

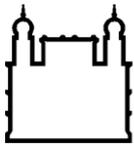
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

**Estudo de *Balantidium* sp. (Claparède e Lachmann, 1858)
isolados de suínos, primatas não humanos cativos e humanos
no Estado Rio do Janeiro, Brasil**

ALYNNE DA SILVA BARBOSA

Rio de Janeiro
Setembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ALYNNE DA SILVA BARBOSA

Estudo de *Balantidium* sp. (Claparède e Lachmann, 1858) isolados de suínos, primatas não humanos cativos e humanos no Estado Rio do Janeiro, Brasil

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências na Área de
Parasitologia

Orientador (es): Prof. Dr^a Maria Regina Reis Amendoeira
Prof. Dr Otilio Machado Pereira Bastos

Rio de Janeiro
Setembro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

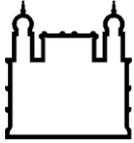
B238 Barbosa, Alynne da Silva

Estudo de *Balantidium* sp. (Claparède e Lachmann, 1858) isolados de suínos, primatas não humanos cativos e humanos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil / Alynne da Silva Barbosa. – Rio de Janeiro, 2014.
xix, 251 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.
Bibliografia: f. 237-251

1. *Balantidium coli*. 2. Diagnóstico parasitológico. 3. Epidemiologia.
4. Cultivo xênico. 5. Biologia molecular. 6. Ultraestrutura. I. Título.

CDD 636.0896959



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: ALYNNE DA SILVA BARBOSA

Estudo de *Balantidium* sp. (Claparède e Lachmann, 1858) isolados de suínos, primatas não humanos cativos e humanos no Estado Rio do Janeiro, Brasil

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr^a. Maria Regina Reis Amendoeira
Prof. Dr. Otilio Machado Pereira Bastos

Aprovada em: 29/07/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (IOC/Fiocruz) - Presidente

Prof. Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes (UFRRJ)

Prof. Dr. Alcides Pissinatti (CPRJ/INEA)

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello (UERJ)

Prof. Dr. Alexander Sibajev (UFRR)

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2015.

A minha mãe, por ser o alicerce da minha força.
Dedicatória

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao programa *stricto sensu* da Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz.

Ao Laboratório de Toxoplasmose e outras protozooses do Instituto Oswaldo Cruz.

Ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal Fluminense, onde realizei parte dessa tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao programa de doutorado Sanduíche do CNPq, Ciências sem Fronteiras pelo auxílio financeiro.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa (Faperj) pelo fomento concedido.

Ao Departamento de Parasitologia da Universidade Complutense de Madrid, onde realizei uma parte do meu Doutorado.

Ao Centro de Primatologia do Estado do Rio de Janeiro (CPRJ/INEA) e ao Setor de Primatologia (Cecal) da Fiocruz por permitir a coleta de amostras dos primatas não humanos cativos.

À Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth da Fundação Oswaldo Cruz.

Gostaria de agradecer aos meus queridos orientadores Dra. Maria Regina e Dr Otilio Machado pelos conselhos, ensinamentos e apoio contínuo, fundamentais para realização dessa tese e abertura dessa linha de pesquisa.

À Dra. Claudia Uchôa por toda excelente colaboração científica, desde o desenho dos protocolos até a correção dos artigos e da tese.

Ao Dr. Alcides Pissinati pela colaboração científica e ensinamentos fascinantes na área da Primatologia.

À Dra Helene Barbosa pela maravilhosa colaboração na microscopia e ultraestrutura, com a qual aprendi muito.

Ao Dr Francisco Ponce Gordo pela perfeita colaboração das etapas de biologia molecular.

À Dra Ana Beatriz pela brilhantes análises estatísticas.

Às maravilhosas equipes do CPRJ/INEA e do Cecal/Fiocruz, pessoas incríveis que me ajudaram em toda as etapas de coleta do material fecal dos primatas não humanos e tornaram todo o trabalho de campo extremamente prazeroso.

Ao produtores de suínos, seus familiares e tratadores, que foram fundamentais para realização deste trabalho, pois além de terem permitido o estudo, também atuaram em todas as etapas do trabalho de campo. Pessoas incríveis que me ensinaram muito e recepcionaram toda a equipe de campo com muito carinho.

À minha maravilha equipe, sem a qual nada disso seria possível, simplesmente anjos que encontrei e conheci no caminho desses quatro anos de tese, filhos de Laboratório e de campo, Laís Verdán Dib, Eduarda Peixoto, Matheus Lessa Cardozo, Mayara Perlingeiro de Siqueira e William Chaves. Muito, muito, muito obrigada. Adoro de verdade vocês. Contem sempre comigo.

Às pessoas especiais, sem a qual este trabalho não seria possível como Luiz Claudio pela sensacional atuação nos trabalhos de campo e a fantástica experiência no processamento do material para microscopia eletrônica realizado pela Sandra Maria do Laboratório de Biologia Estrutural.

A meu amigo querido Marcus Maia que me ajudou a transformar uma sala, em um Laboratório de Protozoários em Cultivo.

À minha família, minha base, meu chão e alicerce. Meus irmãos Shaenny e Guthierry por me fazerem rir, mesmo estando muito cansada e com tendinite.

Meu namorado, noivo, marido e amor Anderson Martins por todo apoio, torcida e contribuição nessa louca jornada.

E a você minha mãe, Eliane Barbosa, meu tudo, minha melhor amiga e incentivadora. Essa tese é nossa. Te amo.

*Você nunca sabe a força que tem, até que sua
única alternativa é ser forte.*

Johnny Deep

Estudo de *Balantidium* sp. (Claparède e Lachmann, 1858) isolados de suínos, primatas não humanos cativos e humanos no Estado Rio do Janeiro, Brasil

RESUMO
TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Alyne da Silva Barbosa

Balantidium coli é um protozoário parasito de humanos, primatas não humanos e suínos. A balantidiose é considerada uma zoonose negligenciada e quadros graves da doença geram disenteria podendo levar o hospedeiro ao óbito. Neste contexto, foi propôsto estudar a diversidade de isolados de *Balantidium* sp. de humanos, suínos e primatas não humanos cativos, no estado do Rio de Janeiro. Entre 2012 a 2015 foram estudadas 790 amostras fecais de suínos, 1115 de primatas não humanos cativos e 114 dos tratadores desses animais. Participaram do estudo nove granjas de suínos e dois criatórios de símios localizados em diferentes municípios desse estado. O material fecal dos suínos foi obtido diretamente da ampola retal, sendo 88 amostras de propriedades familiares e 702 de granjas industriais. Para os símios optou-se por coletar amostras fecais dos seus recintos, sendo 960 do Cecal/Fiocruz e 155 do CPRJ/INEA. Foram incluídas nesta pesquisa mais de 30 espécies de primatas do Novo Mundo (NM) e duas do Velho Mundo (VM). Os tratadores desses animais foram convidados a participar do estudo e os que aceitaram, receberam um *kit* de coleta de fezes. As amostras foram submetidas ao exame direto e as técnicas de Faust et al., Lutz, Sheather e Ritchie modificadas. *B. coli* foi o parasito que apresentou maior frequência, tanto nas granjas familiares, 71,6%, quanto nas granjas industriais, 46,4% dos suínos. Nos primatas do Cecal, *B. coli* também foi o mais diagnosticado, 47,6%, sendo principalmente detectado no gênero *Macaca*, enquanto que a frequência do protozoário no CPRJ foi de 3,8%. Nenhuma forma evolutiva de *B. coli* foi detectada nas amostras dos tratadores. Cistos do parasito foram mais diagnosticados pelo exame direto, 22,4% e pela técnica de Lutz, 21%. O exame direto favoreceu o diagnóstico dessa parasitose, pois também detectou os trofozoítos nas fezes. Amostras que apresentaram no mínimo 10 trofozoítos e/ou 30 cistos de *B. coli* foram submetidas ao isolamento em meio Pavlova modificado. Foram mantidas 40 cepas do parasito por mais de 30 meses, sendo 30 isoladas de suínos e 10 dos símios *Cynomolgus*. Foi realizada análise de comportamento cinético nos meios Pavlova, LES e TYSGM9, sob diferentes tempos de incubação em estufa microbiológica. Os trofozoítos apresentavam-se viáveis até 72 horas de incubação nos meios Pavlova modificado e TYSGM-9, sendo que o meio Pavlova mostrou-se mais adequado para a rotina laboratorial devido a seu baixo custo. Cepas em manutenção, assim como mais 34 amostras fecais, que continham cistos do parasito foram submetidas a estudos moleculares a partir da amplificação do fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2. O padrão molecular de *B. coli* foi confirmado em todas as amostras, além de ter sido observado a presença de sequências variantes do tipo A0 em todos os fragmentos analisados. Duas cepas com maior crescimento quantitativo foram escolhidas para estudos morfológicos, uma de suíno e outra de *Cynomolgus*. Esses foram realizados por meio de conjugados fluorescentes, microscopia eletrônica de varredura e transmissão, que também confirmaram a identidade taxonômica do parasito, além de ter revelado achados ainda não relatados na literatura, onde se destacam parasitos amiconucleados, perfil de microtúbulos e presença de hidrogenossomos/mitocôndrias. Comprovou-se que suínos e primatas não humanos, podem estar parasitados com cepas de *B. coli* com elevada homogeneidade genética, embora sejam hospedeiros muito distantes filogeneticamente. Esta pesquisa ampliou o arcabouço de informações biológicas, morfológicas e moleculares de *Balantidium coli*.

Study of *Balantidium* spp. (Claparede and Lachmann, 1858) isolated from pigs, captives non-human primates and human in the state Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Alyne da Silva Barbosa

Balantidium coli is a protozoan parasite of humans, non-human primates and pigs. The balantidiosis is considered a neglected zoonotic disease and severe cases of the disease generate dysentery may lead the host to death. In this context, it has been proposed to study the diversity of *Balantidium* spp. isolated of human, captives non-human primates and pigs in the state of Rio de Janeiro. Between 2012 to 2015 were studied 790 stool samples from pigs, 1115 of captive non-human primates and 114 of the caretakers of these animals. The study included nine pig farms and two breeding centers of macaques located in different cities of this state. Fecal material from pigs was obtained directly from the rectum, 88 samples of family farms and 702 industrial farms. For apes, were collected fecal samples of their enclosures, of which 960 came from Cecal/Fiocruz and 155 of CPRJ/INEA. Were included in this study over 30 species of New World primates (NM) and two Old World (VM). The caretakers of these animals have been invited to participate and those who accepted, received a kit to collect stool. The samples were submitted to direct examination and the techniques of Faust et al., Lutz, Sheather and Ritchie modified. *B. coli* was the parasite with the highest frequency, both in family farms, 71.6%, as in industrial farms, 46.4% of pigs. In primates of the Cecal, *B. coli* was also the most frequently diagnosed, 47.6%, which is mainly detected in the genus *Macaca*, whereas the frequency of the protozoa in CPRJ was 3.8%. No evolutionary form of *B. coli* was detected in the samples of the caretakers of these animals. Cysts of the parasite were more frequently diagnosed by direct examination, 22.4% and by Lutz technique, 21%. Direct examination favored the diagnosis of this parasitosis, it also detected the trophozoites in the stool. Samples with at least 10 trophozoites and/or 30 cysts of *B. coli* were subjected to isolation on Pavlova modified medium. 40 strains were held of the parasite for more than 30 months, these 30 were isolated from pigs and 10 of *Cynomolgus* macaques. Kinetics analysis was performed in media Pavlova, LES and TYSGM9 under different incubation times microbiological incubator. Trophozoites had to be viable up to 72 hours of incubation in media Pavlova modified and TYSGM-9, and the Pavlova was more suitable for routine laboratory due to its low cost. Strains maintenance as well as over 34 fecal samples containing parasite cysts were subjected to molecular studies from the amplification fragment ITS1 - 5.8S rRNA - ITS2. The molecular pattern of *B. coli* was confirmed in all the samples, and it was observed the presence of variant sequences of the A0 type in all the analyzed fragments. Two strains with higher quantitative growth were chosen for morphological studies, one of the pig and other of *Cynomolgus* macaques. These were carried out by means of fluorescent conjugates, scanning electron microscopy and transmission, which also confirmed the taxonomic identity of the parasite, and has revealed findings not yet reported in the literature, which features amiconucleated parasites, microtubule profile and presence of hydrogenosomes/mitochondria. It has been shown that pigs and non-human primates, may be infected with strains of *B. coli* with high genetic homogeneity, although they are phylogenetically very distant hosts. This research has expanded the informations biological, morphological and molecular of *Balantidium coli*.

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Taxonomia | 1 |
| 1.2 Histórico | 1 |
| 1.3 Características morfológicas e fisiológicas | 2 |
| 1.4 Ciclo biológico e Mecanismos de Transmissão | 8 |
| 1.5 Epidemiologia | 11 |
| 1.5.1 Hospedeiros | 14 |
| 1.6 Patogenia, Manifestações Clínicas e Tratamento | 25 |
| 1.7 Diagnóstico | 32 |
| 1.7.1 Diagnóstico Coproparasitológico | 32 |
| 1.7.2 Cultura | 34 |
| 1.7.3 Biologia Molecular | 40 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 46 |
| 3 OBJETIVOS | 47 |
| 3.1 Objetivo Geral | 47 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 47 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 4.1 Considerações éticas | 48 |
| 4.2 Local do estudo | 48 |
| 4.2.1 Localização das Granjas de Suínos | 48 |
| 4.2.2 Localização dos Criatórios de primatas não humanos | 49 |
| 4.3 Caracterização do local de estudo e coleta de amostras | 49 |
| 4.3.1 Caracterização das granjas e coleta de amostras fecais dos suínos | 49 |
| 4.3.2 Caracterização dos criatórios e coleta de amostras fecais dos primatas não humanos..... | 54 |
| 4.3.3 Coleta de amostras fecais dos manipuladores dos animais..... | 61 |
| 4.4 Análises Parasitológicas | 62 |

| | |
|--|------------|
| 4.4.1 Exame direto | 64 |
| 4.4.2 Técnica de Ritchie (1948) modificada por Young et al. (1979) | 64 |
| 4.4.3 Técnica de Faust et al. (1938) | 65 |
| 4.4.4 Técnica de Sheather (1923) modificada por Huber et al. (2003) | 65 |
| 4.4.5 Técnica de Lutz (1919) | 66 |
| 4.4.6. Análise estatística dos resultados parasitológicos..... | 66 |
| 4.5 Isolamento e Manutenção <i>in vitro</i> do protozoário | 68 |
| 4.5.1 Análise laboratorial e seleção das amostras para isolamento | 68 |
| 4.5.2 Preparação do meio de cultura..... | 68 |
| 4.5.3 Isolamento <i>in vitro</i> das cepas de <i>Balantidium coli</i> | 69 |
| 4.5.4 Manutenção <i>in vitro</i> das cepas de <i>Balantidium coli</i> | 72 |
| 4.6 Avaliação do comportamento das cepas em diferentes meios de cultura xênicos | 72 |
| 4.6.1 Preparação dos meios de cultura | 73 |
| 4.6.2 Produção de massa parasitária | 77 |
| 4.6.3 Produção do inóculo | 78 |
| 4.6.4 Avaliação do comportamento do protozoário | 79 |
| 4.6.5 Análise dos resultados | 79 |
| 4.7 Análise Molecular | 81 |
| 4.7.2 Extração de DNA das amostras em cultivo | 82 |
| 4.7.3 Extração de DNA das amostras de fezes | 83 |
| 4.7.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR) | 84 |
| 4.7.5 Purificação do DNA amplificado | 86 |
| 4.7.6 Análises das sequências | 87 |
| 4.8 Ultraestrutura | 88 |
| 4.8.1 Processamento de material biológico para Microscopia de fluorescência..... | 88 |
| 4.8.2 Preparação do material para Microscopia eletrônica..... | 89 |
| 5.1 CAPÍTULO 1..... | 94 |
| 5.2 CAPÍTULO 2..... | 110 |
| 5.3 CAPÍTULO 3..... | 130 |
| 5.4 CAPÍTULO 4..... | 140 |
| 5.5 CAPÍTULO 5..... | 154 |
| 5.6 CAPÍTULO 6..... | 170 |

| | |
|-------------------------------------|------------|
| 5.7 CAPÍTULO 7..... | 184 |
| 5.8 CAPÍTULO 8..... | 207 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 229 |
| 7 CONCLUSÕES | 234 |
| 8 PERSPECTIVAS FUTURAS | 236 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 237 |
| ANEXOS | 252 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Trofozoíto de <i>Balantidium coli</i> isolado de primata não humano em fotomicrografia sem coloração. | 2 |
| Figura 2. Esquema de trofozoíto de <i>Balantidium coli</i> . a. ranhuras longitudinais na cutícula. | 4 |
| Figura 3. Esquema de trofozoíto e cisto de <i>Balantidium</i> sp. com identificação de organelas..... | 5 |
| Figura 4. Trofozoíto de <i>Balantidium coli</i> de primata não humano em processo de divisão binária transversal. Fotomicrografia sem coloração. | 6 |
| Figura 5. Cisto de <i>Balantidium coli</i> de suínos (<i>Sus scrofa</i>). Fotomicrografia sem coloração. | 8 |
| Figura 6. Esquema do Ciclo biológico de <i>Balantidium coli</i> | 9 |
| Figura 7. Esquema das regiões do RNA ribossomal. | 41 |
| Figura 8. Esquema de classificação das variantes de <i>Balantidium coli</i> segundo as estruturas secundárias. Em A - região ITS1 e em B - ITS2 | 44 |
| Figura 9. Esquema de classificação das variantes A0, B0 e B1 em A0a, A0b, B0a, B0b, B1a e B1b do RNAr - ITS1 e RNAr – ITS2 de <i>Balantidium coli</i> | 45 |
| Figura 10. Ilustração das granjas familiares de suínos. A - Baía coletiva de suínos na granja de Rio Bonito. B - Suíno ao ar livre amarrado com corda pelo pescoço ao tronco de árvore em Araruama. C - Baía coletiva de suínos na granja de Saquarema. D - Suíno sendo contido pela equipe de trabalho de campo para coleta de amostra fecal em piquete da granja de Maricá. | 51 |
| Figura 11. Ilustração das granjas familiares de suínos. A - Baía coletiva de suínos na granja familiar de Itaboraí. B - Baía coletiva de suínos com lâmina d'água na granja familiar de Casimiro de Abreu. C - Baía coletiva com suíno na granja familiar de Silva Jardim..... | 52 |
| Figura 12. Ilustração das granjas industriais de suínos. A – Celas com fêmeas gestantes na granja tecnificada de Petrópolis. B – Setor de terminação na granja tecnificada de Itaperuna | 52 |
| Figura 13. A. <i>Macaca fascicularis</i> (Cynomolgus). B. <i>Macaca mulatta</i> (Rhesus)..... | 55 |
| Figura 14. A. <i>Cebuella pygmaea</i> . B. <i>Callithrix aurita</i> . C. <i>Callithrix jacchus</i> . D. <i>Callithrix penicillata</i> . E. <i>Callithrix geoffroyi</i> | 56 |
| Figura 15. A. <i>Saimiri sciureus</i> . B. <i>Saimiri ustus</i> | 56 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. A. <i>Calibella humilis</i> . B. <i>Mico chrysoleucus</i> . C. <i>Mico humeralifer</i> . D. <i>Mico melanurus</i> . E. <i>Mico saterei</i> | 57 |
| Figura 17. A. <i>Saguinus bicolor</i> . B. <i>Saguinus midas</i> . C. <i>Saguinus niger</i> | 57 |
| Figura 18. A. <i>Callimico goeldii</i> . B. <i>Aotus nigriceps</i> . C. <i>Callicebus moloch</i> | 58 |
| Figura 19. A. <i>Leontopithecus rosalia</i> . B. <i>Leontopithecus chrysomelas</i> Fonte: CPRJ/INEA. C. <i>Leontopithecus chrysopygus</i> | 58 |
| Figura 20. A. <i>Cebus/Sapajus xanthosternos</i> . B. <i>Cebus/Sapajus robustus</i> | 59 |
| Figura 21. A. <i>Pithecia monachus</i> . B. <i>Chiropotes satanas</i> . C. <i>Cacajao melanocephalus</i> | 59 |
| Figura 22. A. <i>Alouata guariba clamitans</i> . B. <i>Ateles paniscus</i> . C. <i>Brachyteles arachnoides</i> | 60 |
| Figura 23. Coleta de amostras fecais nos recintos dos primatas não humanos do CPRJ. | 61 |
| Figura 24. Kit coleta e informe contendo as informações de coleta. | 62 |
| Figura 25. Etapa de homogeneização e filtração das amostras fecais. A – Amostras fecais de suínos preparadas para etapa de homogeneização. B – Amostra fecal de suíno sendo filtrada. C – Amostras fecais em triplicata dos primatas não humanos do CPRJ preparadas para homogeneização. Local: Laboratório da Disciplina de Parasitologia – Niterói/RJ. | 63 |
| Figura 26. Fluxograma com as etapas de análise coproparasitológica das amostras fecais. | 67 |
| Figura 27. Fluxograma com as etapas de isolamento em meio de cultura Pavlova modificado. | 71 |
| Figura 28. Tubos de ensaio com tampa rosqueável com os meios xênicos, em duplicata, da esquerda para direita: meio Pavlova (1938) modificado por Jones (1946), LES (Boeck e Drbolav, 1925) e TYSGM-9 (Diamond, 1982). .. | 72 |
| Figura 29. Esquema de leitura em grega da lâmina de microscopia. | 78 |
| Figura 30. Fluxograma de metodologia aplicada para avaliação do comportamento de isolados de <i>Balantidium coli</i> de primatas não humano e suínos mantidos em três diferentes meios sob várias tempos de incubação.. | 80 |
| Figura 31. A. Amostras de fezes em nitrogênio líquido B. Etapa de extração de DNA das amostras de fezes. | 84 |
| Figura 32. A. Master mixer Pure Taq ready to go PCR beads. B. Termociclador com tubos da reação de PCR. | 85 |

| | |
|--|-----|
| Figura 33. A. <i>Kit</i> para purificação das amostras de DNA. B. Eletroforese dos produtos de DNA purificados..... | 87 |
| Figura 34. Fluxograma de metodologia resumida aplicada para análise ultraestrutural do parasito..... | 92 |
| Figura 35. (Capítulo 1 Fig 1) Localização das granjas de suínos localizadas em diferentes cidades do estado do Rio de Janeiro, Brasil..... | 98 |
| Figura 36. (Capítulo 5 Fig 1) Fluxograma de isolamento de <i>Balantidium coli</i> em meio Pavlova modificado..... | 160 |
| Figura 37. (Capítulo 5 Fig 2) Ilustração das formas evolutivas de <i>Balantidium coli</i> observadas nas amostras fecais e em cultivo xênico. A- Trofozoíto de <i>B. coli</i> (100 X) detectado no exame direto em amostra fecal de <i>Cynomolgus</i> . B – Cisto de <i>B. coli</i> (100 X) detectado em amostra fecal de suíno. C – Trofozoíto de <i>B. coli</i> (50X) observado em cepa isolada de <i>Cynomolgus</i> mantida cultivo xênico. D – Trofozoíto de <i>B. coli</i> (100 X) em processo de divisão transversal observado em cepa isolada de suíno mantida em cultivo xênico. | 161 |
| Figura 38. (Capítulo 6 Fig 1). Padrão quantitativo de crescimento de trofozoítos de <i>Balantidium coli</i> isolados de <i>Cynomolgus</i> mantidos sob diferentes tempos de incubação nos meios de cultura Pavlova modificado, TYSGM-9 e LES..... | 172 |
| Figura 39. (Capítulo 6 Fig 2). Padrão quantitativo de crescimento de trofozoítos de <i>Balantidium coli</i> isolados de suínos mantidos sob diferentes tempos de incubação nos meios de cultura Pavlova modificado, TYSGM9 e LES..... | 174 |
| Figura 40. (Capítulo 6 Fig 3). Padrão quantitativo de crescimento de trofozoítos de <i>Balantidium coli</i> isolados de <i>Cynomolgus</i> e suínos mantidos sob diferente tempos de incubação nos meios de cultura Pavlova modificado, TYSGM9 e LES..... | 176 |
| Figura 41. (Capítulo 7 Fig 1). Relações genéticas entre isolados de <i>Balantidium coli</i> inferidas pelo algoritmo Maximum Likelihood (ML) utilizando o modelo Tamura 3-parametro com base nas sequências do gene RNAr, fragmento ITS1 - 5.8s RNAr - ITS2. A árvore foi enraizada pelos ciliados <i>Isotricha prostoma</i> [Genbak: AF045031.1] e <i>Troglodytella abrassarti</i> [EU 680314.1]. Os números associados aos ramos referem-se aos valores de <i>bootstraps</i> para 1000 replicações. <i>Bootstraps</i> acima de 50% estão mostrados. O primeiro valor foi realizado pelo algoritmo ML e o segundo pelo Neighbor-Joining (NJ). | 190 |

- Figura 42.** (Capítulo 7 Fig 2). Alinhamento das sequências do gene RNAr, fragmento ITS1 - 5.8s RNAr - ITS2 de *Balantidium coli* obtidas de cultivo xênicos e amostras de fezes de suínos e primatas não humanos comparados com sequências depositadas no GenBank..... 191
- Figura 43.** (Capítulo 7 Fig 3). Estrutura secundária e suas ambiguidades da região ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 da sequência consenso de *Balantidium coli* deste estudo transcrita com RNAalifold Webserver e formatadas no RNAviz 2.0..... 198
- Figura 44.** (Capítulo 8 Fig 1). A microscopia óptica de contraste de interferência diferencial (DIC) e de fluorescência de isolados de *B. coli* de *Cynomolgus*. A. Microscopia de DIC observa-se cílios revestindo todo o corpo do parasito e também o aparato oral (seta). B. Microscopia de DIC e fluorescência sobrepostas, mostrando o corpo do ciliado e o macronúcleo em azul. C. Microscopia de fluorescência, em verde evidenciando-se os microtúbulos ao longo do corpo do ciliado e nos cílios (seta), em azul o macronúcleo.217
- Figura 45.** (Capítulo 8 Fig 2). Microscopia óptica de contraste de interferência diferencial (DIC) e fluorescência de isolados de *B. coli* de suíno. A. Microscopia de DIC mostrando os cílios revestindo o corpo do parasito e o aparato oral (seta). B. Microscopia de DIC e fluorescência sobrepostas, mostrando o corpo do ciliado e o macronúcleo em azul (seta). C. Microscopia de fluorescência: em verde evidenciando-se os microtúbulos ao longo do corpo do ciliado, sendo pouco observado na região posterior (seta) e em azul o macronúcleo.218
- Figura 46.** (Capítulo 8 Fig 3). Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos de *B. coli*. A - B. Visão geral do isolado de *B. coli* de *Cynomolgus* e suínos, respectivamente mostrando o aparato oral (*ao*) e região caudal (*rc*), cristas intercinetais (*cic*) e cílios (*ci*). C. Em *B. coli* de suíno observa-se aparato oral (*ao*) e cristas intercinetais. D - E. Visão ampliada do cílio somático (*ci*) e cristas intercinetais (*cic*) em *B. coli* de *Cynomolgus*. F. Detalhamento das cristas intercinetais (*cic*) e inserção dos cílios (*ci*) somáticos, em *B. coli* de suíno.....219
- Figura 47.** (Capítulo 8 Fig 4). Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos de *B. coli*. A. Visão ampliada do aparato oral (*ao*) de *B. coli* de suíno. B - C. Cílios orais (*cio*) em isolado de *B. coli* de *Cynomolgus*. D. Visão ampliada do citopígeo (*ct*) de *B. coli* de suíno.220

- Figura 48.** (Capítulo 8 Fig 5). Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli* do símio *Cynomolgus* e de suíno. A - B. Vista das estruturas internas da superfície somática do parasito do símio. Cortes ultrafinos onde são observadas cristas intercinetais (*cic*) e sulcos (*su*). Os corpos basais (*cb*) emergem desses sulcos. Membrana que envolve o plasma (*mp*) e a membrana alveolar externa (*mae*). Mucocistos (*mu*) são observados abaixo da membrana alveolar. C. Detalhes das estruturas ciliares de isolado de *Cynomolgus*, onde são observados corpo basal (*cb*), septo (*S*), axosoma (*ax*) e axonema (*a*). Membrana plasmática (*mp*) que envolve a crista também envolve o cílios. D. Micrografia geral da superfície mostrando cristas intercinetais e organelas similares a hidrogenossomos (*h*) de *B. coli* isolado de suíno.....221
- Figura 49.** (Capítulo 8 Fig 6). Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli*. A. Visão geral das estruturas internas da superfície somática do parasito. Cortes ultrafinos onde são observados cílios (*ci*) e redes de nematodesma (*N*). B. Vista ampliada dos cortes transversais onde observa-se membrana plasmática (*pm*), microtúbulos periféricos (*mtp*) e microtúbulos centrais (*mtc*). C. Redes de Nematodesma (*N*) no córtex celular.....222
- Figura 50.** (Capítulo 8 Fig 7). Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli*. A. Superfície cortical onde pode ser observado microtúbulos Nematodesma (*N*) em padrão longitudinal. B. Visão geral das estruturas internas da superfície vestibular do parasito. Cortes transversais ultrafinos onde são observados microtúbulos organizados em fileiras (*MTF*) C. Vista ampliada dos microtúbulos (*MTF*).223
- Figura 51.** (Capítulo 8 Fig 8). Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli*. A. Hidrogenossomos (*h*), vacúolo alimentar (*va*) e grânulo de amido (*ga*) podem ser observado em corte ultrafino do parasito isolado de suíno. B. Visão ampliada dos hidrogenossomos (*h*), peroxissomos (*p*) e grânulos de amido (*ga*) do trofozoíta isolado de *Cynomolgus*.....224
- Figura 52.** (Capítulo 8 Fig 9). Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli*. A. Visão geral das estruturas internas evidencia-se macronúcleo (*ma*), vacúolo alimentar (*va*), grânulos de amido (*ga*) e crista intercinetal (*cic*) de trofozoíta isolado de símio. B – C. Vista ampliada de vacúolo alimentar de *B. coli* isolado de suíno. C. Vacúolo alimentar (*va*), grânulo de amido (*ga*) e peroxissomos (*p*).225

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** (Capítulo 1 Tab 1). Parasitos gastrintestinais detectados em suínos criados nas propriedades com sistema de criação familiar e industrial localizadas em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. 101
- Tabela 2.** (Capítulo 1 Tab 2). Parasitos gastrintestinais detectados em categorias de suínos de granjas com sistema industrial localizadas em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. 102
- Tabela 3.** (Capítulo 1 Tab 3). Frequência de trofozoíto de *B. coli* detectada em amostras fecais com consistência sólida, semi-sólida e diarreica em granjas de suínos de diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro. 103
- Tabela 4.** (Capítulo 2 Tab 1). Espécies de primatas não humanos, quantidade de recintos e total de amostras fecais coletadas de animais cativos de dois centros de criação no Rio de Janeiro, Brasil 116
- Tabela 5.** (Capítulo 2 Tab 2). Formas evolutivas de parasitos gastrintestinais detectadas nas amostras fecais de primatas não humanos cativos de dois centros de criação localizadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil. 118
- Tabela 6.** (Capítulo 2 Tab 3). Frequência de amostras positivas para formas evolutivas de parasitos gastrintestinais detectados em quatro diferentes espécies de primatas não humanos do Cecal, RJ. 119
- Tabela 7.** (Capítulo 2 Tab 4). Frequência de amostras positivas para formas evolutivas de parasitos gastrintestinais detectados em diferentes gêneros de primatas não humanos da família Callitrichidae cativos do CPRJ, Rio de Janeiro, Brasil. 120
- Tabela 8.** (Capítulo 2 Tab 5). Frequência de amostras positivas para formas evolutivas de parasitos gastrintestinais detectados nos primatas não humanos dos gêneros *Aotus*, *Callicebus*, *Saimiri*, *Cebus*, *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao*, *Alouatta*, *Ateles*, *Brachyteles* cativos do CPRJ 121
- Tabela 9.** (Capítulo 2 Tab 6). Frequência de cisto e trofozoíto de *Balantidium coli* em amostras fecais de *S. sciureus*, *M. fascicularis*, *M. mulatta*, *L. chrysomelas* e *Cebus* sp. cativos do Cecal e do CPRJ. 122
- Tabela 10.** (Capítulo 3 Tab 1). Frequência de *Balantidium coli* em amostras fecais de suínos, primatas não humanos e seus manipuladores. 135

| | |
|--|-----|
| Tabela 11. (Capítulo 4 Tab 1). Frequência de formas evolutivas de <i>Balantidium coli</i> detectados nas amostras fecais de suínos e primatas não humanos. | 146 |
| Tabela 12. (Capítulo 4 Tab 2). Detecção dos cistos de <i>Balantidium coli</i> em amostras fecais de suínos e primatas não humanos detectadas pelas técnicas de exame direto, Lutz, Ritchie modificada, Faust et al. e Sheather modificada. | 147 |
| Tabela 13. (Capítulo 4 Tab 3). Concordância dos resultados obtidos pelas técnicas parasitológicas na detecção de cisto de <i>Balantidium coli</i> em amostras fecais de suínos e primatas não humanos. | 148 |
| Tabela 14. (Capítulo 5 Tab 1). Frequência de amostras fecais positivas para <i>Balantidium coli</i> em animais cativos do estado do Rio de Janeiro | 162 |
| Tabela 15. (Capítulo 5 Tab 2). Frequência de isolamento e manutenção em meio Pavlova modificado de amostras fecais de suínos, Cynomolgus e Rhesus cativos em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro. | 163 |
| Tabela 16. (Capítulo 6 Tab 1). Número total de trofozoítos de <i>Balantidium coli</i> isolados de primatas não humanos mantidos sob diferentes tempos de incubação nos meios de cultura xênicos Pavlova modificado, TYSGM-9 e LES. | 173 |
| Tabela 17. (Capítulo 6 Tab 2). Número total de trofozoítos de <i>Balantidium coli</i> isolados de suínos mantidos sob diferentes tempos de incubação nos meios de cultura xênicos Pavlova modificado, TYSGM-9 e LES. | 175 |
| Tabela 18. (Capítulo 7 Tab 1). Identificação dos Isolados em cultivo de <i>Balantidium coli</i> estudados por ferramentas moleculares. | 188 |
| Tabela 19. (Capítulo 7 Tab 2). Identificação de amostras de fezes positivas para <i>Balantidium coli</i> estudadas por ferramentas moleculares. | 189 |
| Tabela 20. (Capítulo 7 Tab 3). Matriz de distância obtida a partir do alinhamento de sequências do fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 de <i>Balantidium coli</i> de isolados em cultivo e fezes de Cynomolgus. | 195 |
| Tabela 21. (Capítulo 7 Tab 4). Matriz de distância obtida a partir do alinhamento de sequências do fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 de <i>Balantidium coli</i> de isolados em cultivo e fezes de suínos. | 196 |
| Tabela 22. (Capítulo 7 Tab 5). Matriz de distância obtida a partir do alinhamento de sequências do fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 de <i>Balantidium coli</i> de fezes de Rhesus. | 197 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Taxonomia

Balantidium sp. segundo Zaman (1978) é um protozoário pertencente ao Subfilo Ciliophora, Classe Ciliata, Subclasse Holotrichia, Ordem Trichostomatida. Em classificação taxonômica posterior, o protozoário foi incluído no Filo Ciliophora, Classe Litostomatea, Ordem Vestibuliferida, Família Balantidiidae (Lynn, 2010).

