segunda reação.  
4 Foram utilizadas as seguintes condições para a amplificação em ambas reações: 5min a 95°C;  
5 seguidos por 35 ciclos de 30s a 95°C; 30s a 55°C; 30s a 72°C e 5min a 72°C.

6

## 7 **Caracterização Molecular de *Giardia duodenalis***

8

9 As amostras positivas para *Giardia* no gene 18SrRNA foram submetidas à  
10 amplificação dos genes Beta-giardin, GDH e TPI para caracterização molecular  
11 (THOMPSON; ASH, 2016).

12 Para o gene Beta-giardin foi utilizada uma n-PCR para amplificar um fragmento de  
13 511 pb, utilizou-se: 1X PCR Buffer Invitrogen®; 200 µM de cada dNTPs; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>;  
14 200 nM de cada oligonucleotideo; 2 µg de BSA, 1 U de Platinum® Taq DNA Polimerase; 2  
15 µL de DNA e água ultra pura para um volume de reação de 25 µL (LALLE *et al.*, 2005). O  
16 produto da primeira reação foi diluído em 25 µL de água ultrapura e 2 µL foram utilizados na  
17 segunda reação. As condições das duas reações foram: 5min a 95°C; seguidos por 35 ciclos de  
18 30s a 95°C; 30s a 63°C; 30s a 72°C e 5min a 72°C.

19 Para o gene GDH (Glutamato desidrogenase) foi utilizada uma semi *nested*-PCR pra  
20 amplificar um fragmento de 432 pb, utilizou-se: 1X PCR Buffer Invitrogen®; 200 µM de  
21 cada dNTPs; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 nM de cada oligonucleotideo; 2µg de BSA, 1 U de  
22 Platinum® Taq DNA Polimerase; 1 µL de DNA e água ultrapura para um volume de reação  
23 de 25 µL. O produto da primeira reação foi diluído em 25 µL de água ultrapura e 1 µL foi  
24 utilizado na segunda reação. As condições das duas reações foram: 5min a 95°C; seguidos por  
25 35 ciclos de 30s a 95°C; 30s a 58°C; 30s a 72°C e 5min a 72°C.

26 Para o gene TPI (triosefosfato isomerase) foi utilizada uma n-PCR para amplificar um  
27 fragmento de 530 pb, utilizou-se: 1X PCR Buffer Invitrogen®; 200 µM de cada dNTPs; 1,5  
28 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 nM de cada oligonucleotideo; 2 µg de BSA, 1 U de Platinum® Taq DNA  
29 Polimerase; 2 µL de DNA e água ultrapura para um volume de reação de 25 µL. O produto da  
30 primeira reação foi diluído em 25 µL de água ultrapura e 2 µL foram utilizados na segunda  
31 reação (SULAIMAN *et al.*, 2003). As condições da primeira reação foram: 5min a 95°C;  
32 seguidos por 35 ciclos de 30s a 95°C; 30s a 53°C; 30s a 72°C e 5min a 72°C. Para a segunda  
33 reação os mesmos parâmetros foram utilizados exceto no anelamento que foi realizado  
34 Touchdown-PCR com 25 ciclos, iniciando com 60,5 °C reduzindo -0,3°C por ciclo, e após

1 mais 10 ciclos utilizando 53°C.

2

### 3 **Sequenciamento de DNA**

4

5 Os fragmentos amplificados nos genes 18s rRNA para *Cryptosporidium* e nos genes  
6 Beta-giardin, GDH e TPI para *Giardia* foram submetidos à purificação utilizando kit  
7 comercial (*Purelink Gel Extration Kit*<sup>®</sup>) a partir do recorte da banda de interesse no gel. O  
8 produto purificado foi enviado para sequenciamento bidirecional por meio do *BigDye*  
9 *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*<sup>®</sup> em um sequenciador automático *Applied Biosystems*  
10 *3730xl DNA Analyzer*.

11 Após o sequenciamento os cromatogramas foram inspecionados visualmente com o  
12 programa Chromas Lite<sup>®</sup>, foi realizado um *contig* das duas fitas (senso e antissenso) da  
13 mesma amostra com o programa BioEdit<sup>®</sup> 7.1 (*Biological Sequence Alignment Editor*).

14 Os *contigs* foram comparados com sequencias padrões de *Giardia duodenalis* e  
15 *Cryptosporidium* depositadas no Genbank, por meio do sistema BLAST (*Basic Local*  
16 *Alignment and Search Tool*) e por alinhamento manual através do programa BioEdit  
17 (RUECKER *et al.*, 2011).

18 Para a discriminação entre *assemblages* e *subassemblages* *Giardia duodenalis* foram  
19 construídos dendogramas, a partir das sequências obtidas, utilizando o método de Neighbor-  
20 *joining* com 1000 repetições de *bootstrap* comparando com sequencias de referência  
21 depositadas no Genbank, através do programa Mega<sup>®</sup> 6 (MINETTI *et al.*, 2015a).

22

### 23 **Análise Estatística**

24

25 Os testes de significância estatística entre os dados de frequência e as variáveis  
26 epidemiológicas foram realizadas pelo teste exato de Fisher ou Qui-quadrado. As associações  
27 foram determinadas pelo cálculo de razão de chances (*odds ratio-OR*). Os cálculos foram  
28 realizados no ambiente R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Foi adotado o nível de  
29 significância de 5%.

30

### 31 **Resultados**

32

33 A idade da população estudada variou de 1 a 87 anos com mediana de 43 anos. Com  
34 relação ao sexo, 59 amostras eram de pacientes do sexo feminino e 53 do sexo masculino. A

1 distribuição geográfica dos pacientes foi visualmente homogênea em toda a área urbana. O  
 2 município de Londrina é composto pela área urbana e oito distritos, 102 amostras foram de  
 3 residentes da área urbana e 10 dos distritos.

4 Das 112 amostras coletadas, 19,64% (22/112) foram positivas para o gênero *Giardia*.  
 5 Considerando as amostras oriundas da área urbana a ocorrência de foi de 18,62% (19/102) e  
 6 nos distritos 30% (3/10), porém não houve diferença estatística entre as localidades (OR  
 7 =1,85; IC95% 0,28 – 9,12;  $p=0,409$ ).

8 A ocorrência em relação ao sexo foi de 20,33% (12/59) em pacientes do sexo  
 9 feminino e 18,86% (10/53) em pacientes do sexo masculino, também não houve diferença  
 10 estatística entre os dois grupos (OR 1,10; IC95% 0,43 – 2,80;  $p=0,845$ ). Entre os grupos  
 11 etários, a menor ocorrência de *Giardia* foi 14,28% (1/7) no grupo de 0-|5 anos e a maior  
 12 23,07% (6/26) no grupo de 5-|18 anos. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=$   
 13 0,813) (Tabela 1).

14

15 **Tabela 1** – Análise de associação da presença de *Giardia duodenalis* e faixa etária, sexo e  
 16 local de moradia de pacientes com diarreia atendidos na atenção primária a saúde,  
 17 Londrina/PR, 2017-2018.

		Positivos/Total	Frequência	OR <sup>1</sup> (IC 95%)	Valor de $p$
Grupos etários	0- 5	1/7	14,28%	0,91 (0,01-10,14)	1
	5- 18	6/26	23,07%	1,63 (0,38-7,07)	0,520
	18- 60	9/40	22,50%	1,58 (0,44-6,10)	0,567
	60-87	6/39	15,38%	1 (referência)	-
Sexo	Masculino	10/53	18,86%	1,10 (0,43-2,80)	0,845
	Feminino	12/59	20,33%		
Local	Urbano	19/102	18,62%	1,85 (0,28-9,12)	0,409
	Distrito	3/10	30%		

<sup>1</sup>Odds Ratio

18 Fonte: O autor

19

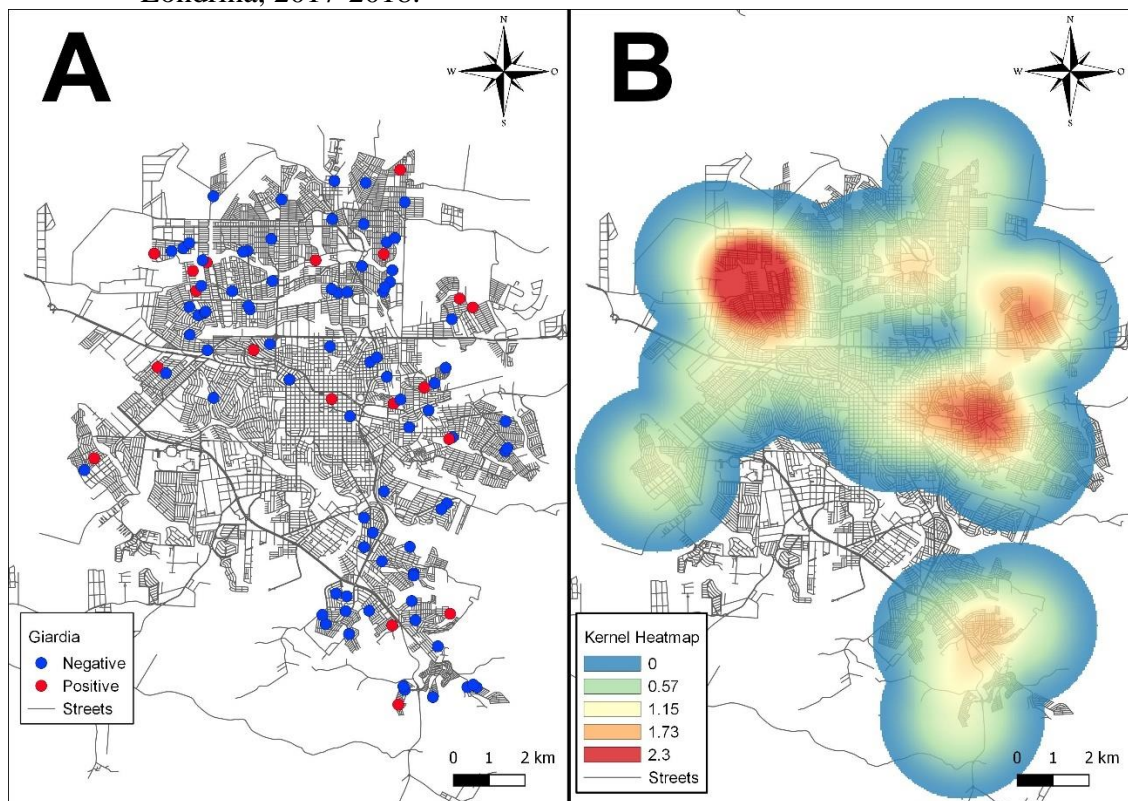
20 *Cryptosporidium* foi diagnosticado em apenas um paciente, representando 0,89%  
 21 (01/112), sendo esta do sexo feminino, de 60 anos, residente na cidade e negativa para

1 *Giardia*.

2 Para verificar a distribuição geográfica dos pacientes positivos os provenientes dos  
3 distritos foram excluídos. A presença de amostras positivas ocorreu em todas as regiões da  
4 área urbana, e não houve diferença estatística entre as regiões ( $p=0,700$ ) (Figura 1).

5

6 **Figura 1** - Distribuição espacial dos pacientes com diarreia positivos e negativos para *Giardia*  
7 *duodenalis* na área urbana (A), e mapa de calor a partir da estimativa de Kernel da  
8 localização dos pacientes positivos para *Giardia duodenalis* na área urbana (B),  
9 Londrina, 2017-2018.