A taxonomia desses protozoários se baseava principalmente em critérios morfológicos, sendo, associado também características ultraestruturais e análises moleculares. Utilizando estes parâmetros, a Sociedade de Protozoologia propôs uma reclassificação dos protozoários. Baseado nessa classificação taxonômica o gênero *Balantidium* foi inserido no Super-Grupo: Chromalveolata (plastideos de endosimbiose secundária), Primeiro Grupo: Alveolata (cavidade cortical), Segundo Grupo: Ciliophora (presença de macronúcleo e micronúcleo), Terceiro Grupo: Intramacronucleata (macronúcleo poligenômico, dividido por microtúbulos intramacronucleares), Quarto Grupo: Litostomatea (cavidade oral anteroventral), Quinto Grupo: Trichostomatia (cavidade oral ciliada) (Adl et al., 2005).

1.2 Histórico

A nomenclatura do gênero *Balantidium* foi proposta por Claparède e Lachmann em 1858, observando o ciliado pela primeira vez no reto de rãs. Malmsten foi o primeiro a detectar o ciliado em dois seres humanos com disenteria em 1857, identificando-o como *Paramecium* e, portanto, nomeou-o *Paramecium coli*. Após esse período, Leuckart descreveu uma espécie morfológicamente semelhante no intestino de suínos em 1861. Posteriormente, Stein comparou os dois microrganismos diagnosticados anteriormente e percebeu que se tratavam do mesmo protozoário, nomeando-o como *Balantidium coli*, em razão de *balanto*, em latim significar saco (Zaman, 1978; Schuster e Ramirez - Ávila, 2008).

1.3 Características morfológicas e fisiológicas

Balantidium coli possui dois estágios evolutivos: trofozoíto e cisto. O primeiro tem formato alongado ou ovóide e sua morfologia varia de acordo com a quantidade de alimento ingerido. Se forem privados do amido de arroz *in vitro*, os trofozoítos mostram-se mais alongados, porém se esse nutriente for fornecido em abundância, eles distendem-se e assumem uma forma bem mais ovóide. Seu comprimento varia amplamente entre 30 μm a 300 μm , e a largura, de 30 μm a 100 μm (Zaman, 1978) (Figura 1).



Figura 1. Trofozoíto de *Balantidium coli* isolado de primata não humano em fotomicrografia sem coloração. Aumento de 100X. Fonte: original do autor.

Na extremidade anterior, o trofozoíto possui uma depressão afunilada denominada perístoma, que leva ao citóstoma e posteriormente à citofaringe (Areán e Koppisch 1956; Zaman, 1978). Geralmente, o final desta porção tende a ser ligeiramente pontiagudo. O citóstoma localiza-se ventralmente na porção anterior do parasito. A citofaringe não é identificável quando o parasito está preenchido por grande número de partículas alimentares. Esta estrutura geralmente é pequena, mas algumas vezes chega a se estender para quase a metade do tamanho total do parasito (Dobell e O'Connor, 1921).

O citoplasma é envolto por uma fina película, que garante a manutenção do formato do protozoário (Zaman, 1978). Essa película é coberta por numerosos cílios que se estendem sobre a fenda bucal (Areán e Koppisch, 1956). Os cílios, que são tipicamente as estruturas de locomoção, estão inseridos entre linhas longitudinais,

também chamadas de cinetos (corpo basal). O número de linhas ciliares varia muito dentro da mesma espécie (Zaman, 1978). Segundo Krascheninnikow (1962) os parasitos obtidos de suínos possuem entre 36 a 106 linhas ciliares e os mantidos em cultura entre 36 a 90.

Geralmente, os cílios do perístoma são mais longos que aqueles que cobrem o restante de sua porção somática, e são utilizados para impulsionar as partículas alimentares para dentro do citóstoma (Zaman, 1978). Esta ciliação densa também foi observada em microscopia de varredura por Nilles - Bije e Rivera (2010) em trofozoítos isolados de suíno.

Devido a seus cílios somáticos, o protozoário pode realizar movimentos rotatórios rápidos, porém quando a temperatura ambiental é reduzida, os movimentos tendem a diminuir progressivamente. Em preparações coradas, pode-se observar no trofozoíto uma cutícula externa bem delicada com ranhuras longitudinais (Figura 2). Estas ranhuras apresentam pequenas e numerosas aberturas, chamadas de sulcos, que estão dispostos de forma alternada com as cristas longitudinais. Dos sulcos nascem à base dos cílios (corpos basais) (Dobell e O'Connor, 1921). Os cílios nos cortes transversais apresentam o padrão universal de ciliados, 9 +2 fibrilas tubulares (Zaman, 1978).

O citoplasma apresenta um grande número de grânulos de polissacarídeos, que podem ser estocados ou agrupados em conjunto nos vacúolos alimentares. Os nutrientes, quando entram no citoplasma, são envolvidas por uma membrana, formando os vacúolos alimentares, próximo à base da citofaringe (Auerbach, 1953). Nesses, ocorre à digestão de uma grande variedade de partículas de alimento, como grãos de amido, bactérias, glóbulos vermelhos e gotículas de gordura. Ocasionalmente, o trofozoíto pode ingerir outro *Balantidium* sp., ovos de *Trichuris* sp. e larvas de outras espécies de parasitos (Zaman, 1978). As partículas não digeridas e os remanescentes do processo de digestão são eliminados pela pequena abertura triangular na extremidade posterior do parasito, conhecida como citopígio, poro anal ou citoprócto (Zaman, 1978). Segundo Schuster e Ramirez - Ávila (2008) o aparato de Golgi não foi ainda identificado em *B. coli*, porém, são descritos retículo endoplasmático e ribossomos livres no citoplasma.

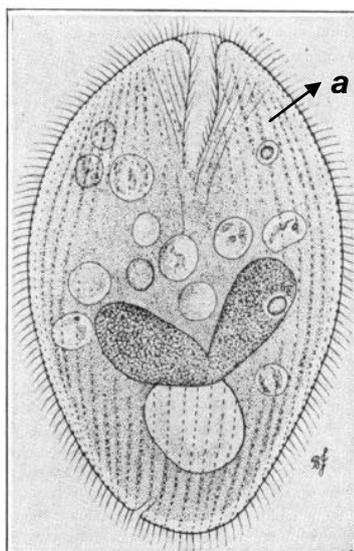


Figura 2. Esquema de trofozoíto de *Balantidium coli*. **a.** ranhuras longitudinais na cutícula. Fonte: Little, 1931.

O citoplasma granular contém dois vacúolos contráteis, um posicionado no final da porção posterior e o outro mais anteriormente. Estes vacúolos são responsáveis por manter estável a pressão osmótica do ciliado, absorvendo o excesso de líquido no citoplasma e ejetando-o para o ambiente externo à célula (Kheisin, 1952). Zaman (1970) por meio de uma sequência de fotomicrografias demonstrou o funcionamento independente dos vacúolos contráteis.

Vacúolos contráteis são menos ativos em *B. coli* do que nos ciliados em vida livre, pois *B. coli* vive em um ambiente rico em sais, ao contrário dos ciliados em vida livre. Nestes a remoção constante de água do citoplasma é necessária para sobrevivência do ciliado (Kheisin, 1952). Zaman (1970) observou que esses vacúolos aumentam gradualmente a partir de uma posição colapsada para atingir uma forma esférica totalmente distendida. Após, tal estágio, eles se colapsam para expulsar seu conteúdo. Todo esse ciclo ocorre entre 20 a 25 segundos. A atividade dos vacúolos foi visualizada em microscopia de contraste de fase ou por coloração temporária vital com corante vermelho neutro. O corante é recolhido pelos vacúolos que então tornam-se claramente visíveis.

Esse protozoário possui dois núcleos, que comparativamente são conhecidos como macronúcleo e micronúcleo. O macronúcleo que se apresenta em formato de salsicha, feijão ou rim (Figura 3) (Dobell e O'Connor, 1921; Elliot e Hotson, 1953; Schuster e Ramirez - Ávila, 2008), possui cromatina densa com corpos esféricos

eletrodensos, distribuído aleatoriamente, podendo estar localizado em várias partes do citoplasma. O micronúcleo, esférico, geralmente se localiza na concavidade do macronúcleo (Woody e Woody, 1960). Zaman (1978) sugere a existência de formas amiconucleadas. O micronúcleo é delimitado por uma membrana, apresentando formato triangular ou de diamante e pode conter corpos eletrodensos alongados (Zaman, 1978).

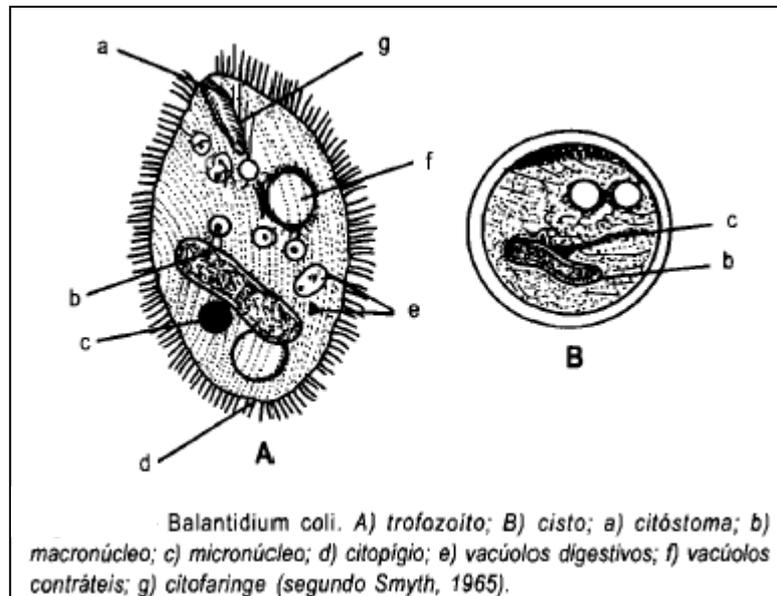


Figura 3. Esquema de trofozoito e cisto de *Balantidium* sp. com identificação de organelas. Fonte: <httpdc394.4shared.comdocWsEAFtiNpreview.html>. Acessado em: 19 de maio de 2014.

Trofozoítos multiplicam-se por fissão binária transversal (Figura 4). Um dos primeiros sinais indicativos da aproximação da fase de divisão é o alongamento do organismo, seguido pela formação de um plano transversal no centro do seu corpo, que gradativamente começa a se contrair. A célula continua a se mover ativamente durante esse período (Zaman, 1978). No processo de fissão, Krascheninnikow e Wenrich (1958) estudando a morfologia de exemplares de *B. coli* e *Balantidium cavie*, corados pelo método azul de opalina de Breslau e impregnação pelo nitrato de prata de Klein, observaram que a fissão pode ser de forma oblíqua, o que determina a geração de células filhas morfologicamente distintas. Geralmente, a célula posterior tende a ser um pouco menor que a anterior. A divisão desigual é um processo que acontece em alta frequência.



Figura 4. Trofozoíto de *Balantidium coli* de primata não humano em processo de divisão binária transversal. Fotomicrografia sem coloração. Aumento de 100X. Fonte: original do autor.

A reprodução sexuada ocorre por conjugação, onde dois indivíduos entram em contato e trocam material genético. Durante esse processo os indivíduos permanecem conectados um ao outro pelo citóstoma. A conexão mantém-se por alguns minutos e depois os trofozoítos separam-se (Zaman, 1978). Svensson (1955) observou que a conjugação ocorre com maior frequência durante as primeiras semanas após o isolamento *in vitro* ou quando duas cepas diferentes são misturadas. Quando alcançam a estabilidade, a conjugação torna-se menos frequente ou desaparece completamente. Sargeaunt (1972) descreveu outro método de divisão de *Balantidium* sp., em que ocorre brotamento. Neste processo, as células filhas aparecem como pequenas protusões que se destacam eventualmente da célula mãe.

Apesar dos diversos relatos sobre a reprodução sexuada por conjugação em *Balantidium* sp., ainda faltam informações sobre os eventos nucleares. Sabe-se, até o momento, que ocorrem duas meioses sucessivas antes da conjugação. Os dois conjugantes anexam-se pelo aparato bucal e assim trocam produtos resultantes da meiose do micronúcleo (Schuster e Ramirez - Ávila, 2008).

O parasito é considerado um anaeróbio facultativo, podendo ser, conseqüentemente, cultivado tanto em ambiente aeróbio quanto anaeróbio (Areán e Koppisch, 1956). Apesar do protozoário viver em ambiente anaeróbio, foram descritos corpos similares a mitocôndrias, em estudos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Zaman, 1978). Nilles-Bije e Rivera (2010) demonstraram por MET, a presença de

uma estrutura muito similar a mitocôndria. Segundo Auerbach (1953) em *B. coli* as mitocôndrias tendem a aparecer como estruturas de baixa densidade e apresentam pequeno desenvolvimento das cristas tendendo a se situar na periferia do parasito.

A dieta desse ciliado *in vivo* é composta, principalmente, por bactérias e partículas de alimentos presentes no cólon. Caso existam lesões significativas na parede do intestino grosso, o ciliado pode também alimentar-se de hemácias (Kheisin, 1952). *Balantidium* sp. são muito suscetíveis a ação de ácidos, sendo rapidamente destruídos pelo suco gástrico de uma pessoa normal. O pH abaixo de cinco, geralmente, é incompatível com sua vida (Areán e Koppisch, 1956). Diferentemente dos ciliados em vida livre, os trofozoítos de *B. coli* morrem e se desintegram em torno de três dias em temperatura ambiente (Elliot e Hotson, 1953).

Estudos metabólicos e fisiológicos para este protozoário foram pouco realizados. Em 1984, Skotarczak estudando o padrão enzimático de isolados de *B. coli* de suínos mantidos em meio Pavlova, conseguiu, por meio de estudos citoquímicos, demonstrar a presença da L-glutamato desidrogenase, uma enzima mitocondrial com propriedades alostéricas, estando sua atividade relacionada a concentração de amônia nas mitocôndrias.

Após estudos citofotométricos do conteúdo de ácido nucleico de trofozoítos de *B. coli*, Skotarczak e Zielinski (1997) observaram que trofozoítos isolados de hospedeiros com diarreia muco sanguinolenta, tendem a apresentar maior quantidade de DNA e RNA do que trofozoítos isolados de hospedeiros assintomáticos.

O cisto de *B. coli* tem formato esférico ou ovóide, diâmetro variando entre 40 µm e 65 µm, parede geralmente espessa e hialina, podendo apresentar coloração esverdeada ou amarelada (Figura 5). Algumas vezes, o parasito pode estar em forma cística e ainda assim mostrar sinais de movimentação (Areán e Koppisch, 1956). Nos cistos pode-se observar o macronúcleo dentro de uma massa de material citoplasmático (Woody e Woody, 1960). Esses podem permanecer viáveis à temperatura ambiente por duas semanas (Areán e Koppisch, 1956). A forma cística caracteriza-se pela forma de transmissão e resistência do parasito no ambiente. Sua viabilidade permanece por maior tempo em ambientes úmidos e protegidos da luminosidade direta do sol. Sabe-se que em suínos, os trofozoítos iniciam o processo de encistamento ao longo do cólon descendente ao reto, sendo geralmente encontrados totalmente encistados em fezes formadas (Rees, 1927). Segundo Jamenson (1927), os cistos não são formados em meios de cultura e nem em casos agudos de disenteria. Tentativas de encistamento *in vitro* simulando

ambiente do cólon e reto não foram bem sucedidas, nem com excesso de alimentos e nem com a falta deles.

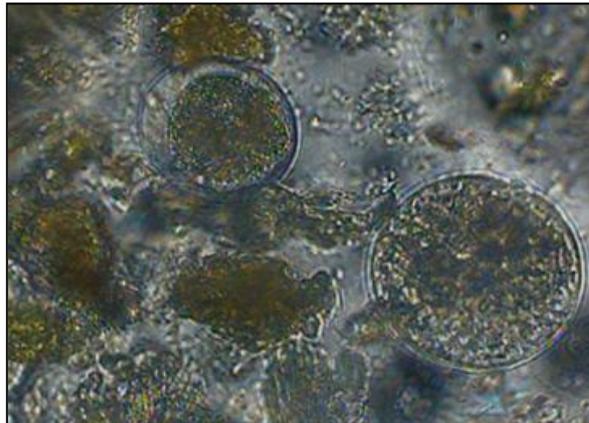


Figura 5. Cisto de *Balantidium coli* de suínos (*Sus scrofa*). Fotomicrografia sem coloração. Aumento de 100X. Fonte: original do autor.

1.4 Ciclo biológico e Mecanismos de Transmissão

A infecção é, frequentemente, adquirida de forma indireta pela ingestão de cistos em água e alimentos, ou pelo contato direto com as mãos contaminadas com os cistos. Moscas são atribuídas como vetores mecânicos (Woody e Woody, 1960). Os cistos aparentemente passam pelo estômago íntegros e o seu desincistamento ocorre no intestino grosso, principalmente no ceco, onde o trofozoíto se desenvolve (Little, 1931). Nesse processo ocorre liberação dos trofozoítos que se multiplicam, tendendo a se estabelecer em colônias. Dentro do tecido, *B. coli* migra, produzindo úlceras, formando abscessos, que podem se estender pela camada muscular de segmentos do intestino grosso (Figura 6) (Ladas et al., 1989).

Segundo Rezende (2002) a doença causada por *B. coli* tem sido relatada como balantidiose ou balantidíase, ambas as denominações são sinônimos. Neste estudo optou-se por utilizar o termo balantidiose, pois segundo Kassai (2006) o sufixo “ose” tem sido o mais utilizado em artigos e livros didáticos, e portanto, deve ser estimulado o seu uso para facilitar as buscas em bancos de dados.

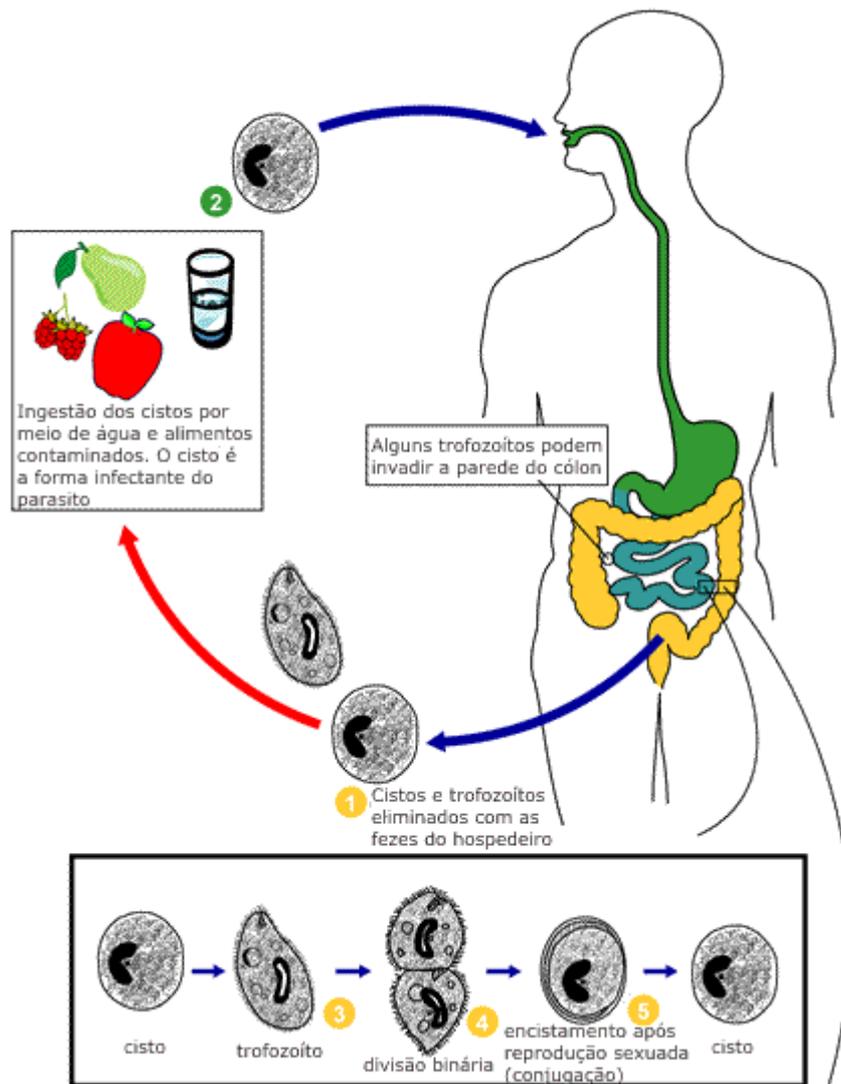


Figura 6. Esquema do Ciclo biológico de *Balantidium coli*. Fonte: CDC.

Uma das principais dúvidas quanto a balantidiose é sobre a sua transmissão. Ainda hoje não se tem comprovação da transmissão de cistos de origem suína ou de outros animais para o homem. A transmissão dos cistos de suíno para o homem, amplamente divulgada nos livros de parasitologia ainda permanece como uma teoria. O primeiro experimento que avaliou a infecção do parasito no homem foi realizado em 1896. Andrews (1930)¹ apud Geddes (1952) citou que Cassagrandi e Barnagallo transferiram formas evolutivas de *B. coli* de origem suína para voluntários humanos, mas a infecção

¹ Andrews, J. Trans. 8th Cong Far East Ass Trop Med. 1930,2:194.

humana não ocorreu. Knowles e Das Gupta (1934) administraram trofozoítos e cistos de *B. coli* de origem símia à dois humanos , porém também não conseguiram comprovar tal infecção. Young (1950) forneceu cistos e trofozoítos do parasito em cápsulas de gelatina para dois voluntários, que foram acompanhados em um período de 10 anos. Essas pessoas não desenvolveram diarreia e nem apresentaram formas evolutivas do parasito nas fezes. Por outro lado, Walker (1913) foi capaz de reproduzir a doença experimentalmente em primatas não humanos pela alimentação e por inoculação retal com trofozoítos de *B. coli* de origem suína. Krascheninnikow e Wenrich (1958) não obtiveram sucesso ao tentar infectar hamsters com isolados de *B. coli* e *Balantidium caviae* através da inoculação retal ou por laparotomia.

Schumaker (1930) observou que ratos mantidos em dieta rica em caseína apresentaram dificuldades de desenvolvimento da infecção experimental, porém quando a dieta foi composta por 93,5% de carboidratos, a multiplicação do parasito e a taxa de infecção dos ratos foram altamente favorecidas. Awakian (1937) demonstrou que tanto cepas de *Balantidium* sp. isolados de humanos, suínos e ratazanas mantidas *in vitro*, bem como amostras fecais com cistos, foram capazes de infectar experimentalmente animais de laboratório, ratos e porquinhos da Índia. Os roedores infectados apresentaram características crônicas da doença, além disso, os animais permaneceram liberando as formas parasitárias por mais de quatro meses. A balantidiose experimental, também como na infecção natural, segue um curso crônico, havendo eliminação de formas evolutivas do parasito nas fezes.

Yang et al. (1995) infectaram experimentalmente 10 suínos de dois meses de idade e quatro macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) com fezes humanas contendo cistos de *B. coli*. Tanto os suínos quanto os macacos apresentaram sinais e sintomas compatíveis com balantidiose apresentando diarreia, febre, desidratação e perda de peso. Os exames histopatológicos das porções do intestino grosso revelaram mucosa intestinal coberta com muco, tecido necrótico, edema, hemorragia e infiltrado inflamatório eosinofílico. Foram detectadas formas evolutivas de *B. coli*, tanto nas fezes, como nos tecidos estudados desses animais.

1.5 Epidemiologia

A balantidiose humana é considerada uma doença negligenciada. Infecções por *Balantidium* sp. foram relatadas em diversas partes do mundo, incluindo regiões no extremo norte do planeta, como Suécia, Finlândia, Noruega e norte da Rússia. Entretanto, as taxas de prevalência mais elevadas são encontradas nas regiões de clima tropical e subtropical. O protozoário foi diagnosticado no Canadá, Estados Unidos, México, Honduras, Costa Rica, Panamá, Jamaica, Cuba, Porto Rico, Venezuela, Colômbia, Brasil, Uruguai, Argentina e Chile (Areán e Koppisch, 1956). Porém os maiores focos endêmicos foram documentados em locais com climas tropicais e subtropicais nas Américas Central e do Sul, destacando Brasil, Venezuela; Filipinas; Papua Nova Guiné; região da antiga Pérsia; Ásia Central e do Sul e algumas ilhas do Pacífico (Zaman, 1978; Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006).

Embora a infecção por *B. coli* tenha distribuição mundial, sua incidência em humanos é considerada muito baixa. Até 1980, foram descritos na literatura em diversos trabalhos, aproximadamente, 1000 casos humanos (Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006). A estimativa da prevalência mundial é 0,02 a 0,1%. Altas taxas de prevalências, acima de 28% foram descritas em poucas áreas (Esteban et al., 1998; Schuster e Ramirez-Ávila, 2008). Walzer et al. (1973) ressaltam que a baixa prevalência do parasito na população humana pode ser explicada pelas possíveis diferenças antigênicas que tornam o homem resistente a infecção por *B. coli*, ainda que viva em contato próximo aos suínos ou em condições sanitárias deficientes.

Este parasito é mais frequente em suínos onde as taxas encontram-se entre 33 a 94,76%, sendo considerado a principal fonte de infecção (Walzer et al., 1973; Schuster e Ramirez - Ávila, 2008). A transmissão do agente etiológico pode ocorrer por contato direto, que favorece a proximidade com esses animais, tornando médicos veterinários e tratadores, os principais grupos de risco. Além disso, a ingestão de alimentos e água contaminados com os dejetos dos suínos, manuseio de seus intestinos em matadouros frigoríficos e uso de suas fezes como fertilizantes podem ser consideradas possíveis fontes de infecção para humanos (Schuster e Ramirez - Ávila, 2008). Ambientes quentes e úmidos, como os encontrados nos trópicos, podem favorecer a transmissão dessa parasitose, pois são as condições ideais para aumentar o período de viabilidade da forma cística (Walzer et al., 1973).

A alta incidência de balantidiose humana foi relatada na Papua Nova Guiné, sendo registrada positividade de 28% na população local. Porém, Covree e Rijpstra observaram quatro anos depois, que a incidência da parasitose não ocorria de forma uniforme nos vilarejos, e que os locais com maior frequência coincidiam com áreas onde havia elevada concentração de suínos. Os autores relataram também que as áreas de maior incidência geralmente consistiam nos planaltos, onde era observado clima frio e presença ventos, o que forçava os animais a procurar abrigo nas habitações humanas, ou próximo delas, estreitando a distância física entre humanos e suínos (Covree e Rijpstra², 1961 apud Owen, 2005). Em Delhi, Índia a frequência do parasito foi de 2,4% das 127 amostras fecais de crianças estudadas (Kaur et al., 2002).

Walzer et al. (1973) ressaltam que a maioria dos relatos de balantidiose humana são de casos clínicos de indivíduos sintomáticos, casos com complicações ou fatais, sendo poucos os relatos de surtos ou estudos coproparasitológicos específicos para esta parasitose. O maior inquérito coproparasitológico que pesquisou *B. coli* em amostras fecais humanas ocorreu no nordeste do Altiplano da Bolívia. Na ocasião foram coletadas amostras fecais de 2124 escolares de 5 a 19 anos de 22 comunidades rurais da etnia Aymara. A prevalência geral da parasitose variou entre 1,2% a 5,3%. Também foram coletadas 50 amostras de suínos criados na região, sendo detectadas 54% de positividade para *B. coli*. Apesar do baixo *status* nutricional da população desta região, que apresenta precárias condições sócio-econômicas, as crianças apresentavam-se assintomáticas, sendo consideradas portadoras da parasitose (Esteban et al., 1998).

Além desse estudo, em Santa Cruz e La Paz também na Bolívia, Basset et al. (1986) realizaram três inquéritos coproparasitológicos. Em Santa Cruz a prevalência foi de 1,8% entre 381 amostras estudadas, onde todas as pessoas infectadas estavam aparentemente saudáveis. Os outros dois relatos foram observados em duas diferentes províncias de La Paz. Uma em Coroico na região de Yungas, onde foi observada a taxa de prevalência de 1,3% de 385 crianças de dois a nove anos de idade, e outro na Província de Saavedra, onde a taxa foi de 8% em 100 amostras fecais analisadas de crianças de quatro a quinze anos de idade.

Na Venezuela a prevalência estimada de balantidiose humana é de 12% e o parasito tem sido evidenciado em 33% dos suínos (Cermeño et al., 2003). Guzmán et al.

² Covree LMJ, Rijpstra AC. The prevalence of *Balantidium coli* in the central highlands of Western New Guinea. Doc Med Geogr Trop. 1961; 13:284-286.

(2013) estudando *B. coli* em comunidades da Venezuela, evidenciaram o parasito em 65% de suínos de granja do tipo industrial, 67% de suínos criados em sistema doméstico, porém não diagnosticaram nenhuma forma evolutiva do parasito nos 51 tratadores desse animais.

Castillo (2013) diagnosticou o parasito em 5% de 100 amostras fecais de produtores de suínos na província de Balsas localizada na região sul do Equador. Já em San Caetano, Província de Corrientes, Argentina foi evidenciado 0,5% do parasito em 207 crianças em idade escolar (Borda et al., 1996).

Em Lima, Perú, entre 1985 a 1990 foram hospitalizados com balantidiose quatro pacientes no Hospital Dois de Maio. Todos eram homens, possuíam mais de 60 anos, agricultores com históricos de disenteria crônica. Um dos pacientes apresentou também tumoração na ampola retal. Três receberam tratamento, porém somente dois sobreviveram e se recuperaram da infecção. Além desses, foram identificados históricos de mais 23 pessoas com a doença, que foram internadas em outros hospitais da cidade (Pamo et al., 1991).