10

11 Fonte: O autor

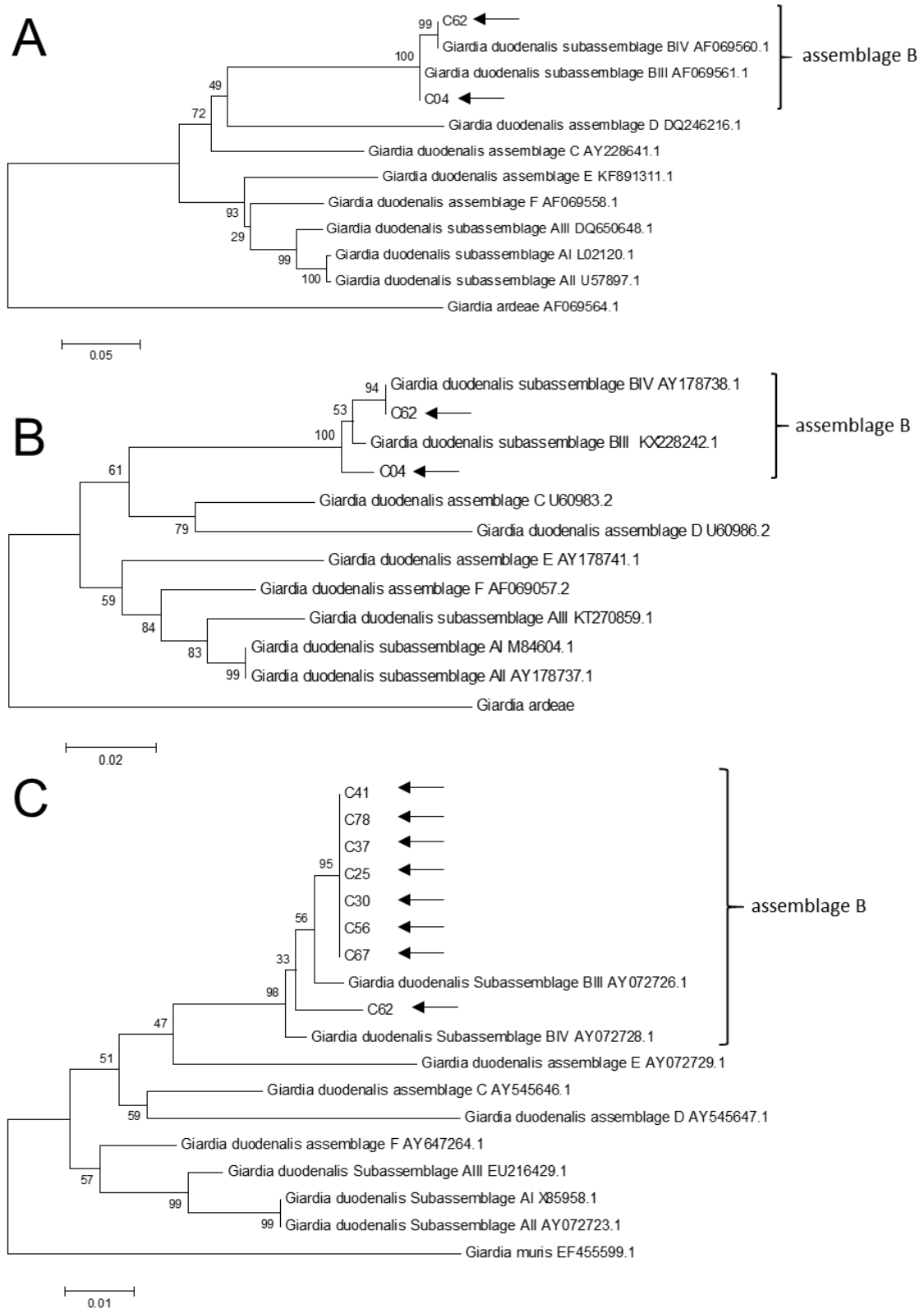
12

13 A amplificação do DNA de *Giardia duodenalis* nos genes de caracterização  
14 molecular foi possível em 45,45% (10/22) das amostras positivas: uma amostra nos três genes  
15 (GDH, Beta-giardin, TPI), duas em dois genes (GDH e TPI) e oito apenas no gene Beta-  
16 giardin.

17 Os fragmentos gerados nos genes de caracterização foram submetidos ao  
18 sequenciamento e foram obtidas sequências com qualidade para a construção de dendogramas  
19 (Figura 2) nas duas amostras positivas no TPI, consideradas *Assemblage B*, duas no GDH  
20 caracterizada como *Assemblage B* e em oito das nove positivas no Beta-giardin também  
21 consideradas *Assemblage B*. Quanto à identificação de *subassemblages*, a partir dos

- 1 dendogramas foi possível definir os *subassemblages* em duas amostras, uma apenas no gene
- 2 TPI, caracterizada como *subassemblage* BIII e a outra no TPI e GDH caracterizada como BIV
- 3 (Tabela 2).
- 4

1 **Figura 2** - Dendrogramas de *Giardia duodenalis* baseados em seqüências de nucleotídeos dos  
 2 genes TPI (A), GDH (B) e Beta-giardin (C) de isolados de fezes humanas do  
 3 presente estudo (marcados com flecha) e isolados padrões retirados do Genbank.  
 4 Os dendogramas foram construídos utilizando o método *Neighbour-joining* no  
 5 software MEGA 6. Números acima ou abaixo dos braços indicam os valores de  
 6 *Bootstrap*.



7  
8

Fonte: O autor

1 **Tabela 2** - *Assemblages e subassemblages de Giardia duodenalis* identificados em fezes  
 2 humanas utilizando os genes GDH, TPI e Beta-giardin em Londrina, PR, 2017-  
 3 2018

Amostra	Idade (anos)	Local	TPI	GDH	Beta-giardin
C04	46	Área Urbana	BIII	B	NA
C62	5	Área Urbana	BIV	BIV	B
C30	10	Área Urbana	NA	NA	B
C56	8	Área Urbana	NA	NA	B
C25	44	Área Urbana	NA	NA	B
C37	37	Área Urbana	NA	NA	B
C41	11	Distrito	NA	NA	B
C67	8	Área Urbana	NA	NA	B
C78	43	Área Urbana	NA	NA	B
C16	64	Área Urbana	NA	NA	BQS

4 Fonte: O autor  
 5 NA: Não houve amplificação  
 6 BQS: Baixa qualidade de sequenciamento  
 7

8 O sequenciamento dos fragmentos amplificados na única amostra positiva para  
 9 *Cryptosporidium* revelou a presença da espécie *C. hominis*, com 100% de identidade com a  
 10 sequência depositada sob acesso MK990042.

11 As sequências geradas nesse estudo foram depositadas no Genbank sob Acesso  
 12 MT050507 - MT050514.

## 14 **Discussão**

16 *Giardia duodenalis* continua endêmica em alguns grupos populacionais no Brasil.  
 17 Estudos que avaliaram crianças em idade escolar e populações em risco social são os que  
 18 relataram maiores frequências (COELHO *et al.*, 2017). As prevalências descritas são muito  
 19 variáveis, a variação ocorre devido ao método diagnóstico utilizado bem como a população  
 20 estudada já que a giardíase apresenta padrões epidemiológicos distintos dependentes da  
 21 população (ADEYEMO *et al.*, 2018; BARTELT; PLATTS-MILLS, 2016).