No Brasil, poucos são os levantamentos de diagnóstico parasitológicos específicos para este parasito. Em 1969, Machado et al. estudando a parasitose em 1214 pacientes atendidos no município de Niterói relataram a frequência de *B. coli* em nove (0,74%). Em todos os casos os pacientes apresentavam alterações intestinais, sendo evidenciado principalmente, diarreia ou disenteria e dor abdominal. Amostras fecais foram submetidas a quatro técnicas coproparasitológicas nas quais foram diagnosticadas formas evolutivas do protozoário. Dos nove pacientes positivos somente dois relataram contato com suínos. Em hospitais no estado do Pará, foi observado 0,9% de *B. coli* em 110 crianças que apresentavam diarreia aguda (Vasconcelos, 1981).

Defecação indiscriminada no meio ambiente pela população humana, hábito de criação de animais principalmente suínos, superpopulação e principalmente precárias condições de saneamento básico, são alguns dos fatores responsáveis pelo aparecimento da parasitose (Cancrini et al., 1989). Dentre os 325 surtos de doenças parasitárias transmitidas pela água na América do Norte e Europa, os que envolveram *B. coli* correspondem a 0,3% (Karanis et al., 2007). Água com cistos do parasito tem sido apontada como um dos principais fatores de risco para aquisição da parasitose. Lerman et al. (1970) descreveram o quadro clínico de diarreia e anorexia determinada pelo protozoário em um militar caucasiano de 19 anos que serviu em base militar no Vietnã.

Na anamnese o militar relatou o consumo de água de poço durante os nove meses de trabalho na base militar.

Na França, Bellanger et al. (2013) relataram um caso de disenteria pelo protozoário no qual um homem de 28 anos de idade, foi admitido na Unidade de Emergência, com dor abdominal, febre, vômito e mais de dez evacuações esverdeadas por dia. No exame de fezes foram evidenciados muitos trofozoítos de *B. coli*. O paciente não apresentou nenhum histórico compatível de balantidiose. Ele não tomava medicamentos, não estava imunocomprometido, não apresentava histórico de viagem e não tinha doença crônica, vivia sozinho e não tinha contato com animais, sendo somente relatado uso de hidratação oral com bolsas térmicas em caminhadas ao ar livre. O paciente foi tratado com metronidazol durante 10 dias e recuperou-se plenamente.

Infecções humanas por *B. coli* em países industrializados são muito raras (Bellanger et al., 2013; Ferry et al., 2004). No Canadá, Little (1931) relatou o primeiro caso de disenteria causada pelo protozoário no país. Era um homem inglês imigrante de 69 anos de idade, trabalhador de fazenda e estradas de ferro, que foi internado no Hospital de Ontario em Hamilton com comportamento maníaco e suicida. O paciente apresentava histórico de dois anos de diarreia. Após o diagnóstico o paciente foi tratado e a infecção foi eliminada.

1.5.1 Hospedeiros

Balantidium sp. é um parasito de ampla distribuição, já tendo sido descritas em mais de 50 espécies animais com base em sua morfologia e hospedeiros parasitados (Areán e Koopisch, 1964; Zaman, 1964; Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006). Protozoários desse gênero foram detectados em amostras fecais de humanos, suínos domésticos, javalis, ovelhas, equinos, bovinos, porquinhos da Índia, tartarugas, primatas não humanos, répteis, pássaros, peixes e artrópodes (Areán e Koopisch, 1964; Zaman 1964). *Balantidium coli* pode parasitar uma grande diversidade de animais, o suíno doméstico (*Sus scrofa domesticus*) e primatas não humanos, principalmente os do Velho Mundo são considerados os reservatórios mais importantes para a infecção humana, determinando o ciclo de transmissão zoonótico (Nakauchi, 1999).

Outras espécies do ciliado foram evidenciadas e estão bem descritas morfologicamente como: *B. caviae* parasito de porquinho da Índia (Neiva et al., 1914),

Balantidium ovatum e *Balantidium blattarum* em baratas (Ghosh, 1922a; Ghosh 1922b). *Balantidium andianusis* e *Balantidium sinensis* em salamandras gigantes, *Andrias davidianus*, na China (Li et al., 2008). *Balantidium entozoon* parasitos de anfíbios que foi caracterizado também, por meio de ferramentas moleculares e ultraestruturais (Grim e Buonamo, 2009).

Levine (1940) aponta a classificação taxonômica proposta por McDonald em 1922. Este autor afirmou que *B. coli* de origem suína, na verdade, corresponde a duas espécies distintas, *B. coli* e *Balantidium suis*. Para distingui-las tal autor utilizou as seguintes características morfológicas: trofozoítos de *B. coli* são relativamente mais largos do que *B. suis*; relação comprimento-largura de *B. coli* é 1,3 a 1,4 e para *B. suis* 1,8; o citóstoma de *B. coli* é aproximadamente apical e de *B. suis* é sub-apical; o macronúcleo de *B. suis* é mais delgado do que de *B. coli*; *B. suis* é mais fino posteriormente e mais largo na porção anterior até o meio do corpo, enquanto *B. coli* apresenta maior largura na parte posterior até a porção mediana.

Colocando em dúvida a proposta de McDonald (1922), Levine (1940) comparou a relação comprimento – largura de trofozoítos retirados diretamente do conteúdo cecal de suínos e de isolados de trofozoítos dos mesmos suínos, mantidos em cultivo. Para comparação, o material fecal a fresco e de cultivo foi fixado com o conservante Kleinemberg, que tem como base solução de 2% de ácido pícrico. Após as mensurações, o autor observou que das oito cepas estudadas, seis apresentaram tanto no material a fresco quanto em cultivo a relação comprimento - largura do tipo *coli like*, uma cepa no material fixado de fezes a relação *suis like* e no cultivo uma conformação típica de *coli like* e em outras duas cepas houve uma relação inversa. O estudo de Levine (1940) mostrou que a relação comprimento-largura proposta por McDonald (1922) não pode ser considerada como uma característica constante para classificar as espécies do protozoário. Levine (1940) e Awakian (1937) ressaltaram que os trofozoítos de *B. coli* são pleomórficos e, geralmente em cultivos tendem a se tornar mais arredondados, devido à maior quantidade de nutrientes ingeridos, principalmente o amido de arroz.

1.5.1.1 Humanos

B. coli é considerado o maior protozoário e o único ciliado parasito do homem. A prevalência da balantidiose em seres humanos não é considerada alta (Soleymani-

Mohammadi et al., 2004). Geralmente, a positividade é mais elevada em regiões endêmicas onde é frequente o contato com suínos (Oberhuber et al., 1993; Sharma e Harding, 2003). Entretanto, somente a proximidade com os suínos e suas fezes, não são suficientes para que se instale uma infecção em humanos. Outros fatores também podem ser considerados, como intrínsecos do hospedeiro, incluindo imunidade e resistência, e do parasito, destacando sua habilidade de invasão tecidual (Schuster e Ramirez-Ávila, 2008).

A presença marcante de suínos como fonte de infecção para *B. coli* foi relatada no maior surto de balantidiose humana até hoje documentado, que ocorreu nas ilhas de Truk, localizado próxima a Papua Nova Guiné, que fazem parte dos estados federados da Micronésia. O evento envolveu 110 pessoas em um curto período o tempo, devido à contaminação de fontes de água de abastecimento por fezes de suínos durante a passagem de um tufão (Walzer et al., 1973).

Vásquez e Vidal (1999) descreveram um caso clínico de balantidiose disentérica com presença de suínos no Distrito de Acoria, Perú em um criador de suínos de 60 anos de idade. O criador foi submetido à biópsia retal, sendo detectados formas vegetativas de *B. coli*. Mesmo tendo recebido tratamento com metronizadol, o paciente faleceu com falha orgânica multissistêmica. Após seu óbito, foi realizada uma investigação epidemiológica, onde foram coletadas amostras fecais dos seus suínos e das pessoas vizinhas, totalizando 18 pessoas e dois suínos. Todas as pessoas foram negativas para *B. coli* nos exames coproparasitológicos, porém as amostras fecais dos suínos apresentaram grande número de formas evolutivas do parasito. Os autores destacam que esse Distrito tem tradição na agricultura familiar, com os suínos vivendo em precárias condições higiênico-sanitárias. Geralmente, a eliminação dos excretas desses animais ocorre diretamente em meio ambiente, próximo as fontes de água de consumo humano, o que poderia favorecer a infecção.

No Brasil, Pinheiro e Lima (1991) relataram o caso de uma mulher de 63 anos habitante da zona rural de Uberaba, Minas Gerais, também criadora de suínos. A paciente apresentou enterorragia e disenteria durante oito dias, falecendo logo após internação. O exame histopatológico do intestino grosso revelou processo inflamatório e presença de trofozoítos de *B. coli* nas criptas e nas bordas das úlceras. A falta de um diagnóstico rápido pode ter favorecido a evolução do caso.

Em Santiago do Chile foi documentado o caso de uma menina de três anos que apresentou balantidiose, com diarreia, dor epigástrica e anorexia. Cistos de *B. coli* foram diagnosticados nas fezes. Através da retossigmoidoscopia foi possível observar úlceras

profundas em formato de estrela, com dois a quatro milímetros de diâmetro, contendo em seu material mucoso trofozoítos do parasito. Os pais dessa criança possuíam criação de suínos, e relataram que sua filha costumava brincar na pocilga dos animais. Amostras fecais dos pais também foram analisadas, porém, não foram observadas formas evolutivas do protozoário. Nas fezes dos animais também foram detectados *B. coli* (Palomino e Donkaster, 1971).

Coutinho et al. (2004) documentaram o caso de um lactente de 13 meses, morador de São Paulo, do sexo masculino, que apresentou diarreia persistente. Ao exame de fezes foi diagnosticado trofozoítos ciliados compatíveis com *B. coli*. O paciente apresentou recuperação da infecção após o tratamento com metronidazol. A avó relatou que o lactente frequentava seu sítio, onde havia criação de suínos.

A proximidade dos indígenas com suínos associado à higiene precária das aldeias são fatores importantes que tem favorecido o encontro da balantidiose em diversas etnias. Em um inquérito parasitológico realizado entre o grupo indígena Zoró, Mato Grosso pode-se evidenciar 2,9% (5) da população parasitada por *B. coli*. Os Zoró caçam suínos selvagens para comer, como também criam filhotes sempre que conseguem capturá-los na floresta. Os porquinhos são criados em pequenos chiqueiros adjacentes às habitações até atingirem a idade adulta, quando então são soltos no pátio da aldeia e perseguidos até serem mortos por flechadas (Coimbra Jr e Santos, 1991). Casos de balantidiose em crianças indígenas que também tinham contato próximo com suínos foram evidenciados na Serra de Perijá, Venezuela como demonstrado por Cheng - Ng et al. (2006) e também na Costa Rica por Saborío et al. (1993) e por Carlos e Hilda (2011).

Na região da antiga Pérsia, o quadro clínico de balantidiose foi revisado por Geddes (1952). Trabalhadores de uma empresa anglo-iraniana foram submetidos à avaliação médica periódica, sendo diagnosticados no ano de 1948, 87 casos de balantidiose, que foram posteriormente tratados. Nesta área a população é estritamente mulçumana, o que descarta o suíno como reservatório do protozoário, pois, a ingestão de carne suína em países que possuem esta cultura religiosa não é permitida, logo tais animais não são criados. O autor atribui a interação entre humanos como principal fonte de transmissão. Segundo Woody e Woody (1960) apesar do suíno ser considerado reservatório natural de *B. coli*, a função dele na transmissão da parasitose ainda é questionada, pois o histórico de casos clínicos relacionados a proximidade homem-suíno equivale somente a 14% dos casos estudados. Os mesmos autores relatam a presença de episódios de diarreia em uma menina venezuelana de cinco meses de idade. Ao

exame coproparasitológico foram evidenciados inúmeros trofozoítos de *B. coli*. Seus parentes relataram não criar suínos e não ter convívio com outros animais.

A ausência de porcos nas populações mulçumanas, que ainda assim desenvolveram a balantidiose, torna a transmissão humano-humano um risco real. Nesses casos ratos podem ser considerados como possíveis carreadores do parasito. Além disso, o autor questiona se o ciliado específico de roedores pode infectar o ser humano. As baratas podem funcionar como vetor mecânico carreando cistos das fezes para os alimentos (Tatfeng et al., 2005). O lodo de efluentes também pode ser considerado um fator de risco para transmissão da parasitose (Amin, 1988).

B. coli pode ser considerado um parasito oportunista, já tendo sido diagnosticado em pacientes imunocomprometidos que vivem em ambientes urbanos (Schuster e Ramirez - Ávila, 2008; Yazar et al., 2004). Disenteria por *B. coli* foi relatada em um paciente HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) positivo, criador de suínos, natural da Guiana Francesa, que também apresentava histoplasmose disseminada. O imunocomprometimento, provavelmente, pode ter favorecido a infecção pelo protozoário. O caso clínico não apresentou complicações, sendo o quadro revertido com sucesso após o tratamento com doxiciclina. Este foi o primeiro relato de balantidiose descrito na literatura médica em paciente HIV positivo (Clyti et al., 1998).

Na Venezuela, Cermeño et al. (2003) também relataram caso de diarreia crônica determinada pelo protozoário em paciente HIV positivo, que não foi tratado para a parasitose e por isso faleceu. Recentemente, foi documentado o primeiro caso de balantidiose no Brasil em um paciente com esta coinfeção, o qual nunca apresentou contato com suínos ou nenhum outro animal reservatório da parasitose. O paciente era um homem morador de área urbana, trabalhador de uma agência bancária. Ao exame clínico, relatou três episódios diarreicos por dia. *B. coli* foi detectado no exame coproparasitológico. O hábito de ingestão de alimentos crus consumidos diariamente pelo paciente foi considerado como o principal fator de risco para aquisição da infecção (Figueiredo et al., 2012).

Na Turquia o primeiro caso de disenteria causada pelo protozoário ocorreu em uma mulher de 47 anos com linfoma não Hodgkin. Na ocasião a mulher também relatou não apresentar contato com suínos. Os autores enfatizam que a pesquisa do parasito deve ser sempre considerada em pacientes imunocomprometidos, mesmo que não tenham contato com suínos ou outros animais (Yazar et al., 2004).

Pessoas com problemas mentais, que possuem hábitos de coprofagia ou vivem em instituições fechadas como em asilos, orfanatos, prisões e instituições de pacientes com problemas neurológicos, são potenciais hospedeiros de *B. coli*, caso haja indivíduos infectados nos locais. Na Itália *B. coli* juntamente com *Cryptosporidium parvum*, foram os parasitos mais evidenciados em pacientes (9,2%) de quatro instituições que abrigam pessoas com necessidades especiais (Giacometti et al., 1997).

Obstrução intestinal determinada pela reação inflamatória na infecção por *B. coli* ocorreu em um rapaz canadense de 24 anos, que apresentava problemas mentais e hábito de ingerir qualquer material do chão. Após enterotomia o paciente faleceu, sendo detectado o parasito em achados histopatológicos (Baskerville et al., 1970). Também no Canadá, Elliot e Hotson (1953) descreveram um caso de um rapaz de 27 anos esquizofrênico que vivia sob cuidados em uma Instituição especializada. O rapaz apresentou um quadro de diarreia crônica durante 11 anos, sendo em alguns momentos evidenciados nas fezes muco e sangue. Quando o paciente começou a perder peso foi realizado exame coproparasitológico, onde foi detectado trofozoítos de *B. coli*. Após o exame, o paciente foi submetido ao tratamento com carbasone e sulfaguanidina. Por viver por muitos anos em local fechado, teve-se certeza que o paciente não havia entrado em contato com animais.

1.5.1.2 Suídeos

Suídeos, domésticos e selvagens, tem sido considerado por muitos pesquisadores, como um dos principais grupos de animais reservatórios da balantidiose (Esteban et al., 1998; Solaymani-Mohammadi et al., 2005). De forma geral, as principais criações de suídeos são compostas por suínos domésticos (*Sus scrofa domesticus*). Geralmente, estes animais estão confinados em propriedades que executam a suinocultura de subsistência, também conhecida como produtor do tipo familiar ou em criações industriais, que utilizam animais de alta performance produtiva (Sarcinelli et al., 2007).

Os modelos de sistemas de criações de suínos são classificados basicamente em: extensivos, semi-intensivos e intensivos. Os extensivos consistem na criação de suínos sem qualquer instalação ou benfeitorias, sendo caracterizada pela manutenção dos animais no campo durante todo o processo produtivo (Bonett e Monticelli, 1998). Na maior parte das vezes, a alimentação dos animais é complementada com restos de cozinha ou

desperdícios agrícolas. Pouco ou quase nada se faz para providenciar abrigo e não se investe em ração de qualidade ou serviços médicos veterinários (Sarcinelli et al., 2007).

O sistema intensivo caracteriza-se pelo confinamento total do animal em todas as fases de sua vida, em instalações especializadas, que asseguram um controle ambiental adequado. Esse sistema apresenta caráter empresarial, sendo geralmente utilizado pelas criações do tipo industrial, adota esquema de profilaxia específico no controle das principais doenças e utiliza esquemas nutricionais otimizados para as diferentes fases da vida do animal (Bonett e Monticelli, 1998). O sistema semi-intensivo consiste na combinação dos aspectos do sistema extensivo e intensivo, pois objetiva o aproveitamento racional da área e recurso disponível (Nicolaiewsky et al., 1998).

Segundo Sobestiansky et al. (1998) nos sistemas intensivos, geralmente, os suínos são categorizados e alojados de acordo com sua faixa etária em:

- leitão recém nascido: animais em fase de aleitamento com 21 a 28 dias de vida;
- leitão de creche: permanecem nesta fase do desmame até 65 dias de vida;
- leitão de terminação: constituem animais dos 65 a 150 dias de idade quando estarão pesando em média 110 quilos de peso vivo e serão vendidos para os matadouros frigoríficos;
- fêmea marrã ou leitoa: fêmeas compradas dos produtores de reprodutores com cinco a oito meses de idade e que serão preparadas para reprodução;
- fêmea vazia: animais em descanso reprodutivo;
- fêmea gestante: animais alojados em celas de gestação. O período de gestação em média é de 115 dias;
- fêmea maternidade: fêmeas em fase de amamentação. Ficam alojadas em celas maternidade junto com seus filhotes;
- cachaço ou varrão: reprodutores que irão cobrir as fêmeas ou serão utilizados para a produção de sêmen. Permanecem nesta fase de oito meses até em média seis anos de idade.

A balantidiose tem sido relatada em granjas de suínos em diversos países. No estado de Oklahoma, Estados Unidos, foi observada a prevalência de 55,1% para *B. coli* nas amostras fecais dos suínos (Morris et. al., 1984). Já na Geórgia, também Estados Unidos, Marti e Hale (1986) estudando 1173 amostras fecais de suínos de criações intensivas, em um período de cinco anos, observaram frequências de infecção por *B. coli*

acima de 50% em fêmeas com idade reprodutiva, destacando as fases de gestação e lactação.

Weng et al. (2005) estudaram parasitoses intestinais em 3636 amostras fecais de suínos de 38 granjas industriais na Província de Guangdong, China, sendo *B. coli* o parasito mais diagnosticado (47,2%). Outros parasitos também foram evidenciados como *Trichuris suis*, *Ascaris suum*, *Oesophagostomum* spp. e coccídios como *Eimeria* spp. e/ou *Cystoisospora suis*. *B. coli* assim como os outros parasitos foram mais detectados nas categorias reprodutoras e nos animais jovens, nas fases de creche e terminação.

Também na China, na cidade de Chongqing, Lai et al. (2011) estimaram a prevalência de parasitos intestinais em 2971 amostras de suínos de 14 criações intensivas e 29 de criações extensivas em 13 municípios. Das 2971 amostras estudadas, *B. coli* foi o parasito com maior prevalência (22,79%). Os autores observaram que *B. coli* foi o protozoário mais comum em todas as faixas etárias dos animais. Ismail et al. (2010) em área rurais da Coréia evidenciaram elevada frequência de *B. coli* em amostras fecais de suínos (64,7%). Uysal et al. (2009) estudando parasitos com potencial zoonótico em fezes de suínos de granjas em Istambul, Turquia, detectaram baixa frequência de *B. coli* (1,6%) em suínos de diferentes faixas etárias.

Bornay-Linares et al. (2006) investigaram a presença de parasitos intestinais em esterco de fezes de suínos de 5 granjas do tipo industrial da província de Alicante na Espanha, tendo sido detectados *B. coli* em 78% das amostras. Em Portugal no distrito de Évora, Gomes (2009) ao analisar 656 amostras fecais de suínos da raça Alentejana em 24 criações com sistema extensivo estimou a frequência de *B. coli* em 67%.

No Brasil, Nishi et al. (2000) avaliaram a presença de parasitoses gastrintestinais em nove granjas suinícolas dos Estados de São Paulo e de cinco de Minas Gerais, que utilizavam sistema intensivo de criação. Segundo os autores, foram examinadas 537 amostras de fezes, sendo 114 procedentes de Minas Gerais e 423 de São Paulo, nos quais pode-se observar a frequência desse parasito em cerca de 8,8% e 18,7%, respectivamente. Antunes et al. (2011), objetivando estabelecer a prevalência e identificação de ovos e cistos de parasitos gastrintestinais em fezes de 54 leitões na fase de terminação da fazenda Capim Branco, no município de Uberlândia, MG, detectaram positividade muito elevada de *B. coli* (98,1%).

No Distrito Federal, Aguiar (2009) realizando um levantamento parasitológico em 130 suínos, de três faixas etárias de criações familiares, detectou *B. coli* em 77,64%, sendo, o parasito mais diagnosticado. Brito et al. (2012) analisando amostras de 50

suínos de diferentes idades de propriedades familiares do município de Simão Dias, Sergipe, diagnosticaram cistos e/ou trofozoítos de *B. coli* em 78% das amostras estudadas. No Rio Grande do Sul, Steffen et al. (2010), estimaram frequência de 54,7% de *B. coli* em suínos da fase de terminação abatidos em matadouros frigoríficos na região central do estado.

Além de elevada frequência do parasito em suínos domésticos, *B. coli* também tem sido detectado em suínos silvestres como nos javalis (*Sus scrofa scrofa*). Solaymani-Mohammadi et al. (2004) examinando 12 intestinos de javalis, evidenciaram 25% de positividade para formas evolutivas do parasito. Mundim et al. (2004) relataram frequência de 38,5% (30/79) de *B. coli* em javalis da região do Triângulo Mineiro. Em 2005, Solaymani-Mohammadi et al. destacaram a importância dos suínos silvestres como possíveis reservatórios da balantidiose no Irã. Apesar da criação de suíno não ser permitida no Irã, devido a sua cultura muçulmana, grupos de javalis são observados vagando livremente em áreas rurais do país. Fezes de javalis contendo cistos do protozoário podem contaminar água e alimentos e assim, determinar a transmissão zoonótica.

1.5.1.3 Primatas não humanos

Em primatas não humanos, os parasitos gastrintestinais são uma das causas de doença mais frequente. Um grande número desses parasitos podem causar lesões e gerar comprometimento grave. Essas infecções tem sido relatadas em primatas do Novo Mundo, famílias Callitrichidae e Cebidae; Velho Mundo, família Cercopithecidae e Grandes Primatas, famílias Hylobatidae e Pongidae (Toft, 1982).

Diversas espécies de primatas vivem em cativeiros, sendo mantidos geralmente em zoológicos, em centros de pesquisa para estudos biomédicos, centros de conservação de espécies ou como animais de estimação, *pets*. Os cercopitecídeos do gênero *Macaca*, tem sido os mais utilizados como modelo experimental para pesquisas científicas (Johnson-Delaney, 2009). Animais sob condições naturais, raramente apresentam doenças por endoparasitos, porém quando em cativeiros podem tornar-se mais suscetíveis a infecções severas. O aumento da sensibilidade dos animais cativos ocorre principalmente pelo estresse do confinamento que debilita o sistema imunológico, a superpopulação dos animais, higiene do ambiente e alimentação deficiente (Malan et al., 1997).

Ainda são poucos os estudos que avaliam a carga parasitária em símios cativos. As principais pesquisas são realizadas com grandes primatas, como gorilas e chimpanzés (Levecke et al., 2007).

Em estudos epidemiológicos, Nakauchi (1999) pesquisando *B. coli* em amostras fecais de diferentes animais silvestres em parque na Província Ibakari no Japão, evidenciou positividade para *B. coli* em cinco das 24 espécies de símios estudadas, sendo que chimpanzé (*Pan troglodytes*) foi a espécie de primata que apresentou amostras fecais com maior carga parasitária.

Em zoológico na Malásia, *B. coli* foi o parasito mais diagnosticado entre os primatas não humanos, espécies do Novo Mundo (NM) e Velho Mundo (VM), sendo detectado em 19,2% dos animais. Sua frequência foi mais elevada nos símios do Velho Mundo da família Cercopithecidae (Lim et al., 2008). Já no zoológico Peña Escrita, Granada, Espanha, onde foi pesquisada a prevalência de parasitoses gastrintestinais em todos os animais cativos para avaliação da saúde do plantel, *B. coli* foi somente identificado nas amostras fecais de 1,9% dos símios (Córdon et al., 2008). Levecke et al. (2007) também estudando as parasitoses intestinais em 31 espécies de primatas não humanos representados por prosímios, NM, VM e grandes primatas, em quatro zoológicos da Bélgica, detectaram elevada frequência de protozoários nos símios do VM, destacando positividade para *Entamoeba* spp. (44%), *Giardia* spp. (41%) e *B. coli* (13%).

Balantidiose também tem sido relatada em primatas em vida livre. Em amostras fecais de Rhesus, que habitam livremente o Templo de Kathmandu, Nepal, *B. coli* foi detectado em 32,3% das amostras (Jha et al., 2011). Parasitoses gastrintestinais de orangotangos (*Pongo abelii*) em vida livre, semi - cativos e cativos da região de Sumatra, Indonésia foram estudadas desde 1998 até 2004. Os animais em vida livre apresentaram frequência de *B. coli* de 75%, significativamente maior do que os animais cativos e semicativos. Os autores relataram que nesta região suínos silvestres circulam no mesmo local que os orangotangos, favorecendo a manutenção da infecção de *B. coli* em natureza (Mul et al., 2007). O parasito também foi detectado no Instituto de Primatologia no Quênia, África por Munene et al. (1998) ao estudarem amostras fecais de primatas não humanos vivendo em diferentes habitats. Nos símios em vida livre e cativos foram evidenciadas positividade para *B. coli*, respectivamente, nos Babuínos, (*Papio cyanocephalus anubis*) 41,3% e 53,3%, Sykes (*Cercopithecus mitis*) 43,6% e 23,2% e nos Vervets cativos (*Cercopithecus aethiops*) 30%.

No Brasil, *B. coli* foi pela primeira vez relatado em Muriquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*) em vida livre na estação Biológica da Caratinga, Minas Gerais por Santos et al. (2004). O protozoário foi evidenciado nas amostras fecais nos três anos de acompanhamento do grupo em vida livre. No ano de 1993 a positividade foi de 30%, em 1994 foi de 27,7% e em 1996 de 16,6%. No Espírito Santo, *B. coli* foi o parasito mais diagnosticado nas amostras fecais dos Muriquis do Norte (*Brachyteles hypoxanthus*), tendo sido detectado em 57% do material fecal coletado (Angonesi et al., 2009).

1.5.1.4 Outros hospedeiros

Além de suídeos, humanos e primatas não humanos, *B. coli* também tem sido detectado em amostras fecais de outros animais. Na Argentina a frequência do parasito variou em 20% em emas da variedade pequena (*Rhea pennata*) e 16,3% em emas da variedade grande (*Rhea americana*) (Martínez-Díaz et al., 2013). Em um inquérito de parasitoses intestinais de 685 aves silvestres de dois criatórios em Pernambuco foi diagnosticado *B. coli* em 13,9% das amostras fecais analisadas nos membros da família Columbidae (Freitas et al., 2002). Ederli e Oliveira (2008) evidenciaram o parasito em 22% das amostras fecais de avestruzes (*Strutio camelus*) de diferentes criatórios no estado do Rio de Janeiro.

Balantidium sp. com morfologia compatível a *B. coli* foi detectado por meio de exame de fezes em oito ratazanas (29%) no Jardim Zoológico de Moscou, Rússia (Awakian, 1937). Em 2007, Da Silva et al. detectaram pela primeira vez o parasito em duas nutrias, roedores silvestres (*Myocastor coypus*) em criadouro conservacionista do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Na Finlândia, esse protozoário foi relatado como possível causador de colite aguda em uma égua, que foi submetida à eutanasia. Alterações histopatológicas foram observadas somente no cólon, onde foi revelado edema, infiltrado inflamatório, pontos de hemorrágicos e trofozoítos de *B. coli* totalmente submersos na camada mucosa (Headley et al., 2008). Na Coreia, um caso de óbito por *B. coli* foi registrado em um carneiro da Barbária (*Ammotragus lervia*). Na ocasião o animal estava letárgico, porém não apresentava fezes diarreicas. O exame histopatológico demonstrou a presença de trofozoítos de *B. coli* nos nódulos linfáticos, porém tais formas evolutivas não foram detectadas no conteúdo intestinal, sugerindo um padrão de invasão silenciosa (Cho et al., 2006).

B. coli foi detectado em 25% dos 200 bovinos estudados de Lahore, Paquistão e em 18,3% das fezes de 400 asininos também habitantes de Lahore, respectivamente por Bilal et al. (2009) e Khan et al. (2013). Além dos javalis, os camelos estão sendo apontados como principais reservatórios de balantidiose no Irã, país muçulmano. Em 2013, Tajik et al. relataram o primeiro caso de um camelo macho de três anos de idade, com balantidiose. O dromedário apresentou diarreia e estágio de anorexia. Foram realizados exames clínicos, hematológicos e coproparasitológicos. Ao exame de fezes foram detectadas numerosas formas evolutivas de *B. coli*. O animal foi tratado com ampicilina e recuperou-se totalmente, não apresentando nenhuma estrutura compatível com o parasito no sétimo dia de tratamento.

1.6 Patogenia, Manifestações Clínicas e Tratamento

Balantidium sp. é essencialmente um parasito de intestino grosso, habitando, principalmente as regiões de ceco e cólon (Zaman, 1978; Schuster e Ramirez - Ávila, 2008). O parasito pode determinar nos hospedeiros infectados manifestações clínicas, que variam de leves a graves. As apresentações da infecção são classificadas em: assintomáticas; crônicas caracterizadas por episódios de diarreia intermitente, sem sangue, cólicas e dor abdominal secundária a invasão da mucosa do intestino grosso pelo trofozoíto e agudas com forma disenteria, onde são observadas fezes liquefeitas com muco e sangue, que se apresentam com diferentes intensidades podendo culminar em quadros clínicos fulminantes (Dorfman et al., 1984; Vásquez e Vidal, 1999; Schuster e Ramirez - Ávila, 2008).

Segundo Woody e Woody (1960) os casos assintomáticos da parasitose, geralmente, ocorrem em crianças. Em sua revisão os autores apontaram que de 28 crianças diagnosticadas com o parasito, 10 (35%) apresentavam-se assintomáticas, enquanto que de 156 adultos parasitados, somente em três (1,9%) não foi possível serem observadas manifestações clínicas.

A forma crônica da balantidiose é caracterizada pela presença de movimentos intestinais que determinam diarreias alternando com episódios de constipação. As principais manifestações clínicas são dor epigátrica, cólica abdominal e tenesmo. O número de episódios diarreicos pode variar de três a 20 por dia. A perda de peso geralmente é moderada e o parasito é observado nas fezes esporadicamente, sendo necessários a repetição de exames para seu diagnóstico (Areán e Koppisch, 1956). A

duração das infecções crônicas pode variar de quatro a 26 anos nos adultos e de um a quatro anos nas crianças (Woody e Woody, 1960).

Infecção crônica com elevado tempo de duração foi relatada em um homem de 70 anos de idade que vivia na ilha de Aegean, Grécia. Em 1970, o paciente apresentou diarreia muco sanguinolenta. Apesar de ter procurado diversos serviços hospitalares, a causa da disenteria nunca foi esclarecida. Após 15 anos, o paciente foi, então, diagnosticado com colite crônica ulcerativa, sendo observados pólipos principalmente na região retal e massa tumoral pulmonar. A histopatologia dos pólipos revelou trofozoítos de *B. coli* e na massa pulmonar também foram diagnosticadas forma evolutivas desse protozoário, além de *Aspergillus* sp.. O paciente foi tratado com doxiciclina e recuperou-se totalmente da infecção (Ladas et al., 1989).

A forma aguda aparece repentinamente com três a 15 episódios diarreicos por dia, acompanhada de tenesmo, fezes contendo muco, sangue e neutrófilos, dor epigástrica, náusea e dor abdominal. A perda de peso pode ser rápida, alguns pacientes perdem até 40 quilos em um período de três meses. Letargia é um sintoma marcante e está diretamente relacionada à desidratação e subnutrição. Pacientes em forma aguda da balantidiose exalam odor peculiar de chiqueiro *pigpen*. A anemia pode ser resultante de episódios hemorrágicos. Leucocitose e eosinofilia, geralmente só são observadas em casos que cursam com complicações tais como, perfurações intestinais ou associação com outros parasitos. Nos casos fulminantes, o óbito ocorre, em média, entre três a cinco dias (Little, 1931; Areán e Koppisch, 1956). A taxa de mortalidade nesta apresentação clínica é de aproximadamente 30% (Elliot e Hotson, 1953).

Em casos humanos graves, geralmente, ocorrem perfurações da parede intestinal que é facilitada pelo movimento do ciliado e por suas enzimas, como a hialuronidase (Vásquez e Vidal, 1999). Tempelis e Lysenko (1957) demonstraram a produção da enzima hialuronidase por *B. coli in vitro*, sugerindo assim, um importante mecanismo de invasão tecidual. A proteólise da parede do cólon é um fator importante que facilita a invasão dos trofozoítos, formação de abscesso, ulceração e perfuração do intestino (Anargyrou et al., 2003). Padrão similar de proteólise e invasão de trofozoítos pela parede do intestino grosso tem sido relatado na infecção causada por *Entamoeba histolytica* (Schuter e Ramirez - Ávila, 2008).

A invasão tecidual frequentemente é evidenciada por estudos patológicos, nos quais as lesões são observadas principalmente no intestino grosso, especialmente no ceco e sigmóide. O intestino delgado raramente está envolvido no processo infeccioso,

exceto a porção final do íleo, podendo ser observado ulcerações na mucosa. Essas são discretas e irregulares, com aparência normal ou ligeiramente hiperêmica. As úlceras podem ser pequenas ou grandes, rasas ou profundas atingindo a camada muscular. No processo infeccioso, o cólon e o reto apresentam ilhas ulceradas e tecidos necróticos em seu interior. As úlceras podem variar de 0,5 a quatro centímetros de diâmetro.

No início da invasão, as lesões tendem a ser superficiais, porém com o passar do tempo, as úlceras tendem a se tornar maiores e com presença de tecido necrótico enegrecido, onde são encontrados trofozoítos de *B. coli*. Os parasitos também podem ser encontrados nos capilares e nos canais linfáticos do tecido infectado e linfonodos vizinhos (Little, 1931). Invasões silenciosas, ou seja, invasão parasitária tecidual sem formação de úlceras ou necrose, também podem ocorrer (Woody e Woody, 1960; Baskerville, et al. 1970). Microscopicamente, o parasito pode ser observado em todas as camadas do tecido intestinal, submucosa, mucosa e muscular. No início da infecção, os trofozoítos são encontrados agrupados em "ninhos" na submucosa. A reação inflamatória fica delimitada pela presença de células plasmáticas e linfócitos (Little, 1931).

As condições nutricionais do hospedeiro, microbiota intestinal, infecções entéricas por outros agentes etiológicos, carga parasitária infectante, acloridria, alcoolismo, doenças crônicas e sistema imunológico comprometido, como ocorre em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida podem favorecer a infecção pelo protozoário e a severidade da infecção (Woody e Woody, 1960; Esteban et al., 1998; Anargyrou et al., 2003; Ferry et al., 2004). Fatores como idade e sexo não se mostraram determinantes na severidade da doença (Walzer, et al., 1973). Alguns casos de balantidiose estão associados com a coexistência de uma microbiota patogênica ou potencialmente patogênica como fator predisponente para infecção (Schuster e Ramirez - Ávila, 2008).

A balantidiose fulminante possui uma taxa de mortalidade de 30% (Esteban et al., 1998). Rosales et al. (2000) relataram o caso de balantidiose fulminante de uma menina de dois anos de idade, habitante de Tumbes, Perú, que não tinha contato com suínos. A paciente chegou ao hospital com disenteria, vômitos e desidratação. Formas evolutivas do parasito foram diagnosticadas no exame de fezes, sendo o tratamento *a priori* realizado com metronidazol e tetraciclina. O quadro clínico evoluiu para sépsese e a menina foi a óbito. Casos fatais de balantidiose já foram documentados em diversas partes do mundo. Descrições esporádicas da parasitose tem sido relatadas, tanto na América do Sul, quanto na Costa Rica. Na Costa Rica até 1991, foram registrados três relatos de casos

fatais e vários informes da presença do parasito em estudos de prevalência coproparasitológicos (Hernández e Rivera, 1991).

Apesar do intestino grosso ser o habitat do ciliado, infecções extraintestinais, já foram relatadas na cavidade peritoneal, apêndice, fígado, trato genito-urinário, pulmões e até vértebras (Dhawan et al., 2013). Manifestações clínicas extra-intestinais são muito raras, principalmente as de localização hepática, diferentemente do que ocorre com a amebíase (Wenger, 1967).

Na França, Ferry et al. (2004) relataram caso de balantidiose determinando colite e peritonite em um trabalhador de matadouro frigorífico de suíno, que tinha 54 anos e histórico de alcoolismo. Os sintomas apresentados foram febre, dor abdominal, disenteria e desidratação severa. No diagnóstico coproparasitológico foram observados numerosos trofozoítos e cistos de *B. coli*. A histopatologia revelou focos necrose com trofozoítos invadindo a submucosa do cólon. O paciente recebeu doxiciclina e se recuperou totalmente após seis semanas de tratamento. Casos de apendicite pelo parasito foram relatados em dois pacientes por Areán e Koppish (1956). Em ambos os casos clínicos foram observados fortes queixas de dores abdominais. Foram realizadas apendicectomias e o exame histopatológico revelou a presença de infiltrado inflamatório e abundantes formas vegetativas do protozoário.

Peritonite secundária à apendicite foram observadas em um fazendeiro, criador de suínos, de 16 anos de idade admitido no Hospital Geral do Sul em Maracaibo, Venezuela com dor abdominal e diarreia aquosa. Na laparotomia foi observado fluido amarelado purulento no peritônio devido à perfuração do apêndice. O apêndice foi removido e o peritônio drenado, porém o quadro clínico complicou-se e o paciente faleceu. O exame do infiltrado inflamatório do apêndice e do fluido pulmonar revelaram numerosos trofozoítos de *B. coli*, caracterizando quadro clínico de balantidiose invasiva (Dorfman et al., 1984).

Wenger (1967) relatou o primeiro caso de abscesso hepático causado pelo protozoário em um rapaz venezuelano de 16 anos de idade, que foi internado e operado com suspeita de apendicite aguda. Em torno de 50 dias após a cirurgia, o paciente foi ao óbito, e na necropsia foi, então, observado infiltrado inflamatório e perfurações em cólon, apêndice e diafragma. A perfuração do diafragma estava localizada próximo à um abscesso hepático. Trofozoítos do parasito foram detectados no conteúdo do abscesso e também em material de peritônio.

Acredita-se que casos de infecções de trato geniturinário pelo parasito ocorram pelo contato direto de material fecal da região anal, pela presença de fístulas retovaginais ou secundária a invasões teciduais. Na Índia foi relatado o caso clínico de uma mulher de 29 anos com disúria e aumento de frequência urinária. No exame de urina foi observado trofozoítos compatíveis com *B. coli*, porém no exame coproparasitológico não foi evidenciado formas evolutivas do protozoário. A mulher recuperou-se totalmente após tratamento com tetraciclina e metronidazol (Sumukhi, 2007).

Na Itália um paciente com linfoma não Hodgkin, que estava sendo submetido a tratamento prolongado com quimioterápicos foi hospitalizado com problemas renais. Trofozoítos de *B. coli* também foram diagnosticados no sedimento urinário, porém não foram evidenciados nas fezes. O paciente relatou não ter contato com animais. Os autores acreditaram que o estado de imunocomprometimento associado à quimioprofilaxia possa ter favorecido a infecção, que deve ter ocorrido após invasão tecidual do parasito na mucosa do intestino. Esse paciente também foi tratado com metronidazol (Maino et al., 2010).

Infecções pulmonares por *B. coli* ocorrem devido a sua capacidade invasiva, que favorece o parasito em alcançar a corrente sanguínea ou sistema linfático, e assim chegar aos pulmões, ou por colonização direta do trato respiratório por meio da inalação das formas císticas. Na província de Manitoba, Canadá foi relatado infecção pulmonar por *B. coli* em um agricultor de 42 anos que praticava cultivo orgânico e que utilizava rotineiramente fezes de suínos como fertilizante de solo para suas plantações. Provavelmente, devido ao manejo do fertilizante, o agricultor inalou os cistos em forma de aerossol, que se instalaram em seus pulmões. Após tratamento com doxiciclina o agricultor ficou curado (Sharma e Harding, 2003). Segundo, Schuster e Ramirez - Ávila (2008) a transmissão de cistos por via aerógena, é pouco provável de ocorrer, pois cistos de *B. coli* são grandes e pesados, dificultando a sua disseminação pelo vento ou por gotículas de água a uma grande distância.

Lesões pulmonares causadas por *B. coli* foram evidenciadas por Anargyrou et al. (2003) em uma mulher de 59 anos com leucemia linfocítica, que não se alimentava de alimentos crus e não tinha contato com animais, nem com excretas de animais. Trofozoítos foram diagnosticados no lavado broncoalveolar da paciente, porém não foram detectados nas fezes. A mulher recebeu tratamento com metronidazol intravenoso. Pneumonia também em paciente imunocomprometido foi observada em mulher de 71 anos, diabetes melitus dependente de insulina que vivia na cidade de Atenas. A mulher

tinha histórico de diarreia com febre, sendo admitida ao hospital com dor torácica, dispneia e febre. Após vários tratamentos com diferentes antibióticos foi então avaliado as secreções brônquicas, nas quais foram observados inúmeros trofozoítos de *B. coli*. A mulher então foi submetida, a tratamento com metronidazol, ciprofloxacina e imipenem, porém foi ao óbito com insuficiência cardíaca (Vasilakopoulou et al., 2003).

Infecções pulmonares acometem principalmente idosos ou imunocomprometidos, porém, em 2010, Koopowitz et al. relataram caso de balantidiose determinando hemorragia pulmonar severa e deficiência de ferro em homem de 20 anos imunocompetente no Reino Unido. O diagnóstico foi obtido por meio da biópsia e lavado pulmonar, onde, foi observado vários trofozoítos compatíveis com *B. coli*. Não foi realizado exame coproparasitológico, não sendo possível determinar se a infecção ocorreu após uma propagação intestinal ou se pode ter ocorrido por inalação de cistos em dejetos contaminados. O paciente relatou não ter contato com suínos, porém o mesmo admitiu ser praticante de *rugby*. Os autores ressaltaram que, geralmente, o gramado do campo de *rugby* recebe dejetos de suínos como fertilizante.

Propagação extraintestinal acometendo as vértebras, até hoje, foi documentada somente em um senhor de 60 anos de idade com histórico de alcoolismo, que apresentou sintomas de febre, fraqueza dos membros inferiores, incontinência intestinal e urinária. Na radiografia foi observado abscesso entre as vértebras cervicais (C3 – C4). O abscesso foi aspirado cirurgicamente e submetido a técnicas histopatológicas, sendo revelada a presença de trofozoítos. O exame de fezes não identificou a presença do parasito, mesmo assim, os autores atribuíram o caso, a possível propagação dos trofozoítos a partir da invasão e perfuração da parede intestinal. Após meses de retirada do abscesso o paciente apresentou recuperação completa (Dhawan et al., 2013).

Segundo Solaymani-Mohammadi e Petri Jr. (2006) pessoas que já tiveram a balantidiose podem se reinfestar. Medidas de prevenção, para evitar *B. coli*, tem sido as mesmas utilizadas para a prevenção de parasitoses intestinais, como água de abastecimento potável, hábitos de higiene pessoal principalmente em pessoas que entram em contato com suínos e/ou com efluentes desses animais.

Na literatura não há descrição de tratamento específico para a parasitose (Elliot e Hotson, 1953). Antes de 1950, a falta de fármacos efetivos resultava em uma taxa de mortalidade humana acima de 30% (Areán e Koppisch, 1956). As infecções por *B. coli* tem sido tratadas com antibióticoterapia, sendo principalmente utilizadas as ciclinas, como tetraciclina e paramomicina ou os derivados azólicos como o metronidazol (Bellanger et

al., 2013; Vásquez e Vidal, 1999). Contudo, no tratamento da balantidiose aguda, a tetraciclina tem sido o fármaco de escolha para eliminar totalmente o parasito (Solaymani–Mohammadi e Petri Jr. (2006). Excelentes resultados foram alcançados com oxitetraciclina e clortetraciclina (Woody e Woody, 1960). Também há casos humanos de diarreia causada pelo ciliado em, que houve recuperação total do quadro clínico utilizando arsênicos como carbasone e acetarsol (Elliot e Hotson, 1953; Woody e Woody 1960). Beasley e Walzer (1972) relataram a ineficácia do metronidazol, em três de cinco voluntários humanos que se infectaram no surto de balantidiose no Distrito de Truk. Os autores chamaram atenção da necessidade de estudos que ajudem a ajustar a dose do medicamento e assim torná-lo mais eficiente. Em 1975, Garcia – Laverde e Bonilla avaliaram a atividade terapêutica do metronidazol em 20 casos humanos de balantidiose na Venezuela, utilizando a dose de 25 a 50 mg/kg. O fármaco foi administrado em dose única durante 10 dias consecutivos. Após quatro dias de tratamento formas evolutivas do parasito não foram mais observadas nas fezes dos pacientes. Todos toleraram bem o metronidazol, não apresentando efeitos colaterais.

Em estudos *in vitro*, já foi demonstrado que a paromomicina conseguiu inviabilizar totalmente o protozoário, não sendo evidenciadas formas evolutivas do parasito, quando este, foi inoculado em meio de cultura com doses acima de 4 mg/mL em tempo de incubação de 48 horas (Náquira et al., 1966).

Nos suínos, considerados os principais reservatórios de *B. coli*, como nos primatas não humanos os relatos de casos clínicos causados pelo protozoário ainda são muitos poucos. Segundo Schuster e Ramirez - Avila (2008), as manifestações clínicas em suínos são similares as que ocorrem no hospedeiro humano, podendo variar desde quadros assintomáticos a quadros agudos ou crônicos. De acordo com Solaymani-Mohammadi e Petri Jr (2006), os suínos, em sua normalidade, são assintomáticos, e os infectados, de forma geral, eliminam grandes volumes de fezes, sendo assim considerados carreadores da parasitose.

Sobestiansky et al. (1999) apontaram que *B. coli* pode ser considerado um agente comensal do trato digestivo de suínos, causando, em determinadas circunstâncias, diarreia. Isto tem sido observado quando o animal está com quadros de imunocomprometimento, deficiências nutricionais, ou quando há associação com outros agentes patogênicos. A morte dos suínos por balantidiose é rara, mas pode ocorrer em uma a três semanas após o aparecimento da sintomatologia.

Desde 1988 até 1990 foram relatados em média 100 casos clínicos em símios determinados por *B. coli*. Os fatores que interferem na patogenicidade desse parasito ainda não estão claros. Nos grandes primatas em cativeiro, especialmente nos gorilas, as infecções podem se manifestar como diarreias crônicas a sanguinolentas (Lee et al., 1990). Já foi documentado que *B. coli* é capaz de invadir a mucosa intestinal e determinar casos fatais em símios, como o relatado em chimpanzé (*Pan troglodytes*) por Kim et al. (1978) e em gorila da planície ocidental (*Gorilla gorilla gorilla*) por Lankester et al. (2008).

No Departamento de Medicina de Búfalo, Estados Unidos ocorreram três casos clínicos de tiflíte causada por infecções silenciosas de *B. coli* em símios. Os animais apresentavam-se prostrados, com perda de peso, presença de fezes amolecidas e com episódios de vômitos. *B. coli* não foi evidenciado nas pesquisas fecais, porém foi identificado em peças cirúrgicas intestinais, sendo observadas úlceras e infiltrado inflamatório com numerosos trofozoítos. Todos os animais recuperaram-se após tratamento com os antibióticos diiodohydroquinona e/ou paramomicina (Lee et al., 1990).

Em 2007, Hinde apontou *B. coli* como o único parasito gastrintestinal capaz de alterar os índices de gordura do leite em fêmeas lactentes de Rhesus (*Macaca mulatta*). Tayib e Abdoun (2013) relataram um caso clínico de um babuíno (*Papio hamadryas*), em um *pet shop* na Arábia Saudita, com diarreia e distensão abdominal, no qual somente formas evolutivas de *B. coli* foram detectadas nas fezes. O símio recebeu tratamento com tetraciclina e metronidazol e conseguiu ser curado. Ainda em 2013, Schovancová et al. demonstraram, em ensaios preliminares, que a dieta em cativeiro pode ser um fator favorável a manutenção da balantidiose no plantel, pois chimpanzés que receberam alimentos ricos em carboidrato apresentaram aumento significativo de trofozoítos de *B. coli* em suas amostras fecais.

1.7 Diagnóstico

1.7.1 Diagnóstico Coproparasitológico

O diagnóstico da balantidiose é baseado, principalmente, na detecção por microscopia dos trofozoítos e cistos em amostras fecais frescas ou com conservante químico. Cistos de *B. coli* têm liberação intermitente nas fezes, necessitando de repetições dos exames e coletas de múltiplas amostras para seu diagnóstico (Soleymani-Mohammadi et al., 2004). O parasito também pode ser diagnosticado em coleta de

amostras a partir de proctoscopia (Areán e Koppisch, 1956). Devido ao seu grande tamanho e motilidade, esse protozoário pode ser facilmente reconhecido em montagem a fresco em lâmina por microscopia óptica até mesmo em aumentos de 100x (Schuster e Ramirez - Ávila, 2008). O material obtido em fezes frescas deve ser examinado imediatamente, pois os trofozoítos deterioram-se em pouco tempo (Areán e Koppisch, 1956).

A incidência de *B. coli* varia muito. Esta variação depende principalmente do método de investigação. Discrepâncias podem ser atribuídas a necessidade de coleta de fezes frescas sem conservante químico, a avaliação rápida das fezes para evitar a desintegração do trofozoíto e a coleta de mais de uma amostra fecal em diferentes dias (Areán e Koppisch, 1956).

No caso de amostras fecais diarreicas, onde é mais provável o aparecimento de trofozoítos, e também em amostra de lavado broncoalveolar, o material pode ser submetido ao exame direto. Biópsia retal também pode fornecer formas evolutivas do parasito para diagnóstico (Anargyrou et al., 2003). A forma cística é geralmente encontrada em fezes sólidas e semi-sólidas. Para seu diagnóstico uma porção da amostra de fezes deve ser homogeneizada juntamente com solução salina tamponada ou com fixador químico e filtrada através de gaze para remoção de fragmentos fecais. O filtrado resultante pode ser examinado em microscópio óptico (Schuster e Ramirez - Ávila, 2008). Formas evolutivas de *B. coli* são melhores detectadas em lâminas por microscopia com objetivas de baixo aumento (Elliot e Hotson, 1953; Areán e Koppisch, 1956). Os cistos são geralmente detectados em menos de 10% dos seres humanos infectados, enquanto, que os trofozoítos são detectados em mais de 80% dos casos humanos (Woody e Woody, 1960; Areán e Koppisch, 1956).

O microscópio de contraste de fase pode auxiliar na visualização de estruturas internas em ciliados corados ou fixados. A coloração temporária pode ser feita utilizando Lugol, porém essa concentra-se progressivamente no citoplasma, dificultando a observação de detalhes como o macronúcleo. O mesmo também vale para colorações permanentes como a hematoxilina-férrica, pois as células podem absorver o excesso de corante, escurecendo os detalhes internos, que prejudica o diagnóstico. Cistos intensamente corados podem ser confundidos com ovos de helmintos, causando erro de diagnóstico. A biópsia do cólon, seguida da coloração por hematoxilina - eosina, pode ser útil para avaliar os danos à parede intestinal (Schuster e Ramirez-Ávila, 2008). Métodos

de concentração de parasitos, a partir de amostras fecais, facilitam seu diagnóstico, sendo muito útil na detecção de cistos (Woody e Woody, 1960).

Em infecções pulmonares por *B. coli* podem determinar equívocos no diagnóstico, devido a dificuldade de diferenciação entre as células ciliadas do epitélio e trofozoítos do parasito (Anargyrou et al., 2003; Sharma e Harding, 2003; Vasilakopoulou et al., 2003). Testes imunológicos para detecção de *B. coli* já foram desenvolvidos por alguns autores, Dzbenski (1966) ao analisar a imunofluorescência indireta para testar a resposta sorológica a infecção pelo protozoário, não conseguiu detectar anticorpos no sangue de coelhos. Zaman (1964) descreveu que títulos de anticorpos $\leq 1:64$ produzidos em coelhos experimentalmente infectados foram capazes de causar reação de imobilização tanto em cepas isoladas de suínos quanto em cepas de humanos.

1.7.2 Cultura

Segundo Clark e Diamond (2002) o cultivo de protistas intestinais tem uma longa história, porém nem todos os enteroprotzoários são mantidos *in vitro*, conseqüentemente, poucas pesquisas são feitas sobre esses microrganismos. A cultura é um importante recurso para estudos que necessitam de um grande número de células, como os de metabolismo, imunodiagnóstico, infecção experimental e fisiologia. Em termos de diagnóstico clínico laboratorial, o cultivo de protozoários tem utilização bastante restrita, sendo a microscopia óptica ainda considerada o padrão ouro para exames de rotina (Clark e Diamond, 2002). No entanto, para o diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*, o cultivo é um dos métodos mais preconizados (Diamond, 1968; Borchardt e Smith, 1991). O diagnóstico de protozoários utilizando meios de cultura não são considerado um procedimento de rotina, ao contrário do que ocorre em bacteriologia, pois o isolamento e a manutenção de protozoários *in vitro* é considerado um método caro e trabalhoso (Clark e Diamond, 2002).

Existem três tipos de sistemas de cultivo acelular: xênico, onde o parasito cresce na presença de outros microrganismos desconhecidos; monoxênico, onde o parasito cresce juntamente com outro microrganismo conhecido; axênico, onde o parasito cresce na ausência de quaisquer outras células. O termo polixênico, algumas vezes, tem sido erroneamente utilizado como sinônimo do sistema xênico (Clark e Diamond, 2002). Na verdade, o termo polixênico significa um sistema de cultura onde existem várias espécies

de microrganismos conhecidos (Dougherty, 1959). Os protozoários são geralmente obtidos de materiais ricos em bactérias e/ou fungos, sendo importante controlá-los para garantir sucesso na manutenção de seus cultivos (Clark e Diamond, 2002).

Entre as variáveis envolvidas no cultivo de enteroprotzoários estão o pH do meio, microbiota associada, diferenças entre cepas e necessidades nutricionais intrínsecas. Como ocorre com muitos patógenos mantidos *in vitro*, o cultivo prolongado atenua a virulência do protozoário, sendo necessário para restaurá-la, a infecção em animais de laboratório (Schuster e Ramirez - Ávila, 2008).

Os principais componentes dos meios de cultura são fontes de peptídeos e aminoácidos (tripticase ou caseína digesto de peptona), ácidos nucleicos (extrato de levedo), carboidratos (glicose e amido), lipídeos (soro) e vitaminas (culturas axênicas). O amido oriundo de arroz tem sido muito utilizado devido ao tamanho de sua partícula, já que o enteroprotzoário tem que ser capaz de fagocitá-lo. Sabe-se que a adição de açúcares solúveis nos meios de cultivo, proporciona um alto crescimento de bactérias, tornando assim, o meio inviável para os protozoários. As bactérias presentes no meio de cultivo podem crescer de forma exacerbada, tornando necessária a adição de antibióticos para seu controle. Os antibióticos de escolha são os de amplo espectro como penicilina, estreptomicina e eritromicina, por apresentarem pouco efeito nocivo sobre os trofozoítos (Clark e Diamond, 2002).

O soro de origem animal é um dos componentes fundamentais para o crescimento de enteroprotzoários *in vitro*. Os tipos de soro mais utilizados em cultivos são de bovino adulto (Diamond, 1982; Silva 1997), fetal bovino (Klaas, 1974), cavalo (Yu e Kin, 1970; Carneri, 1972; Nilles - Bije e Rivera, 2010) e humano (Barret e Yarbrough, 1921). Atualmente, a aquisição do soro é difícil pelo elevado custo e por ser controlada comercialmente. Para minimizar o uso de tal componente em cultivo, Limoneu et al. (2007) realizaram um estudo comparando o uso de meios sem e com soro de cavalo para o diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. O meio que não possuía soro, mas que era acrescido de ferro apresentou o maior crescimento quantitativo desses flagelados e o maior intervalo entre as transferências de subculturas, tendo sido, portanto, considerado o de maior viabilidade laboratorial.

Segundo Clark e Diamond (2002), *T. vaginalis* e *Giardia duodenalis* podem ser isolados diretamente em meios de cultivo axênicos. Já os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Blastocystis hominis*, necessitam primeiramente ser isolados e mantidos com sucesso em meios xênicos ou monoxênicos, para posteriormente ser axenizados. Já se

sabe que *B. coli* pode ser mantido monoxenicamente em associação com *Escherichia coli*, ou outra bactéria intestinal, sem muita dificuldade (Zaman, 1978). Segundo Solaymani-Mohammadi e Petri Jr. (2006) *Balantidium* sp. pode ser cultivado xênicamente, não havendo até então, sucesso comprovado nas tentativas de axenização. Apesar de não ter sido publicado em formato de artigo, Gurski et al. (1962) citaram sem detalhes de metodologia e resultados, uma possível axenização de *Balantidium* sp. isolado de pecilotérmico da espécie *Tiliqua nigrolutea*.

Acredita-se que o isolamento de cepas de *Balantidium* sp. pode ser iniciado por meio da simples inoculação de uma porção do material fecal diretamente no meio de cultura, acrescido de amido de arroz estéril. Para a manutenção em cultura, geralmente segue-se o mesmo esquema preconizado para *E. histolytica*, com passagens das cepas para meios novos e frescos em intervalos de 48 a 72 horas. Para aumentar o tempo de incubação e com isso aumentar o intervalo de passagens deve-se diminuir o tamanho do inóculo (Clark e Diamond, 2002).

O primeiro relato de cultivo de *B. coli* ocorreu com Barret e Yarbrough (1921), utilizando meio de cultivo simples desenvolvido para isolamento e manutenção de *Blastocystis hominis*. O isolado de *B. coli* foi originário de um paciente do Distrito da Carolina, Estados Unidos, que apresentou quadros diarreicos por quatro anos. As amostras fecais contendo muco foram inoculadas em tubos de ensaio contendo solução salina 0,5% acrescida de soro humano inativado. Essas cepas foram mantidas com sucesso durante 32 dias a temperatura de 37°C, com intervalos de passagens de 48 horas. Também utilizando o método de Barret e Yarbrough (1921), Rees (1927) isolou e manteve cepas de *B. coli* de suínos por até 48 dias e de porquinhos da Índia (*Cavia porcellus*) por seis subcultivos.

Segundo Zaman (1978) outros meios de cultivo com qualidade superior ao relatado por Barret e Yarbrough (1921) foram desenvolvidos posteriormente. O grande avanço no cultivo de *B. coli* ocorreu quando Jameson (1927) demonstrou que o meio de Boeck e Drbohlav's (1925) e a sua modificação (Dobell e Laidlaw, 1926) mostraram-se aptos para crescimento e manutenção desse ciliado. Esse meio também conhecido como HSre, possui uma fase sólida feita com ovo branco de galinha e uma fase líquida composta por solução salina acrescida de soro de cavalo. Foi, então por muitos anos, considerado o cultivo padrão para diagnóstico e manutenção desse protozoário em rotina laboratorial.

Em 1947, Nelson desenvolveu um meio xênico bifásico com base sólida de ovo e extrato alcoólico para cultura de *E. histolytica* que também apresentou sucesso para manutenção de *B. coli*. Ao longo de cinco anos Svensson (1955), isolou e manteve com sucesso 60 cepas de *B. coli* de suínos recém abatidos em matadouros frigoríficos, em meios bifásicos, sendo a base sólida composta de soro coagulado de cavalo, e a parte líquida do mesmo soro diluído, acrescentando amido de arroz momentos antes da inoculação. Já em 1957, Tempelis e Lysenko modificaram o meio de Nelson (1947) substituindo a base de ovo por ágar, a fim de comprovar a produção de hialuronidase por *B. coli*. Os autores utilizaram um meio bifásico que consistia em uma base de ágar, com uma fase líquida de infusão de gema de ovo. Foi adicionado amido de arroz, e assim, o cultivo do ciliado de *B. coli* de suíno foi possível até a realização do experimento.

Zaman (1964) observou que cepas de suínos apresentaram maior dificuldade de crescimento *in vitro* do que cepas isoladas de humanos. Para garantir sucesso no isolamento de cepas de suínos Zaman seguiu o método de Nelson (1940), que consistiu em uma etapa de pré-isolamento. Nesta, o ceco do suíno foi transportado imediatamente para o laboratório e examinado para diagnóstico de ciliados. A preparação do método de consiste em esvaziar o conteúdo de cada ceco em copo de béquer e homogeneizá-lo em solução salina tamponada na proporção de 1:5. Tal material foi então filtrado em gaze e depois transferido para um tubo de fundo cônico. Após 48 horas de incubação o sedimento dos tubos que apresentassem os melhores crescimentos quantitativos de trofozoítos, foi inoculado em meio de cultura. Essa técnica tem funcionado como estágio intermediário de isolamento e ajuda a manter as condições ótimas de crescimento para *Balantidium* sp., pois previne o supercrescimento de *Trichomonas* sp. e *Blastocystis* sp..

Yu e Kin (1970) propuseram a utilização de um novo meio para cultivo de amebídeos, *Balantidium* sp. e *Trichomonas* sp. que consiste em solução salina tamponada, extrato de fígado, mistura de amido de arroz com carvão animal, soro de cavalo e polimixina B. As subculturas foram realizadas a cada 48 horas, e a viabilidade máxima após interrupção dos mesmos não foi definida. A utilização do meio foi satisfatória e a taxa de positividade do cultivo nesse foi duas vezes superior a da positividade do diagnóstico realizada pela microscopia óptica.

Os meios de cultivo xênicos utilizados para isolamento e manutenção de *B. coli* são, em geral, os mesmos empregados para cultivo de *E. histolytica*, como por exemplo o meio LES (Locke, Egg, Serum), TYSGM-9 (Tryptcase, Yeast extract, Serum, Gastric Mucin) (Clark e Diamond, 2002) e Pavlova (Carneri, 1972). A adição de amido de arroz

estéril é essencial para o crescimento de *B. coli*, assim como para manutenção de *E. histolytica* (Zaman, 1978). A modificação da microfauna bacteriana pode ser alcançada com utilização de antibióticos ou pela adição de corantes a base de flavina (Svensson, 1955). *B. coli*, ao contrário de outros protozoários, pode crescer em ampla variação de temperatura (25 a 40°C). Cepa do ciliado isolada de ceco de suíno, mantida em meio HSre foi testada quanto ao crescimento em diferentes faixas de temperatura de incubação. O autor observou que trofozoítos foram mantidos viáveis por mais tempo na menor temperatura de incubação (20°C) e que houve a maior concentração de células do ciliado nas maiores temperaturas (40 a 43°C) (Cox, 1961).

TYSGM-9 consiste em um meio líquido, monofásico que possui mucina gástrica, tendo sido desenvolvido por Diamond (1982) para facilitar a transição de cepas xênicas de *E. histolytica* para condições axênicas. Ele tem mostrado ser um bom meio xênico de manutenção *in vitro* dos seguintes protozoários: *E. histolytica*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba gingivalis* e *Dientamoeba fragilis*. TYSGM-9 foi produzido a partir do meio axênico TYI-S-33. Segundo Diamond (1982) sua utilidade para manutenção de outros enteroprotazoários ainda não foi testada. Nesse meio foi possível isolar amebídeo do trato genital de uma paciente usuária de dispositivo intra-uterino (DIU), porém tal sucesso no isolamento não foi observado no meio LES.

O meio TYSGM-9 apresenta algumas vantagens sobre outros, mais rotineiramente utilizados, como o bifásico, LES desenvolvido por Boeck e Drbohlav (1925). As cepas de protozoários, quando mantidas em TYSGM-9, podem ser avaliadas *in situ*, utilizando o microscópio invertido, por se tratar de um meio líquido transparente. Tal fato não pode ser realizado quando cepas são mantidas em meios bifásicos. TYSGM-9 pode ser preparado em poucas horas, fato que não ocorre com o meio LES. Além disso, os protozoários mantidos em TYSGM-9 conservam melhor sua integridade do que em LES (Diamond, 1982).