22 Neste estudo, a população avaliada foi abrangente dentro da atenção primária à  
 23 saúde, foram avaliadas amostras de pacientes com diarreia de diferentes idades, sexos e  
 24 regiões dentro do município, incluindo distritos, não foi avaliado, portanto, apenas populações  
 25 mais suscetíveis como crianças em idade escolar. A partir desta abordagem, foi identificado  
 26 19% de ocorrência de *Giardia duodenalis*, neste mesmo município foi relatada uma  
 27 ocorrência de 3,74% (7/187) em população geral, porém não foi reportada qual a ocorrência  
 28 de *Giardia* entre aqueles que apresentavam diarreia (BENITEZ *et al.*, 2017). Esta alta

1 frequência corrobora com os dados relatados em esgoto deste município, já que este  
2 protozoário foi encontrado em todas amostras de esgoto durante um ano de monitoramento  
3 (MARTINS *et al.*, 2019).

4 A prevalência de *G. duodenalis* em pacientes sintomáticos é variável, em países  
5 desenvolvidos com boa infraestrutura sanitária a prevalência relatada é de 5,81% (HÖRMAN  
6 *et al.*, 2004). Na África do Sul é reportada a presença de *Giardia* em 9,91% dos pacientes com  
7 diarreia (SAMIE *et al.*, 2020). Em regiões metropolitanas de países desenvolvidos a  
8 ocorrência é baixa, e tende a ser esporádica, pode estar relacionada à transmissão  
9 intradomiciliar ou a fatores como contato com animais de produção e/ou silvestres, visita a  
10 parques ambientais, e frequentar piscinas (MINETTI *et al.*, 2015b; ZAJACZKOWSKI *et al.*,  
11 2018).

12 Da mesma maneira, a região do presente estudo possui saneamento (água tratada e  
13 esgoto tratado) universalizados, além de IDH de 0,778, no entanto a frequência encontrada foi  
14 maior quando comparada a outras regiões, portanto, outras formas de transmissão, como a  
15 alimentar, podem estar presentes na região. Estudos com verduras na região relatam a  
16 presença frequente deste protozoário e apontam para que haja uma importante transmissão por  
17 via alimentar (COLLI *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2018)

18 Em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, populações rurais são descritas  
19 com uma prevalência maior de *G. duodenalis* quando comparadas a populações urbanas, pois  
20 estas populações carecem de soluções de saneamento básico além de interagirem mais com o  
21 ambiente o que propicia a transmissão mais facilmente (AL-JAWABREH *et al.*, 2019; NAZ  
22 *et al.*, 2018; SAMIE *et al.*, 2020) Devido os distritos rurais investigados no presente estudo  
23 consistirem de pequenas vilas urbanizadas, com infraestrutura de saneamento e urbanização  
24 (água encanada e fossa séptica) com características semelhantes à cidade, a não ocorrência de  
25 diferença estatística pode indicar que a transmissão nestes locais é semelhante à da área  
26 urbana.

27 O sexo não foi um fator associado à presença de *Giardia*, alguns estudos relatam a  
28 associação com homens, porém essas evidências ainda são controversas e essa variável parece  
29 estar relacionada a outros fatores culturais específicos (RESES *et al.*, 2018; SWIRSKI *et al.*,  
30 2016; ZYLBERBERG *et al.*, 2017).

31 O potencial patogênico de *Giardia* ainda é objeto de discussão, a dúvida que  
32 centraliza essas discussões é se este faz parte do ecossistema intestinal como um comensal ou  
33 se realmente é um agente infeccioso (BARTELT; PLATTS-MILLS, 2016). Correlação  
34 negativa entre a presença de diarreia e a infecção por *Giardia* já foi descrita, e outro estudo

1 aponta *Giardia* como um fator de proteção para a presença de diarreia aguda em crianças  
2 (EFUNSHILE *et al.*, 2019; MUHSEN; COHEN; LEVINE, 2014). No entanto no presente  
3 estudo em pacientes com diarreia houve uma alta frequência de *Giardia*, porém uma vez que  
4 não diarreicos não foram amostrados foi possível correlacionar o estado clínico com a  
5 infecção.

6 Diferenças em apresentações clínicas da giardíase são relatadas, mas só a partir do  
7 estudo molecular deste gênero é que foi possível estratificar isolados em grupos e assim  
8 compreender que diferentes grupos genéticos podem apresentar diferentes epidemiologias e  
9 apresentações clínicas (CACCIÒ *et al.*, 2005). O *assemblage* B foi único grupo encontrado na  
10 caracterização molecular, este grupo é altamente heterogêneo e pode estar associado à  
11 presença de sinais clínicos em humanos, contrariamente na África do sul em ambiente urbano  
12 o *assemblage* A foi associado a diarreia (ANKARKLEV; SVÄRD; LEBBAD, 2012). A  
13 definição que *assemblage* A está geralmente relacionado a doença subclínica e o *assemblage*  
14 B a doença clínica é conflitante e diferenças com relação a sintomatologia podem estar  
15 relacionadas às características específicas de diferentes populações e localidades (CACCIÒ;  
16 LALLE; SVÄRD, 2017).

17 Os dois *subassemblages* do *assemblage* B, BIII e BIV, foram encontrados no  
18 presente estudo, esse *assemblage*, já foi descrito como o mais frequente em crianças em idade  
19 escolar em outro estudo no Paraná, no mesmo estudo o *assemblage* BIV foi o único *sub-*  
20 *assemblage* comum entre humanos, cães e verduras, apontando para uma transmissão  
21 alimentar e/ou zoonótica (COLLI *et al.*, 2015). Considerando que o *assemblage* B é altamente  
22 heterogêneo e tende a formar grupamentos limitados geograficamente, a identificação do  
23 *assemblage* BIV, reforça que este pode ser um importante *subassemblage* endêmico no estado  
24 com transmissão alimentar e/ou zoonótica mesmo em ambientes com bons indicadores de  
25 saneamento (TSUI *et al.*, 2018).

26 A frequência de *Cryptosporidium* em amostras diarreicas foi semelhante a  
27 encontrada em pacientes na Coreia e menor quando comparada a países endêmicos, nestes a  
28 presença está associada a condições sanitárias precárias, como em crianças da África sub-  
29 saariana e Ásia (KOTLOFF *et al.*, 2013; LEE; SONG; YU, 2005). Já em países  
30 desenvolvidos, com boas condições de saneamento a criptosporidiose está frequentemente  
31 associada a surtos de veiculação hídrica (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017;  
32 RYAN; HIJAWI; XIAO, 2017). O município estudado apresenta condições boas de  
33 saneamento, e, portanto, não há uma transmissão frequente como reportada em locais com  
34 falta de saneamento. A presença de *Cryptosporidium* já foi relatada em amostras de esgoto da

1 região, porém espécies frequentes em humanos foram relatadas em baixa frequência, portando  
2 mesmo com a ocorrência em amostras de esgoto o *Cryptosporidium* na região pode estar  
3 associado a quadros esporádicos (MARTINS *et al.*, 2019).