Meios contendo mucina gástrica, assim como o TYSGM-9 tem sido utilizado para cultivo de *E. histolytica*. Segundo Dolkart e Halpern (1958) a mucina contém componentes, ainda não conhecidos, que favorecem o crescimento do trofozoíto, já que esta é uma substância presente na membrana da mucosa intestinal do hospedeiro, estrutura também encontrada no habitat do protozoário. Klaas (1974) conseguiu manter por 30 meses cepa de *Balantidium* sp. de suíno utilizando meio contendo mucina gástrica, em intervalos de manutenção de 72 horas.

O meio xênico líquido monofásico de Pavlova (1938) que consiste em uma mistura de sais de fosfatos e extrato de levedo, acrescido de soro e amido de arroz foi desenvolvido para isolamento e manutenção de cepas de *E. histolytica*. Além do bom desenvolvimento dos amebídeos, o autor conseguiu também limitar o crescimento da microbiota, o que permitiu subcultivos a cada 72 horas. Jones (1946) realizou um estudo a fim de determinar um melhor medicamento para o tratamento de amebíase. Nesse estudo o autor modificou o meio Pavlova (1938), adicionando extrato de levedo, favorecendo o cultivo do parasito. Com esse meio, Lima e Hirschfeld (1996) obtiveram sucesso no isolamento de 42 cepas de *E. histolytica* (40%) das 105 amostras fecais de humanos obtidas em Hospitais e Universidade do estado de São Paulo, das quais, 17 (16%) foram mantidas com sucesso. Silva (1997) também relatou o isolamento e manutenção de 83 cepas de *E. histolytica*, obtidas de pacientes sintomáticos e assintomáticos de diversas partes do Brasil, utilizando meio Pavlova modificado por Jones. Pavlova modificado por Jones acrescido de 20% de soro de cavalo e amido de arroz estéril foi utilizado por Carneri (1972) para avaliar a atividade de compostos nitroimidazólicos em três cepas de *B. coli* de origem suína, uma das quais foi, por muito tempo, mantida na London School of Tropical Medicine, isolada na Inglaterra (cepa Londres) e outras duas isoladas na Itália (cepa Milão e cepa Lombardia).

LES consiste em um meio bifásico a base de ovo de galinha (Boeck e Drbohlaw, 1925). Seu uso foi preconizado para o isolamento de flagelados intestinais e foi também, o primeiro meio utilizado para manutenção de *E. histolytica* (Clark e Diamond, 2002). Dobell e Laidlaw (1926) introduziram nesse meio o amido de arroz como fonte de carboidrato, que permanece como um componente importante em todos os meios xênicos. Segundo Clark e Diamond (2002), LES também tem sido utilizado com sucesso para encistamento de *E. histolytica*. Depois do LES, muitos outros meios bifásicos foram desenvolvidos utilizando soro de animais, ágar ou extrato de ovo como base.

Cunha e Muniz (1937) visando estudar a ocorrência de conjugação de *Balantidium* sp., utilizaram cepas de infecção humana, suína e de primata não humano, isoladas em meio de Boeck e Drbohlaw (1925), modificado por Dobell e Laidlaw (1926), onde a parte sólida consistia em soro de cavalo coagulado, e a parte líquida de clara de ovo e solução de Ringer acrescido de amido de arroz estéril. As cepas de humano e de suínos foram facilmente cultivadas e mantidas por várias passagens. Porém, as provenientes de *Macaca mullata* (Rhesus) apresentaram tentativas de manutenção frustradas, com a cepa sobrevivendo no máximo até quatro ou cinco subcultivos. Diamond (1953) avaliando 28

meios de cultura para manutenção de *Trichomonas gallinae*, evidenciou pouco desenvolvimento dos flagelados em meio LES.

Skotarczak (1997 b) evidenciou as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus putrificus* e *Streptococcus faecalis* em *B. coli* isolados de suínos, mantidos a 37° C em meio Pavlova. A autora ressalta que os microrganismos atuam como possíveis simbiontes e são importantes para o crescimento *in vitro* do parasito e, que a axenização do ciliado deve ser uma etapa impossível.

1.7.3 Biologia Molecular

Estudos utilizando ferramentas de biologia molecular tem auxiliado na confirmação de espécies de *Balantidium* sp. e redescrição de outras. Para *B. coli*, ainda não há muitos marcadores moleculares descritos, e o principal alvo utilizado tem sido o RNA ribossomal (Pomajbiková et al., 2013).

O DNA que codifica para RNA ribossômico (RNAr) apresenta-se como um *cluster* gênico, no qual se tem o gene 18s, 5.8s e 28s. Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro. Esse *cluster* apresenta algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis. A região 18s é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28s é mais variável e, portanto, apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. São regiões relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permitindo que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (Figura 7) (Hillis e Dixon, 1991).

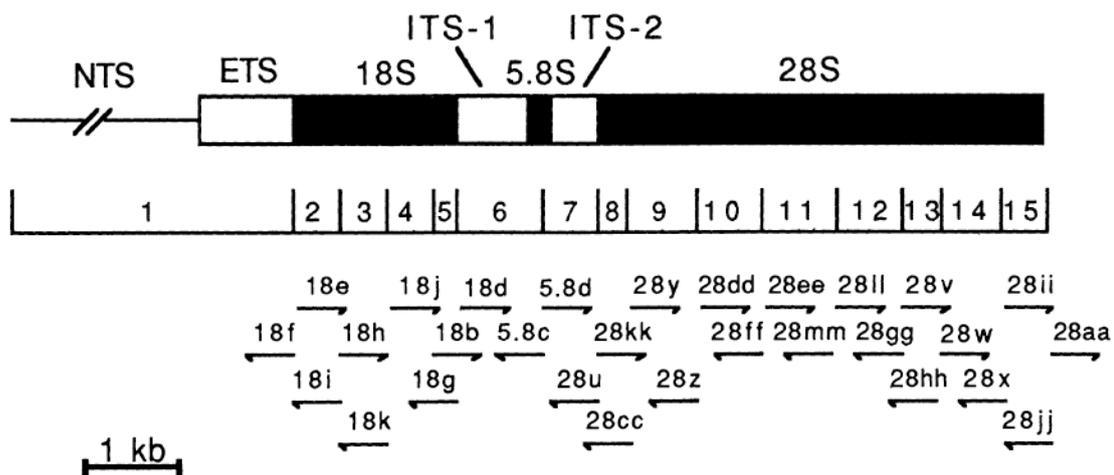


Figura 7. Esquema das regiões do RNA ribossomal. Fonte: Hillis e Dixon, 1991.

Em ciliados, como *Tetrahymena* spp., geralmente as unidades transcritoras estão distribuídas em uma única cópia de DNA dentro do micronúcleo. A partir do cromossoma micronuclear elas são cortadas e rearranjadas, sendo então, armazenadas em dímeros dentro do cromossoma macronuclear (Prescott, 1994).

Acredita-se que para *Balantidium* sp. o sequenciamento das estruturas secundárias armazenadas no macronúcleo pode ajudar a resolver algumas confusões taxonômicas que ainda constam na literatura (Ponce Gordo et al., 2011). Como mencionado anteriormente, as características morfológicas do parasito e também o hospedeiro parasitado, foram por muito tempo considerados, os únicos fatores importantes na descrição das espécies dos ciliados deste gênero. Com base nestas características, muitas espécies famosas foram descritas, como *B. suis* parasito de suínos (McDonald, 1922), *B. caviae* de porquinho da índia (Neiva et al., 1914), *Balantidium wenrichi*, *Balantidium philippinensis* e *Balantidium cunhamunizi* em primatas não humanos (Hegner, 1934). Além de *Balantidium struthionis* em avetruz (Hegner, 1934).

Ponce Gordo et al. (2008) questionaram a validade de *B. struthionis* como espécie distinta e, então, compararam a identidade genética de sequências de *Balantidium* sp. extraído de amostras de fezes de avetruz e suínos utilizando como marcadores, 18s RNAr e ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2. Ao final da análise as sequências estudadas foram consideradas pertencentes a espécie *B. coli*. Além disso, os autores também evidenciaram um perfil variante genético nas regiões ITS, que permitiram classificá-las em genótipos A e B.

Anos mais tarde, os mesmo autores ampliaram o estudo incluindo além dos isolados de suínos e avestruz, também amostras de fezes positivas para *Balantidium* sp. de gorila e humano. Os cistos de *Balantidium* sp. de cada hospedeiro foram estudados de forma individualizada. As sequências da região ITS foram comparadas. Com este estudo os autores observaram que dentro de uma única célula pode ser evidenciado dois tipos de sequências variantes distintas na região ITS. Neste mesmo estudo, os autores relataram a presença de sequências mistas presentes em um único cisto, o que indica a presença de pelo menos dois tipos gênicos no RNAr micronuclear (Ponce Gordo et al., 2011).

Estas sequências variantes descritas por Ponce Gordo et al. (2008) como genótipo, passaram então, por uma questão de precaução, a serem denominadas como “sequências variantes”, pois segundo o dicionário de genética epidemiológico descrito por Malats e Calafell (2003) genótipo refere-se à constituição de um organismo, que é modulada pelo ambiente antes de ser expressa em fenótipo. Devido a esta definição, alterações de nucleotídeos presente na região ITS não poderiam definir um perfil genotípico.

As sequências de *B. coli* das estruturas secundárias foram classificadas em variantes tipo A e B, de acordo com alterações nas estruturas ITS1 e ITS2. Esta classificação tem sido realizada, principalmente, observando as posições 39 a 56 na região ITS1, que corresponde a hélice II dessa estrutura. Para utilização deste critério, as sequências são obtidas e agrupadas em: variante tipo A que possui seis pares de base na hélice II de ITS1 e B que possui quatro pares de bases. A variante A pode ser também classificada como A0, A1, A2 e a tipo B em B0 e B1 (Figura 8A - B). Além disso, de acordo com algumas posições dos nucleotídeos nas regiões ITS1 e ITS2 as variantes A0, B0 e B1 podem também ser subclassificadas em A0a, A0b, B0a, B0b, B1a e B1b (Figura 9) (Ponce Gordo et al., 2011).

A hélice II de ITS1 que claramente distingue, as variante A e B ocorrem principalmente nas posições 47 a 52 e tal diferença afeta o comprimento da hélice (2 bp de base a menos nos tipos B0 e B1), e duas inserções UU (TT) na posição 49 das sequências do tipo A1 e A2, em uma região de *loop*. Além disso, pode ser observada uma pequena hélice extra entre as hélices III e IV entre os tipos A0, A1 e A2, contudo seus pares de base podem ser pequenos ou não, presentes nas variantes do tipo B e também nos ciliados *Isotricha prostoma* e *Troglodytella abrassarti* (Ponce Gordo et al., 2011).

Sequências de *B. coli* isolados de gorila que haviam sido publicada por Wright em 1999, foram classificadas em variante C, porém, após análise mais detalhada da

sequência foi notado que esta variante apresentava um perfil A0, não podendo ser subclassificada em A0a e A0b (Ponce Gordo et al., 2011).

Em 2008, Nilles-Bije e Rivera (2010) nas Filipinas também confirmaram a presença de *B. coli* no conteúdo intestinal de suíno. O parasito foi isolado e mantido por 14 dias em meio de cultivo com Ringer acrescido de soro de cavalo e amido de arroz. A confirmação do parasitismo foi realizada por meio da amplificação da RNAr 18s. As sequências foram comparadas com as que estavam depositadas no *Genbank*. Além das ferramentas de biologia molecular os autores também utilizaram análises ultraestruturais do protozoário.

Em 2013, Pomajbíková et al. estudaram sequências de *Balantidium* sp. por meio de metodologias moleculares com os marcadores 18s e ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 obtidas de amostras fecais de primatas não humanos cativos e em vida livre e também de suínos, bovinos e de uma rã em países da Europa e África. Neste estudo, os autores demonstraram que o grupo filogenético de *B. coli* era totalmente distante do grupo *B. entozoon*, ciliado evidenciado nos anfíbios. Os autores propuseram então, que a espécie *B. coli* deveria ser renomeada em *Neobalantidium coli*, pois *B. entozoon* foi taxonomicamente nomeado primeiro. Os autores evidenciaram variantes do tipo A e B, além de algumas sequências mistas.

Hassel et al. (2013) evidenciaram pela primeira vez sequências de *B. coli* em amostras fecais de gorila da montanha (*Gorilla beringei beringei*). Por meio do sequenciamento e clonagem da região ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 foi possível observar duas variantes mistas do tipo A0 e B1.

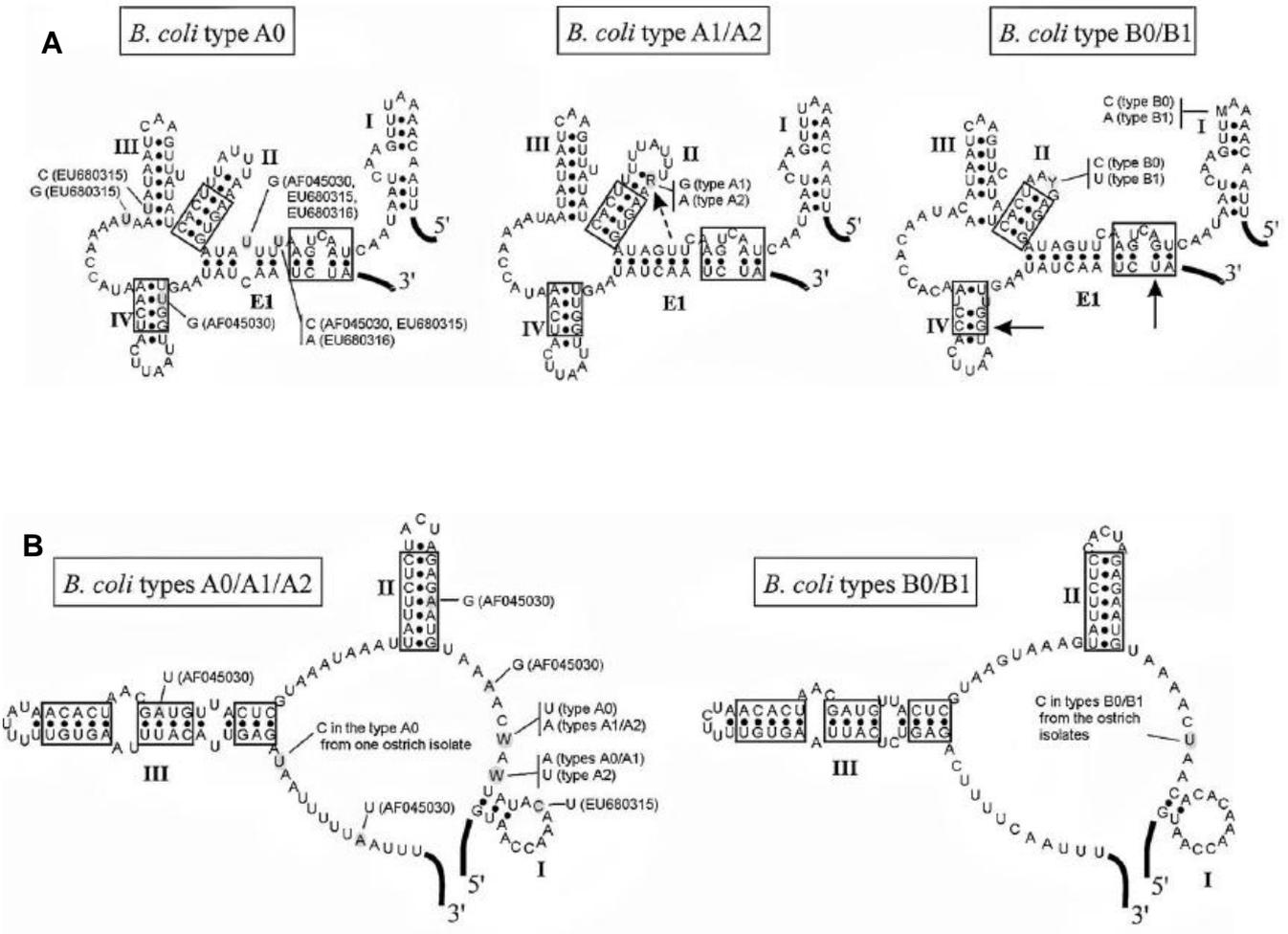


Figura 8. Esquema de classificação das variantes de *Balantidium coli* segundo as estruturas secundárias. Em **A** - região ITS1 e em **B** - ITS2 Fonte: Ponce Gordo et al., 2011.

| Type of sequence variant | Sequence code | Host species | Base positions | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------|------------------------------------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|--|--|
| | | | 10 | 25 | 32 | 35 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 61 | 73 | 79 | 84 | 87 | 89 | 96 | | | |
| A0 | A0a | pig, human, ostrich isolates #1-#3 | T | A | T | T | A | A | T | T | T | A | - | - | T | T | A | T | A | T | A | T | T | | | |
| A0 | A0b | ostrich isolate #4 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | - | - | . | . | . | . | . | . | . | . | . | | | |
| A1 | A1 | pig, gorilla, ostrich | . | . | C | G | . | G | . | . | . | . | T | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | | | |
| A2 | A2 | human | . | . | C | G | . | . | . | . | . | . | T | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | | | |
| B0 | B0a | pig | C | G | C | G | G | C | A | A | - | - | - | - | - | - | C | C | C | C | T | C | - | | | |
| B0 | B0b | ostrich | C | G | C | G | G | C | A | A | - | - | - | - | - | - | C | C | C | C | T | C | - | | | |
| B1 | B1a | pig, gorilla | A | G | C | G | G | T | A | A | - | - | - | - | - | - | C | C | C | C | T | C | - | | | |
| B1 | B1b | ostrich | A | G | C | G | G | T | A | A | - | - | - | - | - | - | C | C | C | C | T | C | - | | | |

ITS1

| Type of sequence variant | Sequence code | Host species | Base positions | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------|------------------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | 272 | 274 | 275 | 277 | 295 | 303 | 308 | 333 | 334 | 345 | 349 | 350 | 356 | 357 | 358 | 363 | |
| A0 | A0a | pig, human, ostrich isolates #1-#3 | T | T | A | T | T | T | A | A | T | T | A | T | T | A | A | T | |
| A0 | A0b | ostrich isolate #4 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | |
| A1 | A1 | pig, gorilla, ostrich | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| A2 | A2 | human | . | . | T | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| B0 | B0a | pig | C | C | A | . | C | G | G | - | C | - | T | C | C | - | - | C | |
| B0 | B0b | ostrich | C | C | A | C | C | G | G | - | C | - | T | C | C | - | - | C | |
| B1 | B1a | pig, gorilla | C | C | A | . | C | G | G | - | C | - | T | C | C | - | - | C | |
| B1 | B1b | ostrich | C | C | A | C | C | G | G | - | C | - | T | C | C | - | - | C | |

ITS2

Figura 9. Esquema de classificação das variantes A0, B0 e B1 em A0a, A0b, B0a, B0b, B1a e B1b do RNAr - ITS1 e RNAr – ITS2 de *Balantidium coli*. Fonte: Ponce Gordo et al., 2011.

2 JUSTIFICATIVA

O presente estudo foi proposto devido as escassas informações existentes na literatura referentes a *Balantidium coli*, onde se destacam a possibilidade zoonótica de infecção e a importância deste protozoário na saúde dos humanos, suínos e primatas não humanos. Outros pontos relevantes para o desenvolvimento desta pesquisa foram as controvérsias existentes quanto a seus dados epidemiológicos no Brasil, dúvidas em sua taxonomia e reservatórios naturais, pouco conhecimento sobre seu isolamento *in vitro* e comportamento em diferentes meios de cultivos, bem como os aspectos morfológicos e moleculares. Cabe ressaltar, que ainda não foram realizados no Brasil análises de isolados desse ciliado por meio de técnicas ultraestruturais e moleculares, o que torna este estudo pioneiro em nosso país.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a diversidade dos isolados de *Balantidium* sp. em suínos, primatas não humanos cativos e humanos no estado do Rio de Janeiro.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de *Balantidium* sp. em suínos criados em diferentes sistemas de manejo;
- Determinar a frequência de *Balantidium* sp. em diferentes espécies de primatas não humanos cativos;
- Determinar a frequência de *Balantidium* sp. em profissionais tratadores de suínos e primatas não humanos;
- Comparar a eficiência das técnicas coproparasitológicas para diagnóstico da balantidiose;
- Isolar cepas de *Balantidium* sp. em meio de cultura xênico;
- Analisar o comportamento de *Balantidium* sp. em diferentes meios de cultura xênicos;
- Caracterizar os isolados em manutenção de *Balantidium* sp. por meio de ferramentas moleculares;
- Analisar a morfologia e ultraestrutura de isolados de *Balantidium* sp..

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Esta pesquisa obteve parecer favorável em 18 de junho de 2012 do Comitê de Ética Humano (IOC-Fiocruz), protocolo nº648/12 (ANEXO 1), em 02 de julho de 2012 do Comitê de Ética Animal (CEUA-Fiocruz), nº de licença LW57/12, protocolo nº P 79/11-2 (ANEXO 2) e licença do SISBIO – IBAMA, sob número de protocolo 31900-2 (ANEXO 3).

4.2 Local do estudo

No período de julho de 2012 a janeiro de 2014 foram coletadas amostras fecais de suínos (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) de granjas com sistemas de produção familiar e industriais localizadas em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro, amostras fecais de primatas não humanos cativos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal/Fiocruz - RJ) e do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e também dos profissionais manipuladores desses animais.

4.2.1 Localização das Granjas de Suínos

Foram convidados a participar do estudo produtores de suínos de granjas familiares do interior da região metropolitana e baixada litorânea, onde se concentra a maioria dos produtores familiares (tradicionais) do estado do Rio de Janeiro. Além destes, também foram convidados, produtores de sistemas tecnificados, com produção do tipo industrial, localizadas no município de Petrópolis e Itaperuna. Essas granjas tecnificadas foram selecionadas por serem as principais produtoras de suíno do Rio de Janeiro, especialmente a do município de Petrópolis, que atualmente, é considerada a maior produtora do estado. Concordaram e assinaram o Termo de Anuência os responsáveis de nove granjas de suínos localizadas em municípios distintos do Rio de Janeiro. Na região metropolitana participaram as propriedades dos municípios de: Itaboraí e Maricá; na

serrana: Petrópolis; na baixada litorânea: Rio Bonito, Saquarema, Silva Jardim e Casimiro de Abreu e no noroeste fluminense: Itaperuna. Todas as granjas de suínos foram georeferenciadas com GPS Garmin® modelo Etrex.

4.2.2 Localização dos Criatórios de primatas não humanos

O estudo foi conduzido em dois criatórios de primatas não humanos localizados no estado do Rio de Janeiro. Um deles foi o Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal), situado no bairro de Manguinhos, dentro da Fundação Oswaldo Cruz. Nesse, os animais mantidos em cativeiro são destinados a pesquisa de enfermidades com importância em saúde coletiva, como a malária entre outras. O outro foi o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, (CPRJ/INEA), localizado no município de Guapimirim, cujo principal objetivo é desenvolver pesquisas sobre a biologia das espécies de primatas não humanos neotropicais e seu habitat, de modo a favorecer ações de conservação.

4.3 Caracterização do local de estudo e coleta de amostras

4.3.1 Caracterização das granjas e coleta de amostras fecais dos suínos

Todos os suínos estudados pertenciam a propriedades particulares, tendo os responsáveis pelos mesmos e seus funcionários, autorizado e auxiliado na contenção mecânica dos animais por ocasião da coleta. Para fins de amostragem, nas granjas familiares, optou-se por coletar o máximo de animais, pois o número de suínos em cada propriedade era pequeno, resultando em diferença no número total de amostras de cada granja, sendo excluídas as fêmeas prenhas, recém paridas e leitões recém nascidos. Nas granjas do tipo industrial foi utilizado o intervalo de confiança de no mínimo 80% com 5% de precisão, com exceção dos setores de terminação e creche da granja de Petrópolis, onde foi adotada amostragem por conveniência, sendo coletadas, no mínimo, 100 amostras fecais de cada categoria, pois nesses havia mais de 1.000 animais em cada setor. No total foram coletadas, 790 amostras fecais de suínos, sendo: 88 amostras de propriedades familiares e 702 de propriedades com produção do tipo industrial (tecnificadas).

Granjas familiares, totalizaram = 7

- Rio Bonito (A): 21 suínos
- Araruama (B): 7 suínos
- Saquarema (C): 12 suínos
- Maricá (D): 8 suínos;
- Itaboraí (E): 12 suínos
- Casimiro de Abreu (F): 23 suínos
- Silva Jardim (G): 5 suínos

Granjas tecnificadas do tipo industriais, totalizaram = 2

- Petrópolis (H): 479 suínos
- Itaperuna (I): 223 suínos

Nas propriedades familiares estudadas os animais não possuíam raças definidas e permaneciam em baias coletivas (Figura 10 e 11). Já nas granjas do tipo industriais os suínos eram oriundos de linhagens específicas (Figura 12). Em Petrópolis, os animais pertenciam à linhagem TOPIG do Brasil[®] e em Itaperuna, à Agroceres[®]. Nessas, os suínos eram categorizados em: fêmeas reprodutoras (fêmeas adultas): maternidade, gestante e vazia (em período de descanso reprodutivo); fêmeas marrãs ou leitoas (não adultas que nunca foram inseminadas), machos reprodutores (adultos), leitões de creche (desmamados até 17 semanas de idade) e leitões de terminação (18 a 22 semanas de idade).



Figura 10. Ilustração das granjas familiares de suínos. **A** - Baia coletiva de suínos na granja de Rio Bonito. **B** - Suíno ao ar livre amarrado com corda pelo pescoço ao tronco de árvore em Araruama. **C** - Baia coletiva de suínos na granja de Saquarema. **D** - Suíno sendo contido pela equipe de trabalho de campo para coleta de amostra fecal em piquete da granja de Maricá. Fonte: original do autor.

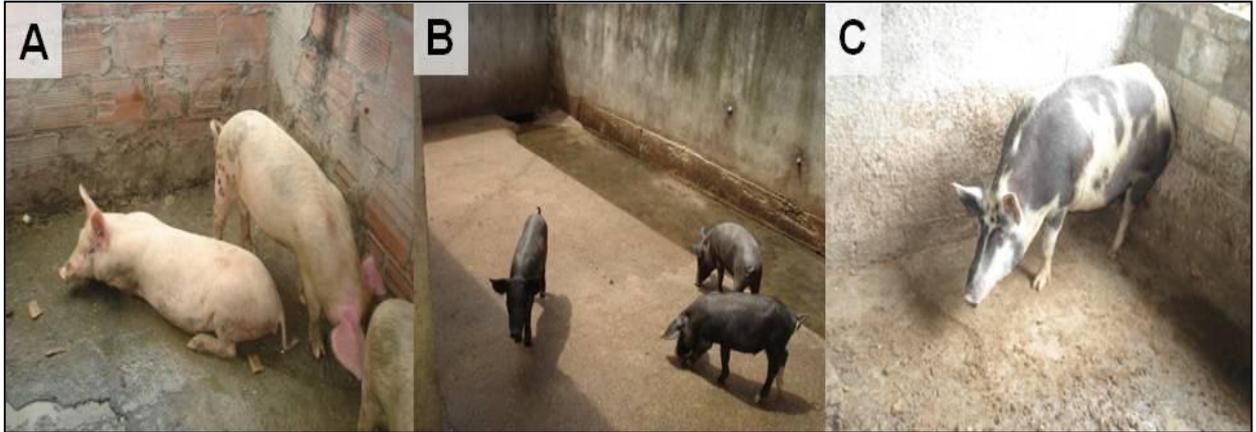


Figura 11. Ilustração das granjas familiares de suínos. **A** - Baia coletiva de suínos na granja familiar de Itaboraí. **B** - Baia coletiva de suínos com lâmina d'água na granja familiar de Casimiro de Abreu. **C** - Baia coletiva com suíno na granja familiar de Silva Jardim. Fonte: original do autor.



Figura 12. Ilustração das granjas industriais de suínos. **A** – Celas com fêmeas gestantes na granja industrial de Petrópolis. **B** – Setor de terminação na granja industrial de Itaperuna. Fonte: original do autor.

As amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal, com a utilização de luva de palpação longa com comprimento de 80 cm Walmur® lubrificada com óleo mineral Vetec®. Após as coletas, as amostras foram identificadas individualmente com etiqueta, acondicionadas em recipiente isotérmico e, imediatamente, encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense.

Informações sobre a estrutura das granjas familiares e industriais de suínos e o manejo aplicado pelas mesmas foram coletadas por meio de observações e relatos de proprietários ou funcionários. As características consideradas relevantes foram definidas e listadas a seguir. Todas as observações de cada granja estão resumidas no ANEXO 4.

Tipo de produtor:

Familiar: produtor que tem poucos animais e instalações modestas. Geralmente os animais são destinados a sua própria subsistência ou pequenas movimentações financeiras;

Produtor industrial: produtor que vende todos os animais para matadouro frigorífico federal, estadual ou municipal. Geralmente utilizam animais de linhagem de alta performance para atingir o índices zootécnicos o mais rápido possível;

Sistema de produção:

Intensivo: em que os animais ficam totalmente confinados em salas separadas por categoria, recebem ração, manejo sanitário rigoroso com higiene constante das instalações e vermifugação. Neste sistema geralmente, há uma sala de quarentena para abrigar os novos animais que serão inseridos no plantel. Os suínos quando atingem o peso ideal (animais no setor de terminação) são vendidos para matadouro frigorífico credenciado.

Semi-intensivo: em que os suínos fiquem confinados, pelo menos, em baias ou piquetes, não divididos necessariamente por categoria de animais.

Extensivo: as instalações são mais simples, sem piso cimentado. Os animais podem ficar ao ar livre, soltos em piquetes ou amarrados em quintais.

Instalações: estrutura física onde os animais são criados. Foram observados o tipo de recinto: *baias individuais, coletivas*, dentre outras.

Tipo de piso: tipo de revestimento utilizado nos locais onde os animais são mantidos. Foi considerado *solo desnudo* ou *cimentado*.

Lâmina d'água: pequena quantidade de água mantida ao final das baias para os animais se refrescarem. Foi considerado *presença* ou *ausência*.

Alimentação: tipo de alimentos que são oferecidos aos suínos.

Vermífugo: foi considerado a utilização de vermífugo de forma rotineira e o princípio ativo do medicamento.

Raça ou linhagem do animal utilizada pelo produtor.

Retirada de excretas: forma como os dejetos eram retirados das instalações.

Higiene das instalações: as instalações foram classificadas em insatisfatórias quando apresentavam grande quantidade de fezes no assoalho e satisfatórias quando estavam com assoalho, com pouco ou nenhum resíduo fecal.

Origem da água: origem da água de abastecimento utilizada pelos animais, para beber e lavagem das instalações.

Presença de outros animais nas instalações: presença de algum animal dentro das instalações onde estão os suínos.

Sala de quarentena: instalação onde são mantidos os animais recém adquiridos antes de serem introduzidos no plantel de criação. Essa instalação deve localizar-se distante do local de produção.

4.3.2 Caracterização dos criatórios e coleta de amostras fecais dos primatas não humanos

As coletas de amostras fecais de primatas não humanos cativos foram conduzidas no Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal) e também no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, (CPRJ/INEA). O Cecal possui quatro espécies de primatas não humanos, sendo que duas pertencem ao grupo de primatas não humanos do Velho Mundo (VM) do gênero *Macaca* (Figura 13A - B) duas espécies do Novo Mundo do gênero *Saimiri* (Figura 14A - B). Já o CPRJ, abriga 37 espécies de primatas do Novo Mundo (NM) pertencentes aos gêneros *Cebuella*, *Callithrix*, *Calibela*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callimico*, *Aotus*, *Callicebus*, *Saimiri*, *Cebus*, *Pithecia*, *Chryoptes*, *Cacajao*, *Alouatta*, *Ateles* e *Brachyteles* (Figuras 15 - 22). Em ambas as instituições os símios ficam abrigados em recintos familiares, sendo que no CPRJ, algumas espécies ficam em recintos individuais.



Figura 13. A. *Macaca fascicularis* (Cynomolgus). Fonte: Acervo Cecal.
B. *Macaca mulatta* (Rhesus). Fonte: Ana Limp – Fiocruz.