4 A partir do sequenciamento do gene 18s rRNA amplificado, foi possível identificar a  
5 espécie *C. hominis*. Está é uma espécie antroponótica descrita com maior frequência em  
6 ambiente urbano e em países desenvolvidos (XIAO, 2010). No Brasil, esta é a espécie mais  
7 frequente em humanos, e já foi reportada como causa de surto de diarreia em uma creche  
8 (GONÇALVES *et al.*, 2006; PERALTA *et al.*, 2016; ROLANDO *et al.*, 2012). Com relação a  
9 ocorrência ambiental, já foi encontrada em água bruta no estado de São Paulo (ARAÚJO *et*  
10 *al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2016), e em amostras de esgoto em São Paulo/SP e Londrina/PR  
11 (MARTINS *et al.*, 2019; ULLOA-STANOJLOVIĆ *et al.*, 2016). Visto a frequência em  
12 humanos e em amostras ambientais o *C. hominis* figura como uma importante espécie para a  
13 criptosporidiose humana em ambientes urbanos no Brasil. No entanto, uma vez que *C.*  
14 *parvum* também é relatada em humanos no Brasil e já foi descrita no esgoto do município,  
15 não se descarta a presença de ciclo zoonótico com transmissão de *C. parvum* (MARTINS *et*  
16 *al.*, 2019).

## 18 Conclusão

19  
20 Há uma alta frequência de *G. duodenalis* em amostras de fezes de pacientes com  
21 diarreia na atenção primária à saúde. *G. duodenalis* assemblage B, subassemblages BIII e  
22 BIV, estão presentes em quadros diarreicos na região. *Cryptosporidium hominis* ocorre em  
23 baixa frequência na atenção básica a saúde.

## 25 Referências

- 26  
27 ADEYEMO, F. E.; SINGH, G.; REDDY, P.; STENSTRÖM, T. A. Methods for the detection  
28 of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and  
29 environmental regimes. **Acta Tropica**, Basel, v. 184, p. 15-28, Feb. 2018. DOI:  
30 10.1016/j.actatropica.2018.01.011.
- 31 AL-JAWABREH, A.; EREQAT, S.; DUMAIDI, K.; AL-JAWABREH, H.; ABDEEN, Z.;  
32 NASEREDDIN, A. Prevalence of selected intestinal protozoan infections in marginalized  
33 rural communities in Palestine. **BMC Public Health**, London, v. 19, n. 1, 2019.
- 34 ANKARKLEV, J.; SVÄRD, S. G.; LEBBAD, M. Allelic sequence heterozygosity in single  
35 *Giardia* parasites. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 1, p. 65, 2012.

- 1 ARAUJO, R. S.; DROPA, M.; FERNANDES, L. N.; CARVALHO, T. T.; SATO, M. I.;  
2 SOARES, R. M.; MATTE, G. R.; MATTE, M. H. Genotypic characterization of  
3 *Cryptosporidium hominis* from water samples in Sao Paulo, Brazil. **American Journal of**  
4 **Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 85, n. 5, p. 834-838, 2011. DOI:  
5 10.4269/ajtmh.2011.10-0449.
- 6 AW, J. Y. H.; CLARKE, N. E.; MCCARTHY, J. S.; TRAUB, R. J.; AMARAL, S.; HUQUE,  
7 M. H.; ANDREWS, R. M.; GRAY, D. J.; CLEMENTS, A. C. A.; VAZ NERY, S. *Giardia*  
8 *duodenalis* infection in the context of a community-based deworming and water, sanitation  
9 and hygiene trial in Timor-Leste. **Parasites and Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 4–13, 2019.  
10 DOI: 10.1186/s13071-019-3752-9.
- 11 BARTELT, L. A.; PLATTS-MILLS, J. A. *Giardia*: a pathogen or commensal for children in  
12 high prevalence settings? **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 29, n. 5, p.  
13 502–507, Oct. 2016. Disponível em: DOI: 10.1097/QCO.0000000000000293.
- 14 BENITEZ, A. D. N.; MAREZE, M.; MIURA, A. C.; BRUNIERI, D. T. S. C.; FERREIRA, F.  
15 P.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Abordagem da saúde única na ocorrência  
16 de enteroparasitas em humanos de área urbana no norte do Paraná. **Arquivos de Ciências**  
17 **Veterinárias e Zootecnia da UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 4, p. 203-208, 2017.
- 18 BRASIL, I. T. **Ranking do saneamento**. 2019. Disponível em:  
19 <http://www.tratabrasil.org.br/estudos/estudos-itb/itb/ranking-do-saneamento-2019>. Acesso  
20 em: 1 maio 2019.
- 21 CACCIÒ, S. M.; LALLE, M.; SVÄRD, S. G. Host specificity in the *Giardia duodenalis*  
22 species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 66, p. 335–345, Dec.  
23 2017.
- 24 CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling  
25 *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 9, p.  
26 430–437, Set. 2005. Disponível em: DOI: 10.1016/j.pt.2005.06.013.
- 27 COELHO, C. H.; DURIGAN, M.; LEAL, D. A. G.; SCHNEIDER, A. de B.; FRANCO, R.  
28 M. B.; SINGER, S. M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20  
29 years of publications. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. 1–  
30 22, 2017.
- 31 COLLI, C. M.; BEZAGIO, R. C.; NISHI, L.; BIGNOTTO, T. S.; FERREIRA, É. C.;  
32 FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; GOMES, M. L. Identical assemblage of *Giardia*  
33 *duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a  
34 relationship among them. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0118065, Mar. 2015. DOI:  
35 10.1371/journal.pone.0118065.
- 36 CUNHA, F. S.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. New insights into the detection and  
37 molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review.  
38 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 61, p. 1–12, Abr.  
39 2019.
- 40 EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Evolution of monitoring for *Giardia* and  
41 *Cryptosporidium* in water. **Water Research**, Oxford, v. 123, p. 96–112, 2017. DOI:  
42 10.1016/j.watres.2017.06.042.

- 1 EFUNSHILE, A. M.; EZEANOSIKE, O.; ONYEKACHI, O. N. I. I.; UGWU, M. I.; KÖNIG,  
2 B.; ROBERTSON, L. J. Apparent absence of Giardia infections among children under 5-years  
3 of age with acute watery diarrhoea in Abakaliki, Nigeria. **Epidemiology and Infection**,  
4 Cambridge, v. 147, p. e58, Dez. 2019. DOI: 10.1017/S0950268818003151.
- 5 FENG, Y.; RYAN, U. M.; XIAO, L. Genetic Diversity and Population Structure of  
6 Cryptosporidium. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 997–1011, 2018. DOI:  
7 10.1016/j.pt.2018.07.009.
- 8 FERREIRA, F. P.; CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; DE  
9 FREITAS, F. M.; MIURA, A. C.; MAREZE, M.; MARTINS, F. D. C.; URBANO, M. R.;  
10 SEIFERT, A. L.; NAVARRO, I. T. The effect of water source and soil supplementation on  
11 parasite contamination in organic vegetable gardens. **Revista Brasileira de Parasitologia**  
12 **Veterinária**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 327–337, 2018. DOI: 10.1590/s1984-296120180050.
- 13 FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; AMARO, B. C. T.; CANTUSIO NETO, R.; FIUZA, V.  
14 R. S. Cryptosporidium species and giardia genotypes detected in surface water supply of  
15 campinas , southeast Brazil, by molecular methods. **Journal of Veterinary Medicine and**  
16 **Research**, San Diego, v. 3, n. 3, p. 1–7, 2016.
- 17 GONÇALVES, E. M. D. N.; DA SILVA, A. J.; EDUARDO, M. B. D. P.; UEMURA, I. H.;  
18 MOURA, I. N. S.; CASTILHO, V. L. P.; CORBETT, C. E. P. Multilocus genotyping of  
19 Cryptosporidium hominis associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo.  
20 **Clinics**, São paulo, v. 61, n. 2, p. 119–126, abr. 2006. DOI: 10.1590/S1807-  
21 59322006000200006.
- 22 HÖRMAN, A.; KORPELA, H.; SUTINEN, J.; WEDEL, H.; HÄNNINEN, M. L. Meta-  
23 analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of Giardia spp. and  
24 Cryptosporidium spp. infections in humans in the Nordic countries. **International Journal**  
25 **for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 1337–1346, 2004.  
26 DOI:10.1016/j.ijpara.2004.08.009.
- 27 IBGE. Cidades. **Londrina/PR**. Disponível em:  
28 <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/londrina/panorama>. Acesso em: 5 dez. 2019.
- 29 KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.;  
30 PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A.  
31 S.; ZAIDI, A. K.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.;  
32 ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J.  
33 B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.;  
34 QUADRI, F.; ADEGBOLA, R. A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; AKINSOLA, A.;  
35 MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C. E.;  
36 MINTZ, E. D.; BERKELEY, L. Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-  
37 BROWNE, R. M.; LEVINE, M. M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and  
38 young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a  
39 prospective, case-control study. **The Lancet**, London, v. 382, n. 9888, p. 209–222, jul. 2013.  
40 DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2.
- 41 LALLE, M.; JIMENEZ-CARDOSA, E.; CACCIÒ, S. M.; POZIO, E. Genotyping of Giardia  
42 duodenalis from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain  
43 reaction assay. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 1, p. 203–205, Fev. 2005.

- 1 LANGKJÆR, R. B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H. L.; MADDOX-HYTTEL, C. Molecular  
2 and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in  
3 Denmark. **Parasitology**, London, v. 134, n. 3, p. 339–350, 2007. DOI:  
4 10.1017/S0031182006001533.
- 5 LEE, J. K.; SONG, H. J.; YU, J. R. Prevalence of diarrhea caused by *Cryptosporidium*  
6 *parvum* in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea. **The Korean journal of parasitology**,  
7 Korea, v. 43, n. 3, p. 111–114, 2005. DOI: 10.3347/kjp.2005.43.3.111.
- 8 MARTINS, F. D. C.; LADEIA, W. A.; TOLEDO, R. dos S.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I.  
9 T.; FREIRE, R. L. Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage from an urban area  
10 in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 291–  
11 297, 2019. DOI: 10.1590/s1984-29612019037.
- 12 MINETTI, C.; LAMDEN, K.; DURBAND, C.; CHEESBROUGH, J.; FOX, A.; WASTLING,  
13 J. M. Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients  
14 with sporadic giardiasis from England. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 444,  
15 2015a. DOI: 10.1186/s13071-015-1059-z.
- 16 MINETTI, C.; LAMDEN, K.; DURBAND, C.; CHEESBROUGH, J.; PLATT, K.;  
17 CHARLETT, A.; O'BRIEN, S. J.; FOX, A.; WASTLING, J. M. Case-control study of risk  
18 factors for sporadic giardiasis and parasite assemblages in North West England. **Journal of**  
19 **Clinical Microbiology**, Washington, v. 53, n. 10, p. 3133–3140, 2015b. DOI:  
20 10.1128/JCM.00715-15.
- 21 MUHSEN, K.; COHEN, D.; LEVINE, M. M. Can giardia lamblia infection lower the risk of  
22 acute diarrhea among preschool children? **Journal of Tropical Pediatrics**, Oxford, v. 60, n.  
23 2, p. 99–103, 2014. DOI: /10.1093/tropej/fmt085
- 24 NAZ, A.; NAWAZ, Z.; RASOOL, M. H.; ZAHOOR, M. A. Cross-sectional epidemiological  
25 investigations of *Giardia lamblia* in children in Pakistan. **Sao Paulo Medical Journal**, São  
26 Paulo, v. 136, n. 5, p. 449–453, 2018.
- 27 PAWLOWSKI, S. W.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. Diagnosis and Treatment of Acute  
28 or Persistent Diarrhea. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 136, n. 6, p. 1874–1886, 2009.  
29 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.02.072.
- 30 PERALTA, R. H. S.; VELÁSQUEZ, J. N.; CUNHA, F. S.; PANTANO, M. L.; SODRÉ, F.  
31 C.; SILVA, S.; ASTUDILLO, O. G.; PERALTA, J. M.; CARNEVALE, S. Genetic diversity  
32 of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina.  
33 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 1, p. 30–36, Jan. 2016.  
34 DOI: 10.1590/0074-02760150303.
- 35 R DEVELOPMENT CORE TEAM, R. **R: a language and environment for statistical**  
36 **computing**. [S.l: s.n.], 2011.
- 37 RESES, H. E.; GARGANO, J. W.; LIANG, J. L.; CRONQUIST, A.; SMITH, K.; COLLIER,  
38 S. A.; ROY, S. L.; VANDEN ENG, J.; BOGARD, A.; LEE, B.; HLAUSA, M. C.;  
39 ROSENBERG, E. S.; FULLERTON, K. E.; BEACH, M. J.; YODER, J. S. Risk factors for  
40 sporadic *Giardia* infection in the USA: A case-control study in Colorado and Minnesota.  
41 **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 146, n. 9, p. 1071–1078, 2018. DOI:  
42 10.1017/S0950268818001073.