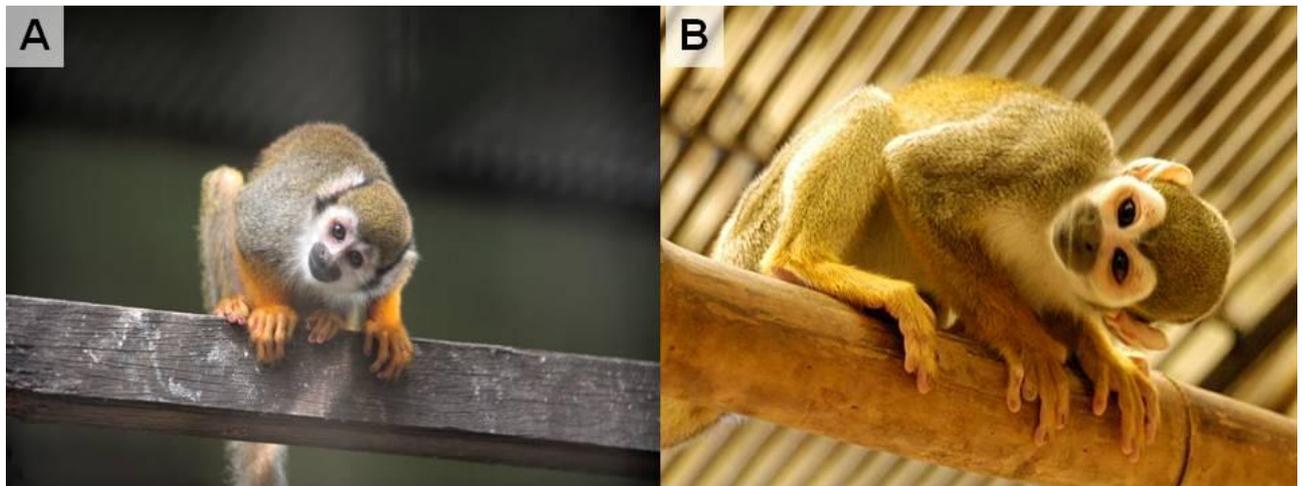


Figura 15. **A.** *Saimiri sciureus*. Fonte: Peter Illiciev - Fiocruz. **B.** *Saimiri ustus*. Fonte: Ana Limp – Fiocruz.

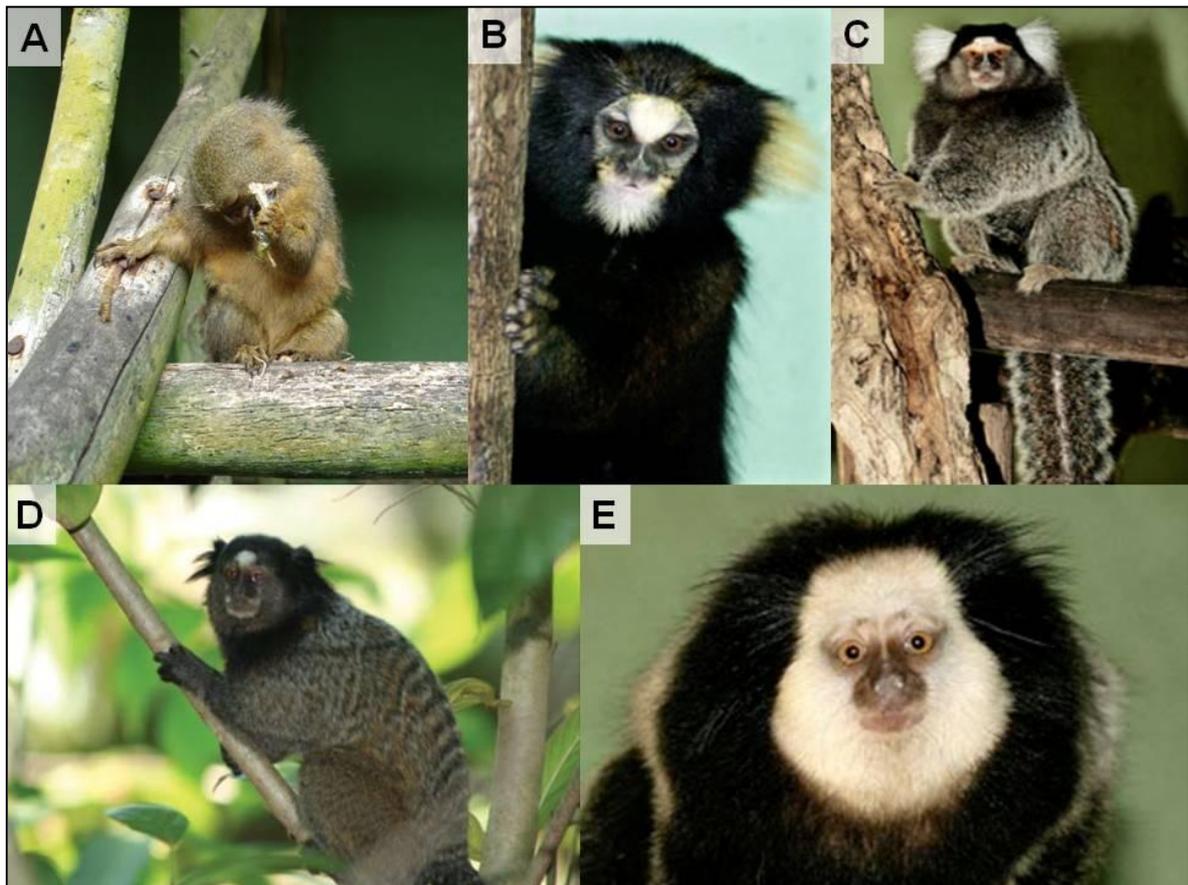


Figura 14. **A.** *Cebuella pygmaea*. Fonte: original do autor. **B.** *Callithrix aurita*. Fonte: CPRJ/INEA; **C.** *Callithrix jacchus*. Fonte: CPRJ/INEA. **D.** *Callithrix penicillata*. Fonte: Vilela e Del Claro (2011). **E.** *Callithrix geoffroyi*. Fonte: CPRJ/INEA.



Figura 16. A. *Calibella humilis*. Fonte: CPRJ/INEA. B. *Mico chrysoleucus*. Fonte: CPRJ/INEA. C. *Mico humeralifer*. Fonte: CPRJ/INEA. D. *Mico melanurus*. Fonte: Fábio Manfredini, Arquive. E. *Mico saterei*. Fonte: CPRJ/INEA.

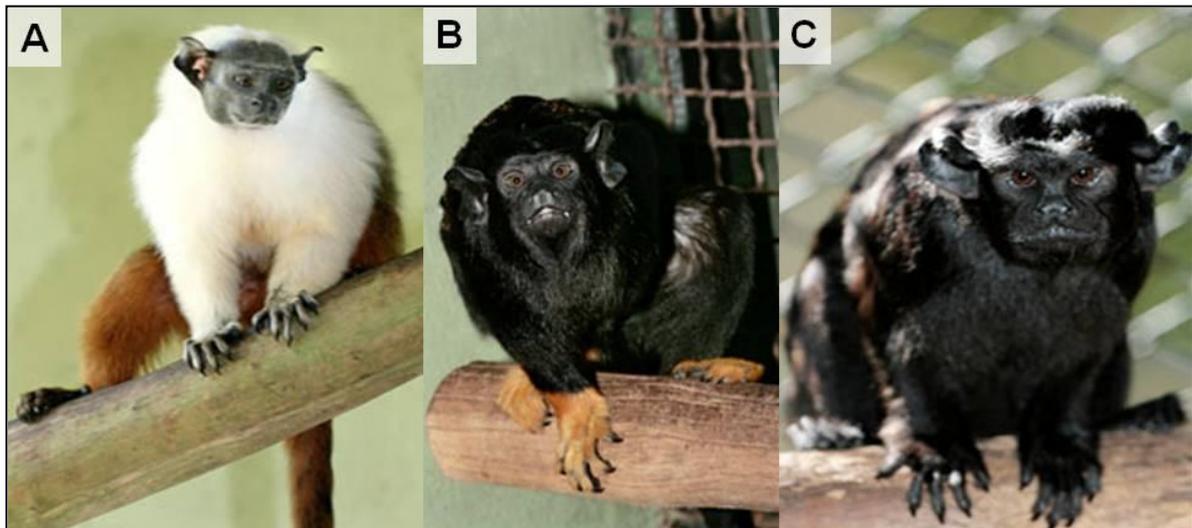


Figura 17. A. *Saguinus bicolor*. Fonte: CPRJ/INEA. B. *Saguinus midas*. Fonte: CPRJ/INEA. C. *Saguinus niger*. Fonte: CPRJ/INEA.



Figura 19. A. *Leontopithecus rosalia*. Fonte: CPRJ/INEA. B. *Leontopithecus chrysomelas* Fonte: CPRJ/INEA. C. *Leontopithecus chrysopygus*. Fonte: Instituto de Pesquisa Ecológicas (IPE).

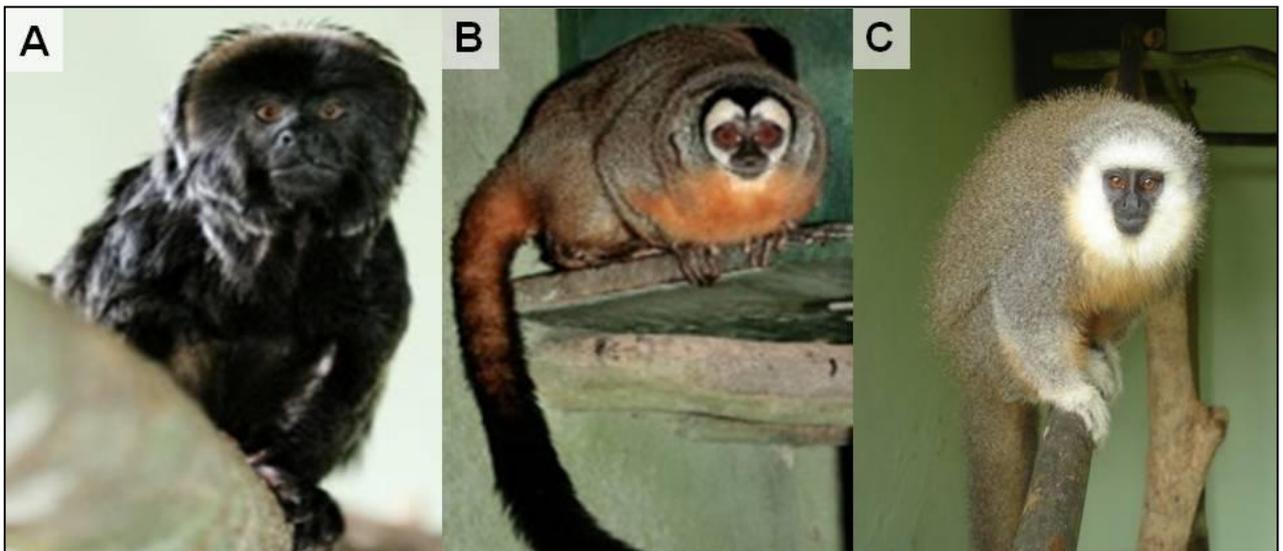


Figura 18. A. *Callimico goeldii*. Fonte: CPRJ/INEA. B. *Aotus nigriceps*. Fonte: CPRJ/INEA. C. *Callicebus moloch*. Fonte: original do autor



Figura 20. A. *Cebus/Sapajus xanthosternos*. Fonte: CPRJ/INEA. B. *Cebus/Sapajus robustus* Fonte: CPRJ/INEA.



Figura 21. A. *Pithecia monachus* Fonte: CPRJ/INEA. B. *Chiropotes satanas*. Fonte: original do autor. C. *Cacajao melanocephalus*. Fonte: CPRJ/INEA.



Figura 22. **A.** *Alouata guariba clamitans*. Fonte: CPRJ/INEA. **B.** *Ateles paniscus*. Fonte: original do autor. **C.** *Brachyteles arachnoides*. Fonte: CPRJ/INEA.

O criatório do Cecal possui três grandes colônias, que ficam localizadas em espaços físicos distintos. Em geral, os recintos possuem uma parte coberta e outra descoberta, assoalho cimentado e troncos de árvores para enriquecimento ambiental. Já o CPRJ está localizado próximo à Mata Atlântica, sendo seus recintos dispostos em ambiente natural, cercado por floresta. Esse possui quatro ambientes divididos em setores. Os recintos são enriquecidos com troncos de árvores e chão coberto com folhas secas. Em ambas as instituições, não é permitida a visitação pública, a higiene das instalações é realizada de forma rotineira, os alimentos são colocados em vasilhames diariamente. Tanto o CPRJ quanto Cecal, mantém rotina antiparasitária pelo menos uma vez ao ano.

Ao total foram coletadas 1115 amostras fecais de primatas não humanos, sendo 960 do Cecal e 155 do CPRJ. Optou-se por coletar as amostras fecais do assoalho dos recintos dos primatas, para minimizar o estresse consequente do processo de contenção animal. As coletas foram padronizadas de acordo com cada local estudado.

Nos recintos do Cecal, há um grande número de animais com pouca variedade de espécies. Nessas, as coletas foram feitas de forma pontual (uma única vez em cada recinto). A quantidade de amostra coletada foi idêntica à quantidade de primatas habitante de cada recinto. Já no CPRJ há uma grande variedade de espécies de primatas com menor quantidade de exemplares do que no Cecal. Nesse local, a maioria dos símios são

de pequeno porte, o que resulta em pequeno volume fecal. Para aumentar o volume da amostra e com isso garantir a realização com qualidade das técnicas laboratoriais, optou-se por coletar o material em triplicata (três dias consecutivos) de cada recinto. As triplicatas foram consideradas uma única amostra (pool de amostra). Para todas as coletas deu-se preferência por conteúdos fecais frescos, que foram depositados em coletores plásticos de 80 mL sem conservante químico, sendo todos acondicionados em recipientes isotérmicos (Figura 23).



Figura 23. Coleta de amostras fecais nos recintos dos primatas não humanos do CPRJ.
Fonte: original do autor.

4.3.3 Coleta de amostras fecais dos manipuladores dos animais

Em todos os locais estudados os manipuladores dos suínos e primatas não humanos foram convidados a participar do estudo. Para eles foi lido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e explicado o objetivo do estudo. Após consentimento e assinatura do TCLE, foi entregue a cada manipulador um *kit* de coleta de fezes que continha dois coletores fecais de cor branca com capacidade de 80 mL etiquetados sem conservante, duas pazinhas de madeira primoutilizadas e um informe explicando o procedimento de coleta (Figura 24). Também, foi explicado verbalmente a cada manipulador que a amostra deveria ser coletada de dois dias distintos, depositadas em ambiente seco, armazenadas em temperatura de geladeira e identificadas com nome

e data de coleta. O recolhimento dos coletores foi realizado de forma programada com cada manipulador para que as amostras não ficassem muito tempo armazenadas em geladeira. Essas foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense para análises.

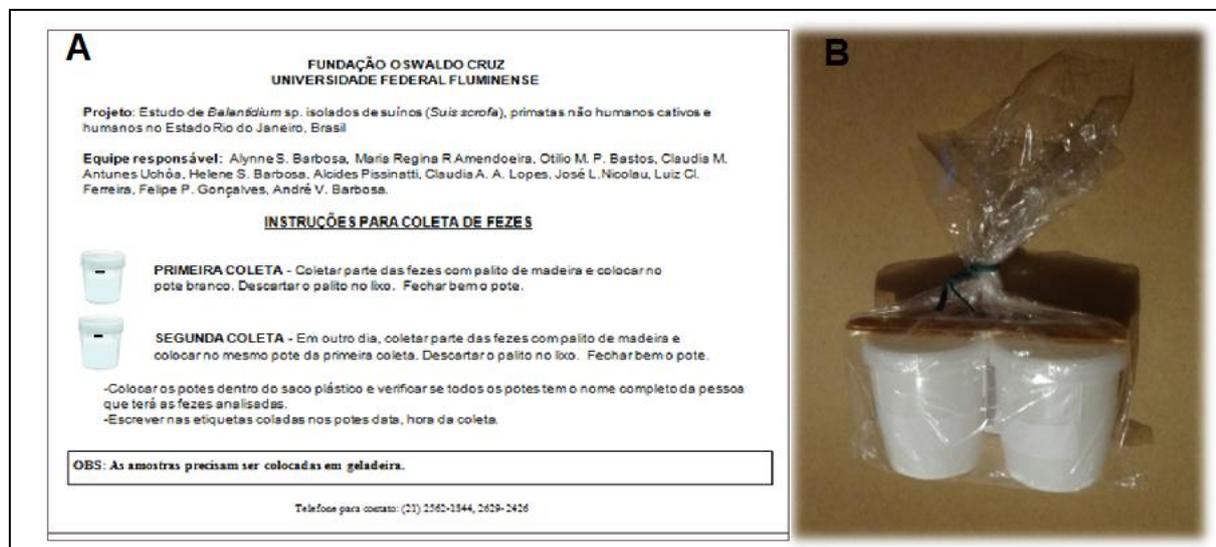


Figura 24. Kit coleta e informe contendo as informações de coleta. Fonte: original do autor.

4.4 Análises Parasitológicas

No laboratório, após cadastro das amostras fecais, uma porção de cada, foi imediatamente processada pelo exame direto. Outra porção da mesma foi homogeneizada em água destilada, sendo então filtrada em tamiz, com gaze dobrada quatro vezes, e transferida para cálice de fundo cônico (Figura 25). O filtrado foi aliqotado em tubos de centrífuga de fundo cônico com volume de 15 mL para a realização das técnicas coproparasitológicas qualitativas que seguem abaixo:

- 7 mL em tubo de centrífuga de fundo cônico para realização da técnica de centrífugo sedimentação de Ritchie (1948) modificada por Young (1979);
- 15 mL em tubo de centrífuga de fundo cônico para realização da técnica de centrífugo flutuação de Faust et al. (1938);
- 15 mL em tubo de centrífuga de fundo cônico para realização da técnica de centrífugo flutuação de Sheather (1923) modificada por Huber et al. (2003);

- 15 mL em tubo de centrífuga de fundo cônico que foram armazenados para estoque;
- Uma parte do filtrado foi deixado sedimentar em cálice de fundo cônico por 24 horas para realização da técnica de Lutz (1919).

A leitura das lâminas obtidas de cada técnica e a fotomicrografia foram realizadas no microscópio óptico binocular Olympus® BX 41, inicialmente, em aumento de 100 vezes e, para confirmação, se necessário, em 400 vezes, acoplado a câmera digital Samsung® SDC415 com *software* de captura Honestech® PVR. Para morfometria das formas evolutivas do parasito foi utilizado o microscópio óptico unocular Olympus® CH30 em 400 vezes com uma ocular micrométrica Olympus® SWH.



Figura 25. Etapa de homogeneização e filtração das amostras fecais. **A** – Amostras fecais de suínos preparadas para etapa de homogeneização. **B** – Amostra fecal de suíno sendo filtrada. **C** – Amostras fecais em triplicata dos primatas não humanos do CPRJ preparadas para homogeneização. Local: Laboratório da Disciplina de Parasitologia – Niterói/RJ. Fonte: original do autor.

4.4.1 Exame direto

O exame direto foi realizado antes da filtração das amostras, no momento em que as mesmas chegavam ao Laboratório de Parasitologia, com o objetivo principal de averiguar a presença de trofozoítos de *Balantidium coli*.

Retirou-se uma pequena porção das fezes de vários pontos tanto da superfície como na profundidade da amostra fecal com auxílio de um bastão de vidro. Esta porção foi depositada em um copo plástico descartável primoutilizado. Com uma pipeta tipo Pasteur descartável, cerca de um mL de solução salina tamponada com fosfato estéril foi adicionada ao material fecal [PBS 0,1M pH=7,2 – NaCl P.A (Vetec®) 8,18g + Na₂HPO₄ P.A (Dinâmica Reagentes Químicos®) 41,051g + NaH₂PO₄.H₂O P.A (Proquímios®) 0,357g] para a eluição do material. Uma gota do homogeneizado foi transferida para uma lâmina de microscopia e, em seguida, uma lamínula (24 x 32 mm) foi colocada sobre o material, procedendo-se à sua leitura ao microscópio.

4.4.2 Técnica de Ritchie (1948) modificada por Young et al. (1979)

Esta técnica tem como fundamento a centrífugo sedimentação e foi utilizada seguindo o protocolo preconizado por Cerqueira (1988). Acrescentou-se aos tubos plásticos cônicos de centrifugação, contendo sete mL do material fecal filtrado, uma gota de detergente (Ypê® neutro) e três mL de acetato de etila P.A. (Vetec®). O material foi centrifugado durante dois minutos a 2000 R.P.M. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se ao sedimento água destilada até completar o volume de sete mL. Após a homogeneização, o material foi, novamente, centrifugado por dois minutos a 2000 R.P.M. O sobrenadante foi descartado e, com uma pipeta do tipo Pasteur primoutilizada, foi colocada uma gota de água destilada no tubo, procedendo-se nova homogeneização. Transferiu-se uma gota desse material para uma lâmina de microscopia, e adicionou-se uma gota de água destilada na lâmina, para facilitar a leitura do material. A lâmina de microscopia foi coberta com lamínula (24 x 32 mm), sendo então realizada a sua leitura ao microscópio.

4.4.3 Técnica de Faust et al. (1938)

Essa técnica baseia-se na pesquisa de formas evolutivas de parasitos por centrifugo flutuação com solução de sulfato de zinco. A amostra no tubo plástico de centrífuga de fundo cônico foi submetida à centrifugação por um minuto a 2500 R.P.M.. O sobrenadante foi descartado, acrescentou-se ao sedimento água destilada até completar 15 mL, homogeneizou-se o material e o mesmo foi, novamente, centrifugado por um minuto a 2500 R.P.M. Esse procedimento foi repetido diversas vezes, até que o sobrenadante ficasse límpido. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado, sendo o sedimento suspenso com solução de sulfato de zinco - $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Proquímios®) com densidade 1,18 g/mL. O material foi homogeneizado e centrifugado por um minuto a 2500 R.P.M., objetivando formar uma película de flutuação. Em seguida, os tubos foram dispostos, cuidadosamente, em estantes. Utilizando-se uma alça de platina dobrada em ângulo de 90 graus, a película de flutuação foi coletada e transferida para lâmina de microscopia, repetindo esse procedimento por quatro vezes. Após as quatro alçadas, cobriu-se o material com uma lamínula (tamanho 22 x 22 mm) e procedeu-se a leitura do material em microscópio.

4.4.4 Técnica de Sheather (1923) modificada por Huber et al. (2003)

Essa técnica apresenta como fundamento a centrífuga flutuação em solução de sacarose com densidade de 1,30 g/mL. No laboratório transferiu-se 15 mL do filtrado da amostra para tubos plásticos de centrífuga de fundo cônico, sendo submetido à centrifugação por 10 minutos a 1500 R.P.M. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em solução saturada de sacarose até o volume de 15 mL, sendo submetido à centrifugação por cinco minutos a 1500 R.P.M. Após esse procedimento, os tubos foram dispostos em estantes e adicionou-se solução de sacarose até a formação de um menisco positivo, sobre o qual foram colocadas lamínulas (22 x 22 mm), que foram deixadas em repouso por três minutos. Em seguida, as lamínulas foram retiradas, cuidadosamente, e depositadas sobre lâminas de microscopia, procedendo à leitura do material ao microscópio.

4.4.5 Técnica de Lutz (1919)

Essa técnica fundamenta-se na sedimentação espontânea das formas evolutivas dos parasitos. Parte do material obtido após a filtração foi depositado em um cálice de fundo cônico com capacidade de 250 mL. Adicionou-se água destilada até completar o volume do mesmo, que foi coberto com filme de PVC transparente e mantido em repouso para sedimentação por 24 horas. Após esse período, com uma pipeta descartável do tipo Pasteur primoutilizada, coletou-se uma alíquota do sedimento e transferiu-se uma gota do mesmo para uma lâmina de microscopia. Essa, foi coberta com lamínula (24 x 32 mm) e, então, foi encaminhada para leitura. Todas as amostras que foram sedimentadas para realização desta técnica foram posteriormente armazenadas em solução conservante de Railliet e Henry, que consiste de 92% de solução salina tamponada, 5% de formaldeído e 3% de ácido acético glacial.

4.4.6. Análise estatística dos resultados parasitológicos

Todos os resultados das técnicas coproparasitológicas foram armazenados em banco de dados do *software* Microsoft Office Excel 2007®. A amostra fecal foi considerada positiva quando foi detectada pelo menos uma forma evolutiva do parasito (trofozoíto ou cisto). A estimativa de prevalência foi realizada dividindo o número de amostras positivas pelo número total de amostras coletadas, sendo estes dados apresentados em porcentagem. Foi utilizado o teste X^2 com o programa estatístico SPSS (versão 11.7, SPSS® Inc., Chicago, IL, 1999) com grau de confiança de 5%, para comparar a positividade parasitária.

Abaixo segue fluxograma resumindo a metodologia empregada para análise coproparasitológica das amostras (Figura 26).

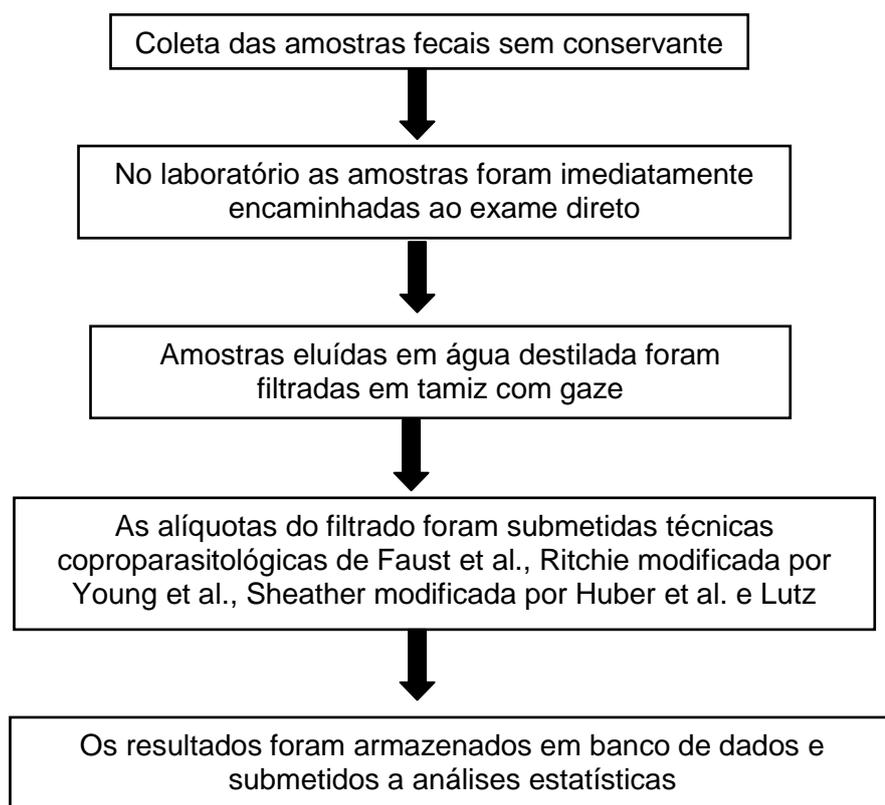


Figura 26. Fluxograma com as etapas de análise coproparasitológica das amostras fecais. Fonte: do autor.

4.5 Isolamento e Manutenção *in vitro* do protozoário

4.5.1 Análise laboratorial e seleção das amostras para isolamento

Imediatamente após o exame direto, as amostras foram selecionadas para isolamento *in vitro* do protozoário. As amostras inoculadas em meio de cultura xênico foram as que, ao exame direto, apresentaram no mínimo, 10 trofozoítos móveis e/ou 30 cistos.

4.5.2 Preparação do meio de cultura

O meio xênico de Pavlova (1938) modificado por Jones (1946) foi utilizado para isolamento. A preparação do meio completo foi constituída de produção do meio base e das soluções estoque de antibióticos. Os reagentes utilizados para produção do meio seguem abaixo.

| Reagente | Marca | Lote | Nome comercial |
|-------------------------------|---------------|-----------|--------------------------------------|
| Hidrogenofosfato de sódio | Sigma | 097K0022 | Sodium phosphate dibasic ACS reagent |
| Diidrogenofosfato de potássio | Sigma | 107K0100 | Fosfato de potássio monobásico |
| Cloreto de sódio | Sigma | SZBB3550V | Cloreto de Sódio |
| Extrato de levedo | Bacto Dickson | 1145652 | Extract of Autolysed Yeast Cells |
| Amido de arroz | Sigma | 031M0052V | Starch from rice |
| Soro Feral Bovino | Cultilab | 009/12 | Soro Fetal Bovino |

- **Meio base**

Na produção do meio base os reagentes listados abaixo foram pesados e homogeneizados em 1000 mL de água destilada, depois a solução foi autoclavada (120°C/20 minutos) e armazenada em temperatura de 4°C.

| | |
|-------------------------------|---------|
| Hidrogenofosfato de sódio | 1,292 g |
| Diidrogenofosfato de potássio | 0,42 g |
| Cloreto de sódio | 7,27 g |
| Extrato de levedo | 1,46 g |

- **Solução estoque de antibióticos**

As soluções estoque dos antibióticos foram produzidas assepticamente com as seguintes concentrações.

- Solução de sulfato de estreptomicina Sigma® lote 58H04421 - Concentração final: 500 µg/mL. Transferida um mL da solução estoque para um litro de meio.
- Solução de penicilina G potássica Sigma® lote BCBH0719V - Concentração final: 1000 UI/ mL. Transferida um mL da solução estoque para um litro de meio.

- **Meio Completo**

- Acrescentou 5% de soro fetal bovino inativado e estéril para cada um litro de meio base estéril;
- Adicionou ao meio completo as soluções de antibióticos, penicilina e estreptomicina conforme concentrações acima descritas;
- 10 mL de meio foi distribuído, assepticamente, em tubo de ensaio de vidro (20mm x 150 mm) com tampa rosqueável;

4.5.3 Isolamento in vitro das cepas de *Balantidium coli*

As amostras fecais selecionadas que apresentavam somente o parâmetro para cistos foram eluídas em PBS e filtradas em tamiz coberto com gaze contendo quatro dobras. O filtrado foi transposto para dois tubos de fundo cônico com 15 mL, centrifugado

a 1500 R.P.M por cinco minutos sendo, posteriormente, o sobrenadante descartado. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em solução salina e novamente centrifugado.

Esse procedimento de lavagem do material foi realizado por três vezes consecutivas. Após esta etapa, 500 µL do sedimento foi inoculado no meio de cultura. Na amostra que possuía apenas trofozoítos, o inóculo foi produzido a partir de 240 µL de fezes eluídas em solução salina estéril. Os dois procedimentos de isolamento foram utilizados quando as amostras apresentavam parâmetros para trofozoítos e cistos. A inoculação foi sempre realizada em duplicata, com dois tubos contendo 10 mL de meio Pavlova modificado, que foram mantidos verticalmente em estufa microbiológica à 36°C. Os tubos foram examinados após 24 horas de incubação, sendo retirados 60 µL de seu sedimento, que foi depositado em lâmina de microscopia coberta com lamínula 24 X 32 mm. A leitura da lâmina foi realizada em microscópio Olypums® BX41 com aumento de 100 vezes. Nos cultivos onde foi visualizado trofozoítos móveis, parte de seu sedimento (500 µL) foi transposto para tubo contendo meio novo e fresco. Tubos negativos, sem trofozoítos em movimentação, foram reincubados por 24 horas e, posteriormente verificados. Nestes casos, o procedimento de verificação e incubação foi realizado por três vezes, período máximo de 72 horas, sendo ao final, se negativo, o material descartado. Considerou-se isolamento, quando havia, trofozoítos móveis nesta etapa de verificação.

Segue o fluxograma resumido do procedimento de isolamento (Figura 27).

- **Suspensão de amido de arroz estéril**

No momento da inoculação para o isolamento do protozoário, assim como para cada subcultivo de manutenção, foi acrescentada 60 µL de suspensão de amido de arroz estéril nos tubos contendo meio novo e fresco.

O amido de arroz foi esterilizado sob quatro ciclos em estufa de secagem a 100°C por uma hora e resfriamento a temperatura ambiente por 15 minutos. Para esterilização, um grama do amido foi pesado e distribuído em tubos de ensaio de vidro de tampa rosqueável, que foram frouxamente vedados e dispostos na estufa em posição horizontal. Após a esterilização, as tampas foram apertadas e os tubos com amido foram armazenados em temperatura ambiente. No momento do uso, um grama do amido estéril foi suspenso em 10 mL de meio Pavlova modificado, sendo armazenado sob refrigeração a 4°C.