- 1 ROBERTSON, L. J.; HANEVIK, K.; ESCOBEDO, A. A.; MØRCH, K.; LANGELAND, N.  
2 Giardiasis - why do the symptoms sometimes never stop? **Trends in Parasitology**, Oxford, v.  
3 26, n. 2, p. 75–82, 2010. DOI: 10.1016/j.pt.2009.11.010.
- 4 ROLANDO, R. F. R.; SILVA, S. da; PERALTA, R. H. S.; SILVA, A. J. da; CUNHA, F. de  
5 S.; BELLO, A. R.; PERALTA, J. M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by  
6 real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil.  
7 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 4, p. 476–479, jun. 2012.  
8 DOI: 10.1590/S0074-02762012000400006.
- 9 RUECKER, N. J.; HOFFMAN, R. M.; CHALMERS, R. M.; NEUMANN, N. F. Detection  
10 and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested  
11 PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning.  
12 **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 12, p. 3998–4007, jun.  
13 2011. DOI: 10.1128/AEM.02706-10.
- 14 RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current  
15 understanding and research needs. **Parasitology**, London, v. 141, n. 13, p. 1667–1685, Nov.  
16 2014. DOI: 10.1017/S0031182014001085.
- 17 RYAN, U.; HIJAWI, N.; XIAO, L. Foodborne cryptosporidiosis. **International Journal for**  
18 **Parasitology**, Oxford, Sep. 2017. DOI: 10.1016/j.ijpara.2017.09.004.
- 19 SAMIE, A.; TANIH, N. F.; SEISA, I.; SEHERI, L. M.; MPHAHLELE, M. J.; ELBAKRI, A.;  
20 MBATI, P. Prevalence and genetic characterization of *Giardia lamblia* in relation to diarrhea  
21 in Limpopo and Gauteng provinces, South Africa. **Parasite Epidemiology and Control**,  
22 Amsterdam, p. e00140, Jan. 2020.
- 23 SULAIMAN, I. M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R. H.; TROUT, J. M.; SCHANTZ, P.  
24 M.; DAS, P.; LAL, A. a; XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and  
25 potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases**,  
26 Atlanta, GA, v. 9, n. 11, p. 1444–52, Nov. 2003. DOI: 10.3201/eid0911.030084.
- 27 SWIRSKI, A. L.; PEARL, D. L.; PEREGRINE, A. S.; PINTAR, K. A comparison of  
28 exposure to risk factors for giardiasis in non-travellers, domestic travellers and international  
29 travellers in a Canadian community, 2006-2012. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.  
30 144, n. 5, p. 980–999, 2016. DOI: 10.1017/S0950268815002186.
- 31 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium*  
32 infections. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 40, p. 315–323, Jun. 2016.  
33 DOI: 10.1016/j.meegid.2015.09.028.
- 34 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium*  
35 infections: what's new? **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 75, p. 103951,  
36 Nov. 2019. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103951.
- 37 TSUI, C. K.-M.; MILLER, R.; UYAGUARI-DIAZ, M.; TANG, P.; CHAUVE, C.; HSIAO,  
38 W.; ISAAC-RENTON, J.; PRYSTAJECKY, N. Beaver Fever: whole-genome  
39 characterization of waterborne outbreak and sporadic isolates to study the zoonotic  
40 transmission of Giardiasis. **mSphere**, Washington, DC, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2018. DOI:  
41 10.1128/mSphere.00090-18.

- 1 ULLOA-STANOJLOVIĆ, F. M.; AGUIAR, B.; JARA, L. M.; SATO, M. I. Z.; GUERRERO,  
2 J. A.; HACHICH, E.; MATTÉ, G. R.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; DE ARAÚJO, R. S.  
3 Occurrence of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* sp. in wastewater samples from São  
4 Paulo State, Brazil, and Lima, Peru. **Environmental Science and Pollution Research**,  
5 Landsberg, DEU, v. 23, n. 21, p. 22197–22205, Nov. 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-7537-  
6 9.
- 7 VAN DEN BOSSCHE, D.; CNOPS, L.; VERSCHUEREN, J.; VAN ESBROECK, M.  
8 Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of  
9 *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in feces. **Journal of**  
10 **Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 110, p. 78–84, 2015. DOI:  
11 10.1016/j.mimet.2015.01.016.
- 12 XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental**  
13 **Parasitology**, New York, v. 124, n. 1, p. 80–89, jan. 2010. DOI:  
14 10.1016/j.exppara.2009.03.018.
- 15 XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T. K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular  
16 characterization of cryptosporidium oocysts in samples of raw surface water and wastewater.  
17 **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1097–1101, mar.  
18 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.3.1097-1101.2001.
- 19 ZAJACZKOWSKI, P.; MAZUMDAR, S.; CONATY, S.; ELLIS, J. T.; FLETCHER-  
20 LARTEY, S. M. Epidemiology and associated risk factors of giardiasis in a peri-urban setting  
21 in New South Wales Australia. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 147, p. 1-9,  
22 2018. DOI: 10.1017/S0950268818002637.
- 23 ZYLBERBERG, H. M.; GREEN, P. H. R.; TURNER, K. O.; GENTA, R. M.; LEBWOHL, B.  
24 Prevalence and predictors of giardia in the United States. **Digestive Diseases and Sciences**,  
25 New York, v. 62, n. 2, p. 432–440, 2017. DOI: 10.1007/s10620-016-4447-0.
- 26

## 1 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2

3 Em paciente internados no setor de Moléstias Infeciosas do Hospital Universitário  
4 Regional/UEL, *Cryptosporidium e Giardia* foram diagnosticados apenas naqueles que  
5 manifestavam Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

6 Esta é a primeira descrição de *Cryptosporidium suis* em humanos no Brasil. Esta  
7 presença alerta para a existência de um ciclo zoonótico em populações de  
8 imunocomprometidos

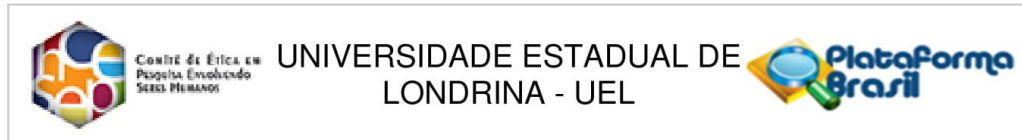
9 Há uma alta frequência de *Giardia* em amostras de fezes de pacientes com diarreia  
10 provenientes da atenção primária à saúde; a presença de isolados do *assemblage* B,  
11 *subassemblages* BIII e BIV, nestes pacientes indicam que estes *subassemblages* estão  
12 presentes em quadros diarreicos.