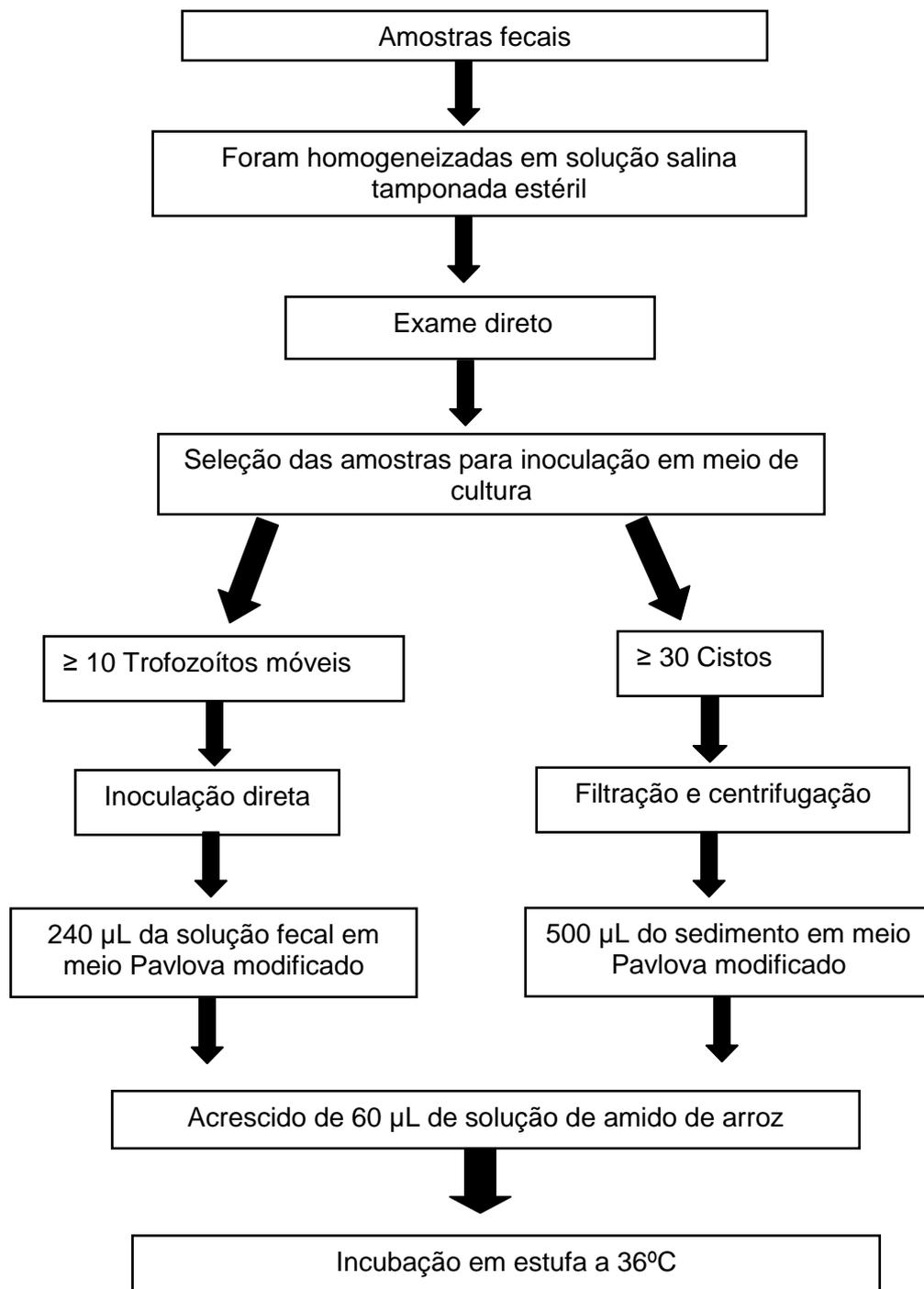


Figura 27. Fluxograma com as etapas de isolamento em meio de cultura Pavlova modificado.
Fonte: do autor

4.5.4 Manutenção *in vitro* das cepas de *Balantidium coli*

Cepas que foram submetidas à subcultivos subsequente ao do isolamento foram admitidas em manutenção. Inicialmente, as culturas com trofozoítos móveis foram mantidas com intervalos de 24 horas. Após o oitavo ao décimo repasse, ou seja, quando não havia mais a presença de detritos fecais, o tempo de subcultivo foi alongado para intervalos de 48 horas.

4.6 Avaliação do comportamento das cepas em diferentes meios de cultura xênicos

Trofozoítos em manutenção no meio Pavlova modificado foram submetidos a avaliação de comportamento em três meios xênicos distintos. No próprio meio Pavlova (1938) modificado por Jones (1946) onde o protozoário foi isolado e também nos meios xênicos TYSGM-9 - Trypticase Yeast Extract Serum Gastric Mucin (Diamond, 1982) e LES - Locke-Egg-Serum (Boeck e Drbohlav, 1925) (Figura 28). Para o estudo do comportamento nesses meios de cultura, as cepas foram mantidas em diferentes tempos de incubação, sendo ao final analisadas por contagem em lâmina de microscopia. As contagens foram sempre realizadas em microscópio óptico unioocular Olympus® CH30, com aumento de 100 vezes.



Figura 28. Tubos de ensaio com tampa rosqueável com os meios xênicos, em duplicata, da esquerda para direita: meio Pavlova (1938) modificado por Jones (1946), LES (Boeck e Drbolav, 1925) e TYSGM-9 (Diamond, 1982). Fonte: do autor.

4.6.1 Preparação dos meios de cultura

O meio xênico Pavlova modificado foi preparado conforme realizado no item de isolamento que segue descrito no tópico 4.5.2. Os passos para a produção dos demais meios xênicos seguem abaixo.

4.6.1.1 Trypticase Yeast Serum Gastric Mucin (TYSGM-9) Diamond (1982)

A preparação do meio completo de TYSGM-9 segue as seguintes etapas: caldo nutritivo e solução Tween 80 a 0,5%. Para produção do meio completo foram utilizados os seguintes reagentes, que seguem abaixo.

| Reagente | Marca | Lote | Nome comercial |
|-------------------------------------|---------------|-------------|----------------------------------|
| Caseína digesto de peptona | Himedia | 125654 | Casein Enzyme Hydrolysate Type I |
| Extrato de levedo | Bacto Dickson | 1145652 | Extract of Autolysed Yeast Cells |
| Cloreto de sódio | Sigma | SZBB3550V | Cloreto de sódio |
| Hidrogenofosfato dipotássico anidro | Sigma | BCBC3668V | Fosfato de potássio dibásico |
| Diidrogenofosfato de potássio | Sigma | 107K0100 | Fosfato de potássio monobásico |
| Mucina gástrica | Sigma | 081M1507V | Mucina de estômago porcino |
| Tween 80 | Sigma | BCBG4436V | Tween 80 |
| Amido de Arroz | Sigma | 031M0052V | Starch from rice |
| Soro Fetal Bovino | Cultilab | 009/12 | Soro Fetal Bovino |

- **Caldo nutritivo**

Para a produção do caldo nutritivo, o cloreto de sódio, hidrogenofosfato dipotássico anidro e diidrogenofosfato de potássio foram dissolvidos em 600 mL de água destilada. Foram adicionados os reagentes remanescentes na ordem apresentada: caseína de digesto de peptona e extrato de levedo e no final foi completado o volume com água destilada para 970 mL. Este caldo foi armazenado a -20°C (sem esterilização).

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Caseína digesto de peptona | 2 g |
| Extrato de levedo | 1g |
| Cloreto de sódio | 7,5 g |
| Hidrogenofosfato dipotássico anidro | 2,8 g |
| Diidrogenofosfato de potássio | 0,4 g |

- **Solução de Tween 80 a 5%**

Foram dissolvidos cinco gramas de Tween 80 em 95 mL de água destilada. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm de porosidade com filtros descartáveis Corning®, sendo posteriormente, armazenada a -20°C.

- **Solução estoque de antibióticos**

As soluções estoque dos antibióticos foram produzidas assepticamente com água destilada estéril com as seguintes concentrações:

- Solução de sulfato de estreptomicina Sigma® lote 58H04421: Concentração final: 200 µg/mL. Retirar um mL da solução estoque e adicionar em 97 mL de caldo nutritivo.
- Solução de Penicilina: Concentração 200 UI/mL Sigma® lote BCBH0719V. Retirar um ml para 97 mL de caldo nutritivo.

- **Meio completo**

- Foi distribuído 200 mg de mucina gástrica porcina em 97 mL do caldo nutritivo, e posteriormente esta solução foi autoclavada a 120°/20 minutos para solubilização da mucina e esterilização do meio;

- Após a esterilização foi adicionado três mL de soro fetal bovino inativado e estéril e 0,05 mL da solução Tween 80 a 5%;
- Foi adicionado ao meio completo as soluções de antibióticos, penicilina e estreptomicina, conforme concentrações acima descritas;
- Foi distribuído oito mL do meio, assepticamente, em tubos de ensaio de vidro (20mm x 150 mm) com tampa rosqueável;

- **Suspensão de amido de arroz estéril**

Foi pesado um grama de amido de arroz, que posteriormente foi esterilizado a seco (conforme realizado no isolamento e manutenção) e suspenso assepticamente em 10 mL de PBS nº 8. Esta suspensão foi armazenada a 4°C até o momento do uso.

- **Solução tamponada de fosfato pH = 7,2 (PBS nº8)**

Os reagentes descritos abaixo foram diluídos em 1000 mL de água destilada. Após a homogeneização a solução foi autoclavada 121°C/15 minutos e armazenada em refrigerador (4°C).

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Cloreto de sódio | 9,5 g |
| Hidrogenofosfato dipotássico anidro | 3,7 g |
| Diidrogenofosfato de potássio | 1,1 g |

4.6.1.2 Meio Locke-Egg-Serum (LES) Boeck e Drbohlav (1925)

A preparação do meio completo LES segue com a produção: da solução de Locke e produção da base sólida. Para produção do meio completo foram utilizados os seguintes reagentes:

| Reagente | Marca | Nº de lote | Nome comercial |
|--------------------------------------|------------|-----------------------|-----------------------------|
| Cloreto de sódio | Sigma | SZBB3550V | Cloreto de Sódio |
| Hidrogenocarbonato de sódio | EMSURE | K40937129 | Hidrogenocarbonato de sódio |
| Cloreto de potássio | Vetec | 1001232 | Cloreto de potássio PA. ACS |
| Cloreto de cálcio | Proquimios | 870054 | Cloreto de cálcio PA |
| Glicose | Vetec | 1008597 | Glucose Anidra (Dextrose) |
| Alcool etílico 70% | Impex | SAF11/12 ^a | Alcool etílico |
| Ovos de galinha tipo A Grande Branco | Sem marca | Sem lote | Ovo |
| Soro Fetal Bovino | Cultilab | 009/12 | Soro Fetal Bovino |
| Amido de Arroz | Sigma | 031M0052V | Starch from rice |

- **Solução de Locke**

Os reagentes para preparação da solução de Locke foram pesados e homogeneizados em 1000 mL de água destilada, depois a solução foi autoclavada (121°C / 20 minutos) e armazenada em temperatura a 4°C.

| | |
|-----------------------------|-------|
| Cloreto de sódio | 9g |
| Hidrogenocarbonato de sódio | 0,2 g |
| Cloreto de potássio | 0,4 g |
| Cloreto de cálcio | 0,2 g |
| Glicose | 2,5 g |

- **Base do meio inclinado**

- Cascas de quatro ovos frescos foram limpas com álcool a 70%. Os ovos foram quebrados e o conteúdo foi colocado em frasco estéril com pérolas de vidro;
- Foi adicionado à mistura 50 mL da solução de Locke. Depois o frasco foi agitado até a completa homogeneização;
- Quatro mL desta solução foi distribuída em cada tubo de ensaio de vidro (20mm x 150 mm) com tampa rosqueável;
- Os tubos foram postos em posição inclinada em estufa à temperatura de 70°C até que a porção inclinada do meio se solidificasse. Posteriormente, os tubos com meio solidificados foram autoclavados (121°C/20 minutos). Após a autoclavação foram desprezados aqueles que apresentavam rachaduras na porção inclinada do meio;

- **Meio completo**

- Foi preparada uma mistura com oito partes de solução de Locke e uma parte de soro fetal bovino inativado e esterilizado.
- Cobriu-se a inclinação do meio do ovo com oito mL de solução de Locke.

- **Suspensão de amido de arroz estéril**

Foi pesado um grama de amido de arroz, que posteriormente foi esterilizado a seco (conforme realizado no isolamento e manutenção) e suspenso asépticamente em 10 mL de solução de Locke. Esta suspensão foi armazenada a 4°C até o momento do uso.

4.6.2 Produção de massa parasitária

Para produção do inóculo, os trofozoítos do parasito foram submetidos a etapa de expansão quantitativa (aumento do número de células parasitárias). Passagens sucessivas com intervalos de 24 horas foram realizadas durante três dias consecutivos, aumentando assim o número de subculturas, garantindo, desta forma, o inóculo necessário para todos os tubos.

4.6.3 Produção do inóculo

O inóculo foi produzido a partir da retirada de 1,5 mL do botão de amido (amido de arroz que fica precipitado no tubo) de vários tubos de cultivos produzidos do mesmo isolado mantida em meio Pavlova modificado. A massa de vários tubos foi reunida em tubo de centrífuga estéril de 50 mL, deste foi retirado um mL, que foi transferido para microtubo tipo Eppendorf. Este material foi homogeneizado, sendo posteriormente transferido 50 µL desta suspensão parasitária para outro microtubo tipo Eppendorf, adicionando 5 µL de solução formalina tamponada a 2%, totalizando 55 µL de solução. Este volume foi dividido em duas lâminas de microscopia (27,5 µL para cada lâmina) cobertas com lamínulas 24 mm x 32 mm, sendo realizada leitura em grega para contagem dos trofozoítos (Figura 29). Para garantia dos resultados, esta contagem foi sempre repetida sendo produzidas mais duas lâminas de microscopia (27,5 µL para cada lâmina).



Figura 29. Esquema de leitura em grega da lâmina de microscopia. Fonte: do autor.

Após a contagem o valor do número total de trofozoítos foi inserido na fórmula abaixo, para obtenção do número de células por mL:

$$\text{Nº de trofozoítos/mL} = [(Contagem L1 + Contagem L2) / 2 + (Contagem L3 + Contagem L4) / 2] \times \text{Fator de correção (x20)}$$

Após a obtenção do número de trofozoítos por mL foi, então estimado, a alíquota necessária, para a produção do inóculo padrão de 500 células parasitárias.

A alíquota produzida foi inoculada em duplicatas de tubos de ensaio de vidro (20 mm x 150 mm) com tampa rosqueável, contendo os meios:

- TYSGM-9, Trypticase Yeast Extract Serum Gastric Mucin;
- LES, Locke-Egg-Serum Locke-Egg-Serum;
- Pavlova modificado por Jones;

No momento da inoculação foi acrescentada uma gota das suspensões de amido de arroz produzida para cada meio de cultura. Após a inoculação os tubos foram incubados em estufa microbiológica à temperatura de 36°C.

4.6.4 Avaliação do comportamento do protozoário

Após o período de 24, 48, 72 e 96 horas, foram transferidas alíquotas de um mL do fundo do tubo de ensaio contendo os meios TYSGM-9, LES e Pavlova modificado para microtubos do tipo Eppendorf. Essa solução foi homogeneizada e 50 µL foram transferidos para outro microtubo tipo Eppendorf, ao qual foram adicionados 5 µL de solução formalina tamponada a 2%, totalizando 55 µL. Esse volume foi dividido em duas lâminas de microscopia (27,5 µL) cobertas com lamínulas 24 mm x 32 mm para realização da contagem em grega das lâminas. Na leitura foi obtido o número de trofozoítos por mL. Para garantia dos resultados, esta contagem foi sempre repetida, sendo produzidas mais duas lâminas de microscopia (27,5 µL para cada lâmina).

4.6.5 Análise dos resultados

As cepas foram consideradas em crescimento quantitativo (fase log), quando a quantidade de trofozoítos ultrapassou a quantidade inoculada (500 trofozoítos/mL). Foi considerada em manutenção, quando não era evidenciada nenhuma contagem negativa. Os dados obtidos pela contagem dos trofozoítos das cepas de suínos e de *Cynomolgus* foram armazenados em banco de dados do *software* Microsoft Office® Excel versão 2007, a partir dos quais foram confeccionadas as tabelas. Para produção dos gráficos foi utilizado o *software* GraphPad Prism® 6.

Segue fluxograma explicativo da metodologia empregada para avaliação do comportamento do parasito (Figura 30).

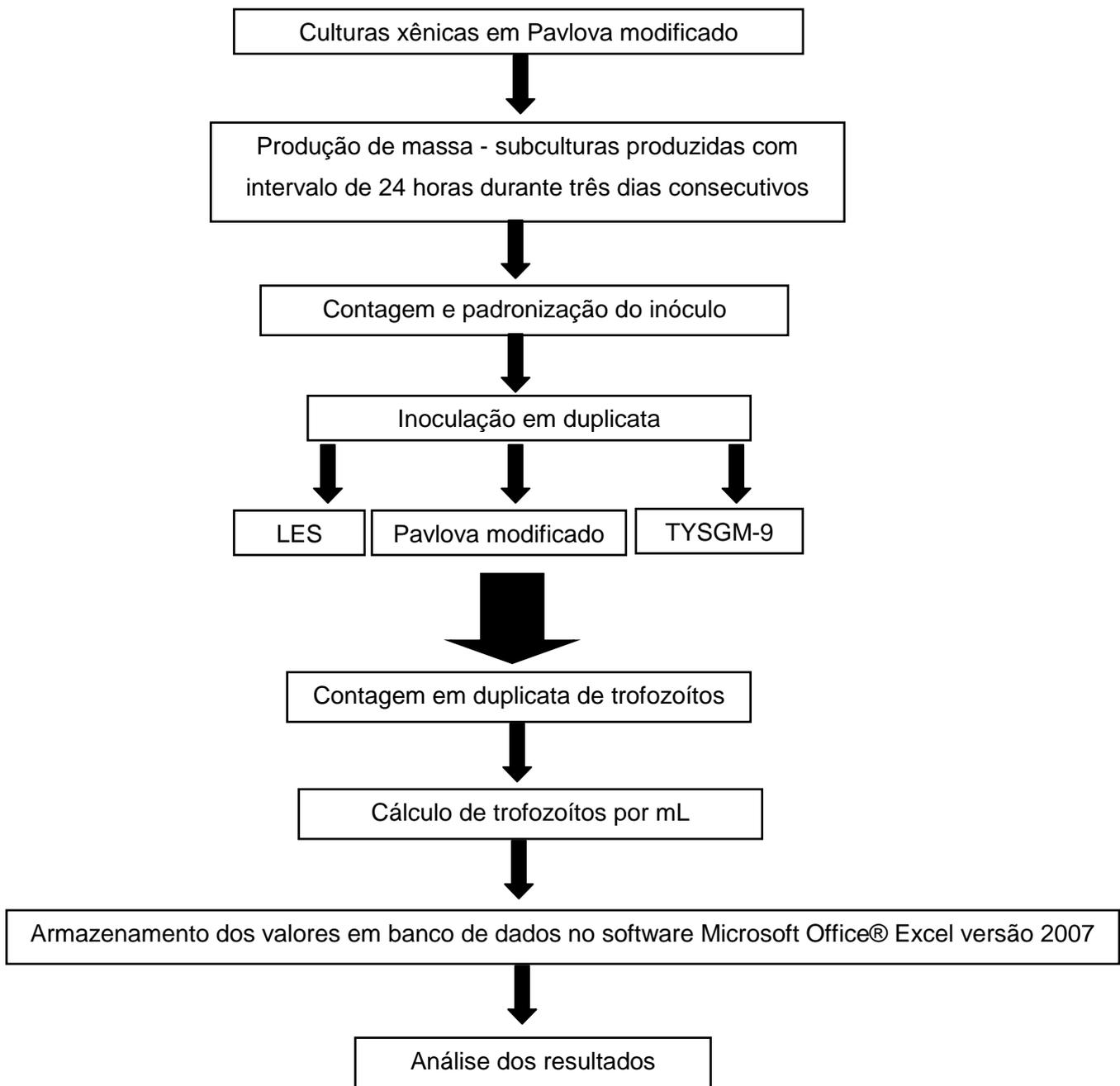


Figura 30. Fluxograma de metodologia aplicada para avaliação do comportamento de isolados de *Balantidium coli* de primatas não humano e suínos mantidos em três diferentes meios sob várias tempos de incubação. Fonte: do autor.

4.7 Análise Molecular

Isolados de *Balantidium coli* em manutenção, foram submetidas à caracterização molecular no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015. Esta etapa do estudo foi realizada na Universidade Complutense de Madrid, por meio do programa Ciências sem fronteiras do CNPq. Foram submetidas à caracterização todas as cepas que se mantiveram viáveis por longo prazo, totalizando 40. Destas, 30 foram isoladas de suínos (*Sus scrofa*) e 10 de Cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Mesmo não sendo objetivo da tese, também foi submetido a estudo molecular 34 amostras fecais positivas para *Balantidium* sp., sendo oito amostras de suínos, 18 de Rhesus (*Macaca mulatta*) e oito de Cynomolgus.

4.7.1 Preparação das amostras para envio Brasil – Espanha

Todas as amostras, tanto os isolados em cultivo, quanto as fezes foram encaminhadas do Brasil para Espanha em microtubos de dois mL do tipo Eppendorf fixadas em álcool 70% ultrapuro Merck® (Lote: K44647780). As cepas em duplicata foram submetidas a três subcultivos com intervalos de 48 horas, totalizando seis tubos de cultivos. Destes foram retirados 1,5 mL do sedimento de cada tubo de cultivo que foi reunido em um tubo de 15 mL de fundo cônico. Este material foi então centrifugado a 2000 R.P.M por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o material foi ressuscitado em solução salina tamponada estéril, sendo novamente centrifugado. Ao final, o *pellet* foi transposto para o microtubo do tipo Eppendorf de dois mL, sendo completado o volume com álcool a 70% na proporção de 1:3.

Das amostras fecais que estavam armazenadas em tubos de fundo cônico a 4°C foi retirado 500 µL do sedimento. Este foi transposto para microtubos do tipo Eppendorf de dois mL, sendo então o volume completado com 1,5 mL de álcool a 70%, na proporção de 1:3.

4.7.2 Extração de DNA das amostras em cultivo

Para extração do DNA das amostras em cultivo foi realizado o seguinte procedimento:

- 100 µL da amostra foi transposto para microtubos do tipo Eppendorf de 0,5 mL;
- A alíquota foi centrifugada a 13000 R.P.M por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado;
- O *pellet* foi ressuspenso em 200 µL de solução salina tamponada que foi novamente submetido a centrifugação a 13000 R.P.M por 30 segundos. Esta etapa foi realizada por três vezes, para retirada total do álcool a 70%;
- Após a lavagem foi adicionado: 37,5 µL de água ultrapura e 4,2 µL de tampão de lise (lysis buffer) (10mM Tris-HCL pH 8,3; 50 mM HCl, 1,5 mM MgCL₂; 0,01% (p/V) Biotools® Reaction buffer.
- Microtubo foi incubado em termociclador (Mastercycler Gradient 5331 thermocycler – Eppendorf®) em “Programa Lybio”;
- Programa Lybio
 - Fase de inativação: Incubação com tampão de lise e água, 95°C por 15 minutos;
 - Após a incubação adicionou-se 3,3 µL de proteinase K (Proteinase K from Tritirachium Album, Sigma Aldrich®, Lote: P2308 – 100 mg), o microtubo continuou a incubação no termociclador na temperatura de 65°C por três horas. Nesta etapa a proteinase K realizou a digestão de proteínas, remoção de contaminantes, inclusive das nucleases;
 - Passado a digestão, a temperatura se elevou a 95°C, seguindo por 15 minutos para inativação da proteinase K;
 - Após esta etapa a temperatura diminui até 4°C e o DNA extraído foi estocado a 0°C;

A solução mixer da reação de extração do DNA parasitário foi preparada com:

12,5 µL de água ultrapura x 3 = 37,5 µL

1,4 µL de tampão de amplificação de PCR 10X x 3 = 4,2 µL

1,1 µL proteinase K x 3 = 3,3 µL

15 µL volume total x 3 = 45 µL

4.7.3 Extração de DNA das amostras de fezes

- As amostras fecais também foram submetidas à centrifugação para lavagem e esgotamento do álcool 70%, assim como foi realizado nas amostras de cultivo;
- Após a remoção do álcool a 70%, 500 µL da amostra e um mL de solução salina tamponada foram transferidas para vidro de relógio;
- Com o auxílio de uma pipeta Pasteur e um microscópio estereoscópico Olympus® foi realizada a coleta de cistos sob aumento de 100 a 200X;
- Estes foram depositados em microtubos do tipo Eppendorf, sendo, em média coletados 30 cistos de cada amostra. Todos os microtubos foram incubados, *overnight*, a 37°C em termobloco, para evaporação total de possível álcool remanescente na amostra;
- Após a evaporação do álcool, os cistos foram submetidos a três ciclos de choque térmico: um minuto em nitrogênio líquido (Figura 31 A-B) seguido de dois minutos em água aquecida a 70°C;
- Após o choque térmico foi adicionado ao tubo: 4,2 µL de tampão de lise (lysis buffer) (10mM Tris-HCL pH 8,3; 50 mM HCl, 1,5 mM MgCL₂; 0,01% (p/V) gelatina) Biotools® Reaction buffer e completado o volume até 41 µL com água ultrapura;
- Microtubo foi incubado em termociclador (Mastercycler Gradient 5331 thermocycler – Eppendorf®) em “Programa Lybio”;
- Programa Lybio
 - Incubação com tampão de lise e água: 95°C por 15 minutos;
 - Após a incubação adicionou-se 3,3 µL de proteinase K (Proteinase K from Tritirachium Album, Sigma Aldrich®, Lote: P2308 – 100 mg), o microtubo continuou em incubação no termociclador na temperatura de 65°C por três horas. Nesta etapa a proteinase K realiza a digestão de proteínas, remoção de contaminantes, inclusive das nucleases;
 - Passado a digestão, a temperatura se elevou a 95°C, seguindo por 15 minutos para inativação da proteinase K;
 - Após esta etapa a temperatura diminui até 4°C e o DNA extraído foi estocado a 0°C.

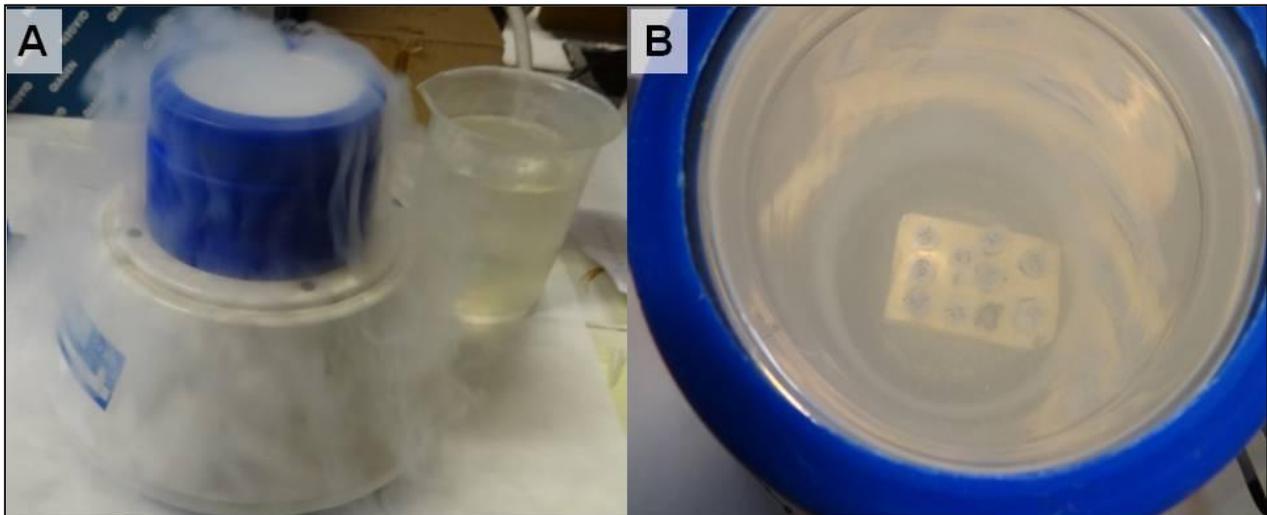


Figura 31. A. Amostras de fezes em nitrogênio líquido B. Etapa de extração de DNA das amostras de fezes. Fonte: do autor.

4.7.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

As amostras estocadas a 0°C foram submetidas à reação de polimerase em cadeia com o master mixer Illustra™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare®) (Figura 32A).

Para realização desta etapa seguiu-se o seguinte procedimento:

- A capela de fluxo foi desinfetada com álcool a 70% e foi deixada sob esterilização por 15 minutos em lâmpada ultravioleta;
- Foi adicionado ao microtubo contendo o master mixer:
 - dois µL primer forward B58D (5' GCTCCTACCGATACCGGGT 3');
 - dois µL primer reverse B58RC (5' GCGGGTCATCTTACTTGATTTTC 3');
 - três µL de DNA molde;
 - cinco e meio µL de água nuclease free;

Os primers utilizados amplificam a região ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 (Ponce Gordo et al., 2008).

- Os microtubos foram encaminhados ao termociclador (Mastercycler Gradient 5331 thermocycler – Eppendorf®) (Figura 32B), onde foi selecionado o “Programa RNA 60”: A reação de amplificação foi conduzida por 31 ciclos, com os binômios de temperatura e tempo que seguem abaixo:
 - 94°C – 10 minutos. Temperatura de ativação da polimerase.
 - 94°C – 1 minuto. Temperatura de desnaturação.
 - 60°C – 1 minuto. Temperatura de anelamento.
 - 72°C – 1 minuto de extensão.
 - Extensão final – 72°C – 5 minutos.
- A reação finalizou e a temperatura diminui para 4°C;
- O produto final da reação de 500 pb de base foi visualizado no gel de agarose;
- O gel de agarose foi produzido na concentração de 1% (TAE 1X Tris- EDTA - ácido acético.
- Eletroforese foi realizada utilizando dois μL de DNA molde e uma gota do azul de bromofenol (peso da amostra) e 1,5 μL do peso molecular DNA Ladder de 1 kb Intron bio®;
- Após a eletroforese o gel foi submetido à revelação em brometo de etídio.

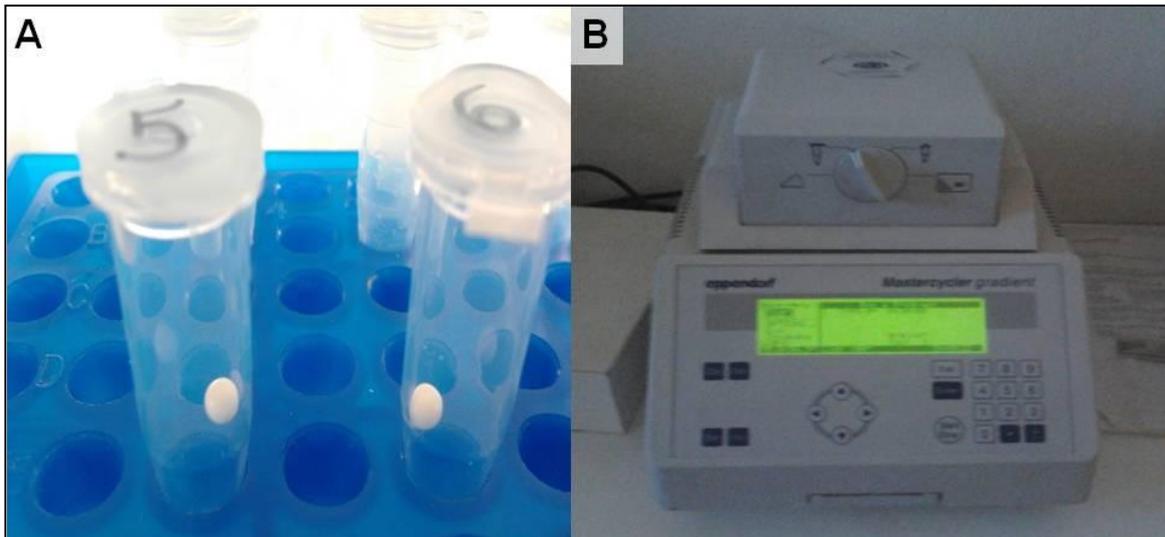


Figura 32. A. Master mixer Pure Taq ready to go PCR beads. B. Termociclador com tubos da reação de PCR. (Fonte: do autor).

4.7.5 Purificação do DNA amplificado

Nesta etapa foi utilizado o *kit* de purificação da Megaquick-spin™ Total Fragment DNA purification Intron® (Lote 15170346) (Figura 33A). A purificação das amostras de cultivo foi realizada diretamente do produto final da PCR, que demonstrou no gel agarose bandas evidentes, com 500 pb, sem o aparecimento de produtos inespecíficos.