13 *Cryptosporidium* ocorre em baixa frequência na população e a presença de  
14 *Cryptosporidium hominis* indica que há ciclo antroponótico na região.

15 A ocorrência de *Giardia* não foi associada à idade, sexo e ao local de moradia (área  
16 urbana ou distritos) em pacientes da atenção primária a saúde.

17

- 1 **6 ANEXOS**
- 2 **6.1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES**
- 3 **HUMANOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Epidemiologia Molecular de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em População Hospitalar e Caracterização Molecular em esgoto da Região dos Pacientes.

**Pesquisador:** Roberta Lemos Freire

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 63672217.3.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCA - Programa de Pós Graduação em Ciência Animal

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.347.824

#### Apresentação do Projeto:

*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são protozoários zoonóticos conhecidos por causarem quadros de doença diarreica em animais e humanos e por estarem frequentemente relacionados a surtos de diarreia. A giardiase e a criptosporidiose são doenças subnotificadas e faltam dados para melhor compreender a distribuição e a epidemiologia dessas protozooses no Brasil. O objetivo dessa pesquisa é diagnosticar e avaliar a epidemiologia molecular de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras clínicas de humanos atendidos no setor de moléstias infecciosas do Hospital Universitário de Londrina, avaliar a presença destes protozoários em amostras de esgoto de regiões com a presença de humanos positivos e comparar os isolados clínicos com os ambientais. Com este projeto espera-se encontrar a presença de ambos protozoários na população em estudo e em esgoto bruto, caracterizar as espécies e subtipos de *Cryptosporidium*, assemblages e genótipos de *Giardia* presentes nessas amostras e fatores associados as infecções a fim de elucidar a epidemiologia molecular de ambas protozooses. A comparação dos isolados clínicos com ambientais poderá fornecer dados que suportam o uso do monitoramento em esgoto para prever a doença em humanos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar espécies e subtipos do gênero *Cryptosporidium* e assemblages e genótipos de *Giardia*

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

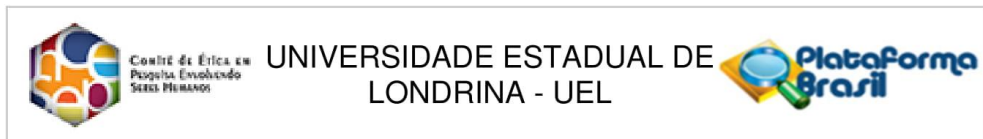
**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.347.824

duodenalis em amostras clínicas de pacientes atendidos no setor de moléstias infecciosas do Hospital Universitário/UEL, em amostras diarreicas/pastosas recebidas pelo Laboratório Municipal de Análises Clínicas (CENTROLAB) para diagnóstico parasitológico e em amostras de esgoto oriunda de regiões com pacientes positivos.

Objetivo Secundário:

Diagnosticar e caracterizar por meio de PCR, PCR-RFLP e sequenciamento as espécies e subtipos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes e esgoto.

Diagnosticar e caracterizar por meio de PCR e sequenciamento as espécies, assemblages e genótipos de *Giardia duodenalis* em amostras de fezes e esgoto.

Determinar as prováveis fontes de infecção, se humana ou animal, por meio da identificação genotípica dos isolados clínicos e ambientais.

Estabelecer associações quanto a presença de humanos positivos e amostras de esgoto positivas.

Estabelecer associações entre as variáveis epidemiológicas descritas no instrumento de coleta de dados e o desfecho em pacientes internados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Redação clara e precisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Este projeto já foi aprovado pelo Comitê de Ética em janeiro de 2017 e, agora, trata-se de uma segunda emenda ao projeto para mudança dos critérios de inclusão dos participantes.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Redação clara e precisa.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

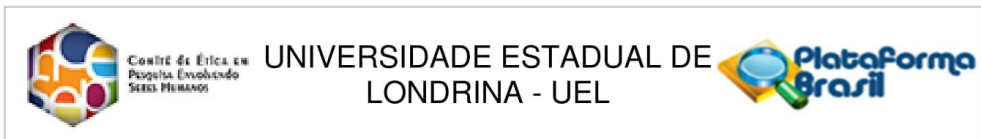
**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezado (a) Pesquisador (a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

<b>Endereço:</b> LABESC - Sala 14	<b>CEP:</b> 86.057-970
<b>Bairro:</b> Campus Universitário	
<b>UF:</b> PR	<b>Município:</b> LONDRINA
<b>Telefone:</b> (43)3371-5455	<b>E-mail:</b> cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.347.824

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1000669_E2.pdf	16/10/2017 09:06:13		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Final_PBv3.docx	16/10/2017 09:00:50	Roberta Lemos Freire	Aceito
Outros	centrolab.jpg	16/10/2017 09:00:20	Roberta Lemos Freire	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_scanner.docx	10/01/2017 16:21:57	Roberta Lemos Freire	Aceito
Outros	Editais_PBA_2016_RESULTADO_FINAL.pdf	10/01/2017 16:19:16	Roberta Lemos Freire	Aceito
Outros	Parecer_CAPEC_HU_TESE_Felippe.pdf	10/01/2017 16:18:33	Roberta Lemos Freire	Aceito
Outros	termo_de_confidencialidade_e_sigilo_scanner.jpg	10/01/2017 16:16:00	Roberta Lemos Freire	Aceito
Outros	termo_Banco_de_amostra.jpg	10/01/2017 16:15:26	Roberta Lemos Freire	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FELIPPE.doc	09/01/2017 21:48:15	Roberta Lemos Freire	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LONDRINA, 25 de Outubro de 2017

Assinado por:  
**Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
 (Coordenador)

Endereço: LABESC - Sala 14  
 Bairro: Campus Universitário  
 UF: PR Município: LONDRINA  
 Telefone: (43)3371-5455 CEP: 86.057-970  
 E-mail: cep268@uel.br