A purificação seguiu o seguinte procedimento:

- Todo o produto de PCR amplificado foi eluído com 500 µL do tampão de limpeza BNL, que tem como objetivo retirar os resquícios de sais da PCR e nucleotídeos.
- Todo o produto de DNA eluído no tampão foi transferido para uma coluna, que contém uma membrana de sílica;
- O material foi centrifugado a 13000 RPM por um minuto, assim o DNA ficou aderido na coluna e o tampão com as impurezas foi descartado;
- Nesse tubo contendo a coluna foi adicionado 700 µL de tampão de lavagem. Este contém álcool, que ajuda a purificar o DNA. Novamente o tubo foi submetido à centrifugação por 13000 RPM por um minuto.
- A coluna então foi transferida para um microtubo estéril de 1,5 µL, sendo adicionado 50 µL de água *nuclease free* (Lote 1304172) Ambion®, sendo os tubos novamente centrifugados;
- A coluna, então, foi descartada e cinco µL do produto purificado foram depositados em gel de agarose a 1% para realização da eletroforese (Figura 33B). O gel foi corado com brometo de etídeo, sendo o produto purificado observado em transiluminador para confirmação da presença do DNA purificado.
- Após a purificação o material foi encaminhado para plataforma de sequenciamento, onde foi depositado do sequenciador ABI PRISM® 3730 DNA, sendo utilizado o primer forward B58D (Applied Biosystems, USA).

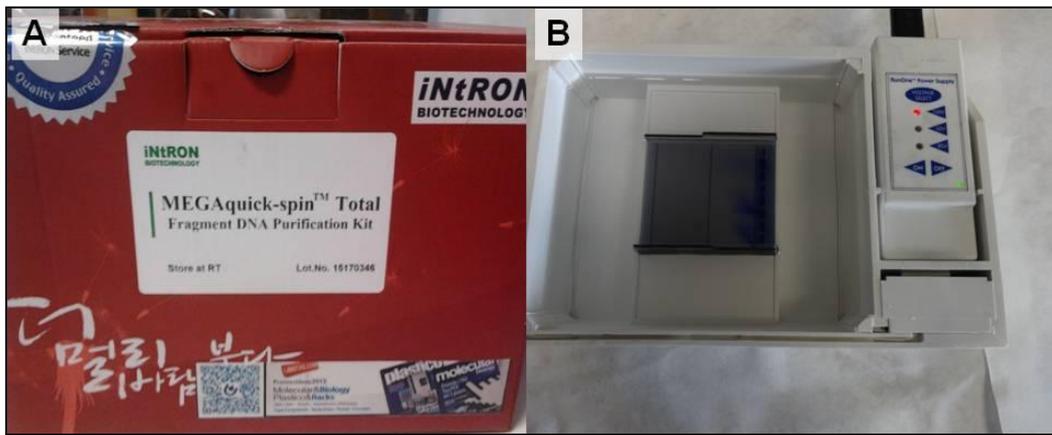


Figura 33. A. Kit para purificação das amostras de DNA. **B.** Eletroforese dos produtos de DNA purificados. Fonte: do autor.

4.7.6 Análises das sequências

As sequências foram visualizadas e editadas utilizando o *software* ChromasPro® versão 1.7.5 (Technelysium Pty.Ltd.). Após a edição, as sequências foram alinhadas com método ClustalW com os *softwares* 4Sale versão 1.7. (Seibel et al., 2008) e Mega® versão 6.06, utilizando sequências referência do Genbank, que estão descrito abaixo. A sequências alinhadas foram exportadas para o MegAlign (Lasergen DNASTAR®) versão 12.2.

O *software* 4Sale também foi utilizado para edição das estruturas secundárias das sequências consenso. Tais estruturas foram, posteriormente, prescritas com o RNAalifold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAalifold.cgi>) (Bernhart et al., 2008; Gruber et al., 2008). Ao final os modelos dessas estruturas foram desenhados com RNAviz 2.0 (de Rijk et al., 2003).

Para o alinhamento, criação da raiz e análise das variantes foram utilizadas as seguintes sequências referências dos ciliados *Isotricha prostoma* [Genbak: AF045031.1] que foi analisado a partir de fezes de bovinos e ovinos de dois continentes, Oceania e Americano (Wright, 1999), *Troglodytella abressarti* [EU680314.1] estudadas em fezes de gorilas e chimpanzés de zoológico na República Tcheca e Austrália (Modrý et al., 2009), *Balantidium coli* variante B de fezes de suínos mantidos em criação da Universidade Autónoma de Madrid, Espanha [Genbak: AM982725] (Ponce Gordo et al., 2008), variante B de gorila do Zoológico de Madrid, Espanha [Genbank: JF444761] (Ponce Gordo et al., 2011), variante A de chimpanzé, República Tcheca [Genbak: JQ073353] (Pomajbikova et

al., 2013), variante A evidenciada em amostra de fezes de uma paciente humano da Bolívia [Genbak: JF444758] (Ponce Gordo et al., 2011).

Relações genéticas entre isolados de *Balantidium coli* inferidas pelo algoritmo Maximum Likelihood (ML) utilizando o modelo Tamura 3-parâmetro com base nas sequências do gene RNAr, fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2.. A distribuição gamma GTR model foi utilizado para modelar diferenças de taxas evolutivas. A árvore foi enraizada pelos ciliados *Isotricha prostoma* [Genbak: AF045031.1] e *Troglodytella abrassarti* [EU 680314.1]. Os números associados aos ramos referem-se aos valores de *bootstraps* para 1000 replicações, sendo considerados *bootstraps* acima de 50%. O primeiro valor foi realizado pelo algoritmo ML e o segundo pelo Neighbor-joining (NJ).

4.8 Ultraestrutura

Por meio de metodologias de microscopia de fluorescência e eletrônica uma cepa de suíno e outra de *Cynomolus* foram analisadas. Trofozoítos mantidos em meio Pavlova modificado com 48 horas de incubação foram processados como de rotina para análise morfológica.

4.8.1 Processamento de material biológico para Microscopia de fluorescência

- 1 mL do cultivo em meio Pavlova modificado foi transferido para um vidro de relógio contendo três mL de solução salina;
- Com o auxílio de uma pipeta Pasteur e um microscópio estereoscópico Diag Tech XTL 6445® foi realizada a coleta dos trofozoítos com aumento de 100 a 200X;
- Ao final, foram isolados 500 trofozoítos em cada um dos dois tubos de centrifuga de 15 mL;
- Os tubos foram submetidos à centrifugação de 2000 R.P.M por 10 minutos. Este procedimento de lavagem foi repetido por três vezes;
- As culturas foram fixadas em paraformaldeído (PFA) a 4% por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida, lavadas três vezes em solução salina tamponada (PBS) por 10 minutos;

- Para permeabilização da membrana dos trofozoítos foi utilizada a solução PBS + 4% BSA + Triton X-100 a 0,5%. Esta etapa foi realizada 3 vezes por 10 min, seguida de lavagem PBS + BSA 4%;
- Para revelação de microtúbulos os parasitos foram incubados com o anticorpo primário anti- β -tubulina, na concentração de 1:200 em solução de PBS + 4% BSA, por uma hora a 37°C, seguida da lavagem em PBS + 4% BSA 3 vezes por 10 minutos;
- Incubação com o 2° anticorpo Alexa Fluor 488 diluído 1:1000 em PBS/ 4% BSA por 1 hora a 37°C, seguida da lavagem em PBS + BSA 4% - 3 vezes por 10 min;
- As lâminas foram montadas com Prolong gold contendo DAPI (4',6 - diamino-2-pfenilindol), seladas com esmalte e conservadas a 4°C;
- A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência AXIO Image A.2 Zeiss® e as fotomicrografias foram obtidas em aumento de 1000X com câmera digital Axio Cam MRC;
- A edição das fotos foi realizada com o software Adobe® Photoshop CS3.

4.8.2 Preparação do material para Microscopia eletrônica

- Um mL do cultivo em meio Pavlova modificado foi transferido para um vidro de relógio contendo três mL de solução salina;
- Com o auxílio de uma pipeta Pasteur e um microscópio estereoscópico Diag Tech XTL 6445® foi realizada a coleta dos trofozoítos com aumento de 100 a 200X;
- Ao final, foram isolados 500 trofozoítos em cada um dos dois tubos de centrifuga de 15 mL;
- Os tubos foram submetidos à centrifugação de 2000 R.P.M por 10 minutos. Este procedimento de lavagem foi repetido por três vezes;
- O *pellet* foi fixado por uma hora em solução de 2,5% glutaraldeído em 0,1M tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% sacarose e 2,5 mM CaCl₂ (pH 7.2);
- Os *pellets* foram então, submetidos a três etapas de lavagens em 0,1M de tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% sacarose e 2,5 mM CaCl₂. Etapa de lavagem realizada por meio de centrifugação a 2000 R.P.M por 10 minutos;

4.8.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão

- O material foi pós-fixado por uma hora, a temperatura ambiente, com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, diluído em 0,1 M do mesmo tampão;
- Lavados em três ciclos de centrifugação a 2000 R.P.M por 10 minutos no mesmo tampão;
- Desidratados em série crescente de acetona:
 - acetona 30% - uma hora
 - acetona 50% - uma hora
 - acetona 70% - uma hora
 - acetona 90% - uma hora
 - acetona 100% - uma hora por três vezes
- Emblocados em resina epon (Polybed 812);
- Polimerizados por 3 dias em estufa a 60°C;
- Cortes ultrafinos foram obtidos e contrastados em acetato de uranila e citrato chumbo;
- A leitura do material foi realizada em microscópio eletrônico Jeol JEM-1011 da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz (IOC – Fiocruz).

4.8.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

- O material foi pós-fixado por uma hora, a temperatura ambiente, com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, diluído em 0,1 M do mesmo tampão;
- Lavados em três ciclos de centrifugação a 2000 R.P.M por 10 minutos no mesmo tampão;
- Desidratados em série crescente de etanol:
 - etanol 30% - 10 minutos
 - etanol 50% - 10 minutos
 - etanol 70% - 10 minutos
 - etanol 90% - 10 minutos
 - etanol 100% - 10 minutos por três vezes.
- Secagem das amostras foi realizada pelo método do ponto crítico; .

- O material foi montado no *stub* e revestido com uma camada de ouro na espessura de 20 nm;
- As amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV com aceleração de voltagem de 15 kV da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz (IOC – Fiocruz).

Segue fluxograma explicativo da metodologia empregada na ultraestrutura (Figura 34).

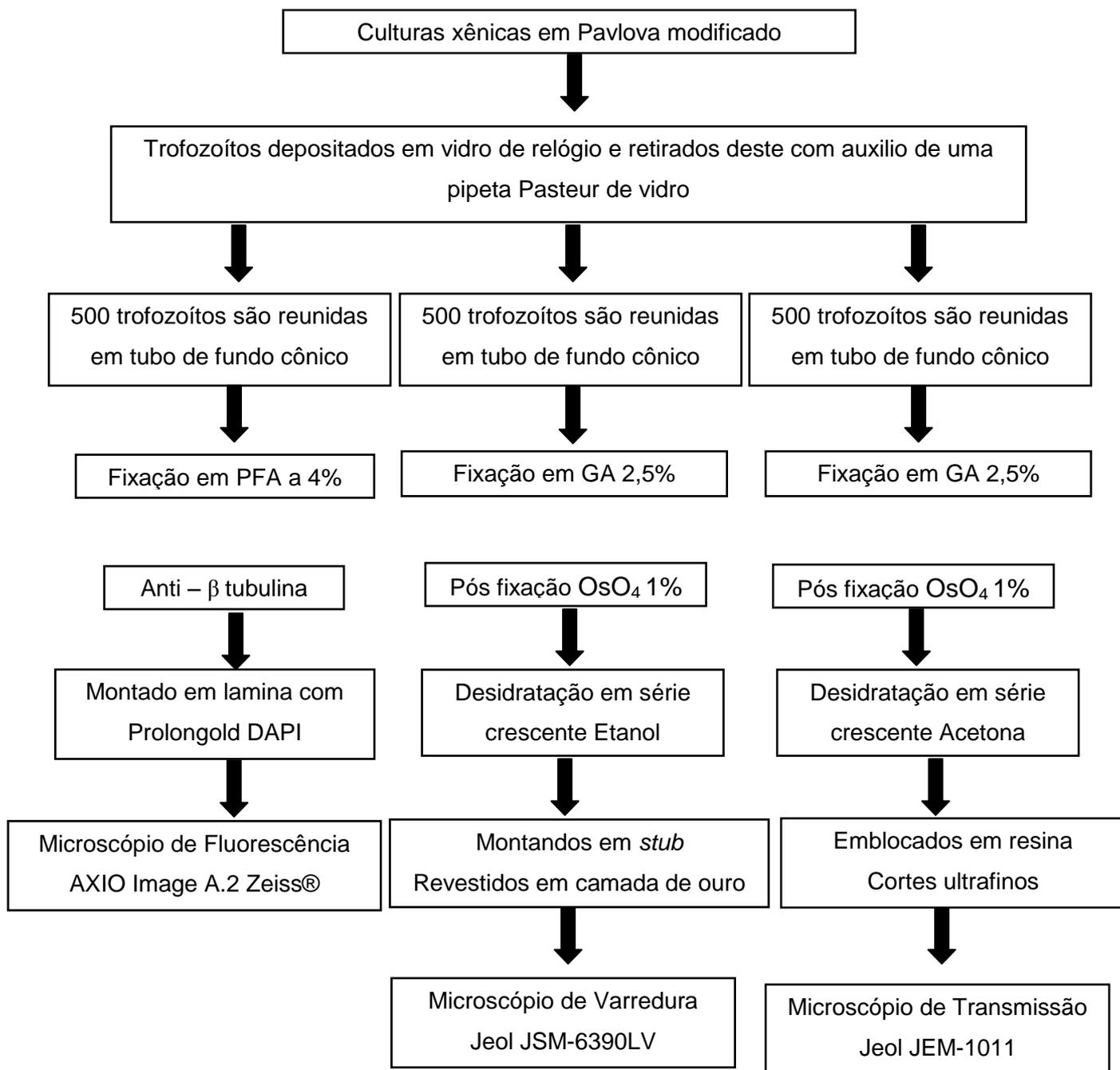


Figura 34. Fluxograma de metodologia resumida aplicada para análise ultraestrutural do parasito. Fonte: do autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

(Apresentado em formato de Artigos)

5.1 CAPÍTULO 1

Este capítulo pleitea o objetivo: - Determinar a frequência de Balantidium sp. em suínos criados em diferentes sistemas de manejo.

Situação: Aceito para publicação pela Revista Pesquisa Veterinária Brasileira (Anexo 5).

Versão em português do artigo.

Contexto: a frequência de Balantidium sp. foi realizada por meio de levantamento coproparasitológico em amostras fecais de suínos, sendo registrado também outras enteroparasitoses.

PARASITOS GASTRINTESTINAIS DE SUÍNOS CRIADOS EM DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO NO RIO DE JANEIRO, BRASIL

Alyne da Silva Barbosa¹, Laís Verdan Dib¹, Mayara Perlingeiro de Siqueira², Matheus Lessa Cardozo², Luiz Claudio Ferreira³, Willian Távora Chaves¹, Ana Beatriz Monteiro Fonseca⁴, Claudia M. Antunes Uchôa², Otilio Machado Pereira Bastos², Maria Regina Reis Amendoeira¹.

1. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ). Instituto Oswaldo Cruz Fiocruz. Laboratório de Toxoplasmose. Endereço: Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz.

2. Disciplina de Parasitologia, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia Universidade Federal Fluminense.

3. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ). Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC). Setor de Patologia Endereço: Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, Pavilhão.

4. Laboratório de Estatística, Departamento de Estatística, Universidade Federal Fluminense.

Resumo

Entre 2012 a 2013 foram pesquisados parasitos gastrintestinais de suínos de granjas localizadas em diferentes municípios do Rio de Janeiro. Amostras fecais de 790 suínos foram coletadas da ampola retal, sendo 88 de propriedades familiares e 702 de granjas com produção industrial. As amostras foram submetidas às técnicas de Faust et al., Sheather, Ritchie, Lutz e exame direto. A prevalência estimada das parasitoses foi de 93,1% nas granjas familiares e 59,1% nas granjas com produção industrial. *Balantidium coli*, coccídios e *Entamoeba* sp. foram as parasitoses que apresentaram as maiores frequências, sendo as categorias machos e fêmeas reprodutoras e leitões de terminação as mais infectadas ($p < 0,05$). Trofozoítos de *B. coli* foram mais evidenciados nas amostras fecais de consistências semi-sólida, seguidas pelas fezes de consistência sólida e diarreica. Ovos de estrombilídeos e *Trichuris suis* foram detectados exclusivamente em criações familiares. Ovos de *Ascaris suum* e de *Strongyloides ransomi* apresentaram baixa frequência. O alto grau de parasitismo, principalmente de protozoários, indica a necessidade de reavaliação do manejo dos suínos em ambos os tipos de produção.

Palavras-chave: Parasitos gastrintestinais, prevalência, Granjas de Suínos, *Balantidium coli*, Rio de Janeiro.

1. Introdução

Pesquisas e investimentos na suinocultura posicionaram o Brasil em terceiro e quarto lugar, respectivamente, no *ranking* de produção e exportação mundial, e contribuíram para aumentar a oferta interna e colocar o país em destaque no cenário internacional (Ministério da Agricultura, 2013; Abipecs, 2013). Neste contexto, os estados brasileiros da região Sudeste (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro) detém atualmente cerca de 17% do rebanho nacional e 21% de granjas industriais (Embrapa, 2011). Segundo dados estimados do IBGE (2012) o estado do Rio de Janeiro possui 155.328 cabeças de suínos.

Nos plantéis nacionais, as parasitoses podem determinar problemas de saúde frequentes em todas as fases da produção, sendo, portanto, um dos fatores limitantes nas criações de suínos (Carregaro, 2002). Os principais efeitos negativos nos animais se refletem em prejuízos econômicos para os produtores, tais como: piora na conversão alimentar, redução da fecundidade, baixo número de leitões nascidos e desmamados, baixo peso dos leitões ao nascer e ao desmame, como também prejuízos relativos à elevada taxa de condenação de vísceras em matadouros frigoríficos (Bordin, 1987; Roepstorff et al., 1998; Nansen e Roepstorff, 1999). Além disso, os suínos são considerados os principais reservatórios de *Balantidium coli* e *Entamoeba polecki*, que podem infectar o ser humano, especialmente os manipuladores destes animais (Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006)

Estudos realizados em diferentes países tem relatado alta prevalência de parasitoses gastrintestinais nos suínos produzidos principalmente em sistemas intensivos, granjas industriais, sendo poucos os relatos de frequência parasitária nos animais produzidos em sistemas familiares. Na França, Beloeil et al. (2003) detectaram positividade para nematódeos, como *Trichuris suis* e estrogilideos, em cinco granjas de suínos com sistema intensivo de produção. Em 3636 amostras fecais de suínos criados em granjas com sistema de produção intensivo na Província de Guangdong, China, Weng et al. (2005) detectaram 47,5% de positividade para *B. coli* e também outros parasitos como *T. suis* (5,7%), *Ascaris suum* (5,2%), estrogilideos (2,5%) e coccídios 24,9%. Também na China, na cidade de Chongqing, Lai et al. (2011) estimaram a prevalência de parasitos intestinais em criações de suínos com sistema intensivo e extensivo, sendo evidenciado frequências para *A. suum* (12,18%), *T. suis* (10,13%), *Oesophagostomum* spp. (10,13%), *Eimeria* spp. (16,53%), *Cystoisopora suis* (5,02%), *Cryptosporidium* spp. (6,60%) e cistos de *B. coli* (22,7%). Em Istambul, Turquia, Uysal et al. (2009) detectaram

parasitos com potencial zoonótico como *Giardia lamblia* (3,7%), *Cryptosporidium* spp. (8,8%) e *B. coli* (1,6%) em fezes de suínos de diferentes faixas etárias. Roepstorff et al. (1998) estudando cerca de 14.396 amostras fecais de suínos confinados em granjas industriais em diferentes países nórdicos, evidenciaram alta porcentagem de *A. suum* (25 – 35%).

No Brasil, Nishi et al. (2000) examinaram fezes de suínos em sistema intensivo, sendo 114 amostras coletadas em granjas localizadas em Minas Gerais e 423 em São Paulo. A prevalência estimada das parasitoses foi de 38,6% e 39,7%, respectivamente. Aguiar (2009) fez um levantamento parasitológico com 130 suínos de criações familiares do Distrito Federal. *B. coli* foi o parasito mais diagnosticado com 77,6%, seguido de coccídios (71,1%), estrongilídeos (45,3%), *Strongyloides ransomi* (36,9%), *A. suum* (27,6%), *T. suis* (14,3%) e *Metastrongylus* spp (3,7%). D'Alencar et al. (2006), estudando 1126 amostras fecais de suínos de granja com sistema intensivo localizada em Camaragibe, Pernambuco, obtiveram positividade de 0,27% para helmintos e 1,6% para protozoários.

Porém, no estado do Rio de Janeiro são escassas as informações sobre a prevalência das parasitoses em suínos produzidos em diferentes sistemas de criação. Neste contexto, objetivou-se avaliar a prevalência estimada das parasitoses gastrintestinais de suínos em criações familiares e industriais em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro, correlacionando a positividade das parasitoses com as diferentes categorias de suínos nos sistemas intensivos e também a frequência de trofozoítos de *B. coli* de acordo com a consistência fecal das amostras.

2. Material e Métodos

2.1 Local do estudo

O estado do Rio de Janeiro situa-se na porção leste do Sudeste do Brasil, ocupando uma área de 43.780,172 Km², com 92 municípios, possuindo clima tropical com temperaturas médias anuais de 22 a 24°C (IBGE, 2012). Foram convidados a participar do estudo granjas familiares do interior da região metropolitana e baixada litorânea, pois a maioria dos produtores familiares (tradicionais) do estado concentra-se nestas regiões. As granjas industriais selecionadas são as principais produtoras de suíno do Rio de Janeiro, especialmente a do município de Petrópolis, que atualmente, é considerada a maior produtora de suínos do estado.

Foram estudadas nove granjas de suínos localizadas em municípios distintos do Rio de Janeiro. Na região metropolitana participaram as propriedades dos municípios de: Itaboraí e Maricá; na serrana: Petrópolis; na baixada litorânea: Rio Bonito, Saquarema, Silva Jardim e Casimiro de Abreu e no noroeste fluminense: Itaperuna. Todas as granjas de suínos foram georeferenciadas com GPS Garmin® modelo Etrex e suas localizações no estado do Rio de Janeiro estão plotados na figura 1.

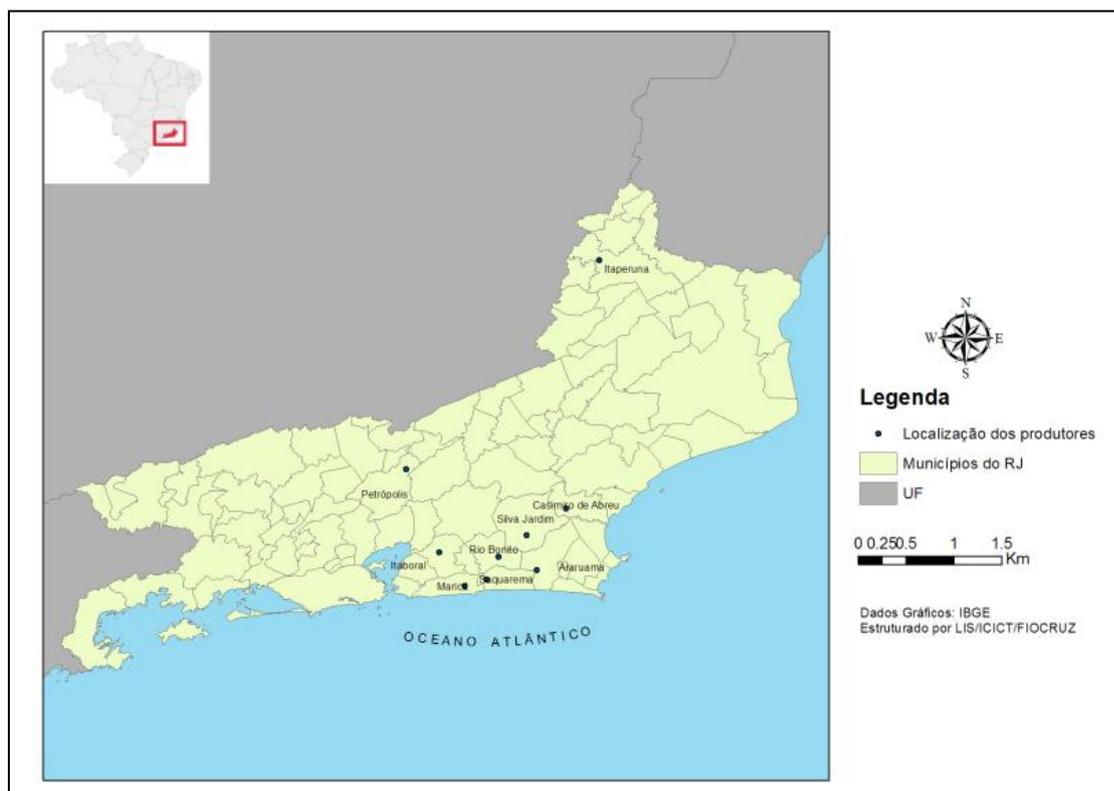


Figura 1. Localização das granjas de suínos localizadas em diferentes cidades do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

2.2 Granjas estudadas e amostragem

No período de setembro de 2012 a setembro de 2013 foram coletadas, 790 amostras fecais, sendo: 88 de propriedades familiares dos municípios de Rio Bonito (21), Araruama (7), Saquarema (12), Maricá (8), Itaboraí (12), Casimiro de Aberu (23) e Silva Jardim (5) e 702 de propriedades industriais de Petrópolis (479) e Itaperuna (223). Para sua realização, este estudo obteve parecer favorável em 02 de julho de 2012 no Comitê de Ética Animal/Fiocruz, número de licença LW57/12, protocolo nº P 79/11-2.

Nas propriedades familiares estudadas os animais não possuíam raças definidas e permaneciam em baias coletivas. A maioria das granjas utilizava o sistema semi-intensivo

de criação com exceção da granja do município de Araruama que praticava a produção extensiva. Nas granjas industriais era utilizado o sistema intensivo, sendo os suínos oriundos de linhagens específicas, em Petrópolis os animais pertenciam a linhagem TOPIG do Brasil[®] e em Itaperuna, a linhagem Agroceres[®]. Nessas, os suínos eram categorizados em: fêmeas reprodutoras (fêmeas adultas): maternidade, gestante e vazia (em período de descanso reprodutivo); fêmeas marrãs ou leitoas (não adultas que nunca foram inseminadas), machos reprodutores (adultos), leitões de creche (desmamados – 17 semanas de idade) e leitões de terminação (18 – 22 semanas de idade).

As amostras foram coletadas individualmente diretamente da ampola retal com luva de palpação longa, sendo posteriormente identificadas, acondicionadas em recipiente isotérmico e imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense para processamento.

Para fins de amostragem, nas granjas familiares, optou-se por coletar o máximo possível de animais, pois o número de suínos em cada propriedade era pequeno. Foram excluídas da coleta; as fêmeas prenhas e leitões recém nascidos. Nas granjas tipo industriais foi utilizado o intervalo de confiança de no mínimo 80% com 5% de precisão, com exceção dos setores de terminação e creche da granja de Petrópolis, onde foi adotada amostragem por conveniência, sendo coletadas, no mínimo, 100 amostras fecais de cada categoria, pois nestes setores havia mais de 1.000 animais em cada.

2.3 Técnicas laboratoriais

As amostras fecais foram categorizadas de acordo com a consistência em: sólida, semi-sólida e diarreica, sendo uma parte desse material imediatamente processado pelo exame direto. Outra parte da amostra foi homogeneizada e o filtrado foi alíquotado em tubos de centrífuga com volume de 15 mL de fundo cônico para a realização das técnicas de centrífugo sedimentação de Ritchie (1948) modificada por Young et al. (1979), centrífugo flutuação de Faust et al. (1938); centrífugo flutuação de Sheather (1923) modificada por Huber et al. (2003). Uma parte do filtrado foi deixado sedimentar em cálice de fundo cônico por 24 horas para realização da técnica de sedimentação espontânea de Lutz (1919).

A leitura das lâminas obtidas em cada técnica e a foto documentação foram realizadas em microscópio óptico Olympus[®] BX 41, inicialmente, em aumento de 100 vezes e, para confirmação, se necessário, em 400 vezes, acoplado a câmera digital Samsung[®] SDC415 com *software* de captura Honestech[®] PVR. Para morfometria das

formas evolutivas de parasitos foi utilizado o microscópio óptico Olympus® CH30 em 400 vezes com uma ocular micrométrica.

2.4 Análise dos dados

A amostra fecal foi considerada positiva quando foi detectada pelo menos uma forma evolutiva de parasito de suínos (trofozoíto, ovo, cisto ou oocisto). A estimativa de prevalência foi realizada dividindo o número de amostras positivas pelo número total de amostras coletadas, sendo estes dados apresentados em porcentagem. Foi utilizado o teste X^2 com o programa estatístico SPSS (versão 11.7, SPSS® Inc., Chicago, IL, 1999) com grau de confiança de 5%, para analisar a positividade parasitária dos sistemas de produção, nas categorias de suínos das granjas industriais e também a frequência de trofozoíto de *B. coli* de acordo com a consistência fecal das amostras.

3. Resultados

Do total de amostras de suínos positivas para um ou mais parasitos gastrintestinais, 93,1% foram provenientes das granjas familiares e 59,1% das industriais, havendo diferença significativa ($P < 0,05$) no valor total de animais parasitados quando comparado os dois sistemas de produção (Tabela 1). A positividade para os parasitos mais frequentes na produção familiar e industrial foram respectivamente: *Balantidium coli* (71,6% - 46,4%), coccídios (71,6% - 19,2%) e *Entamoeba* sp. (44,3% - 18,6%). No sistema familiar estes protozoários apresentaram maior prevalência estimada do que no sistema industrializado, com diferença estatística significativa entre os tipos de produção ($P < 0,05$). Cistos de *Giardia lamblia* foram observados somente em uma amostra de granja familiar. Nas propriedades familiares os helmintos mais diagnosticados foram ovos de estrombilídeos (46,6%) e *Trichuris suis* (9%), que não foram detectados em amostras de granjas industriais ($P < 0,05$). Ovos de *Ascaris suum* foram evidenciados tanto nas criações familiares (4,5%) quanto nas industriais (0,1%) e ovos larvados de *Strongyloides ransomi* detectados somente em amostras das granjas industriais (0,6%), não apresentando diferença significativa entre os sistemas de produção ($P > 0,05$) (Tabela 1). Infecções monoparasitárias foram encontradas em 34,7% (274/790) e poliparasitárias em 28,2% (223/790), sendo as associações de *B. coli* e *Entamoeba* sp. 83/223 (37,2%) as mais frequentes, seguida por *B. coli* e coccídio 62/223 (27,8%) (Dados não mostrados na tabela).

Tabela 1. Parasitos gastrintestinais detectados em suínos criados nas propriedades com sistema de criação familiar e industrial localizadas em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro.

| TS | Granjas | Amostras coletadas | <i>Entam</i> ^a | <i>A. suum</i> ^b | <i>B. coli</i> ^a | Cocc ^a | <i>G. lam</i> ^b | *Estron ^a | <i>T. suis</i> ^a | <i>S. ran</i> ^b | Total positivas ^a |
|------------|----------|--------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Familiar | A | 21 | 6 (28,6%) | 0 | 9 (56,2%) | 14 (93,7%) | 0 | 1 (6,2%) | 1 (6,2%) | 0 | 16 (76,1%) |
| | B | 7 | 2 (28,6%) | 0 | 6 (85,7%) | 7 (100%) | 0 | 6 (85,7%) | 0 | 0 | 7 (100%) |
| | C | 12 | 5 (41,7%) | 0 | 6 (50%) | 12 (100%) | 0 | 11 (91,6%) | 5 (41,6%) | 0 | 12 (100%) |
| | D | 8 | 0 | 0 | 7 (87,5%) | 8 (100%) | 0 | 5 (62,5%) | 0 | 0 | 8 (100%) |
| | E | 12 | 10 (83,3%) | 0 | 11 (91,7%) | 11 (91,7%) | 0 | 10 (83,3%) | 1 (8,3%) | 0 | 12 (100%) |
| | F | 23 | 15 (68,2%) | 0 | 19 (86,4%) | 6 (27,2%) | 1 (4,3%) | 4 (18,1%) | 0 | 0 | 22 (95,6%) |
| | G | 5 | 1 (20%) | 4 (80%) | 5 (100%) | 5 (100%) | 0 | 4 (80%) | 1 (20%) | 0 | 5 (100%) |
| | Subtotal | 88 | 39 (44,3%) | 4 (4,5%) | 63 (71,6%) | 63 (71,6%) | 1 (1,1%) | 41 (46,6%) | 8 (9%) | 0 | 82 (93,1%) |
| Industrial | H | 479 | 109 (22,8%) | 1 (0,20%) | 257 (53,7%) | 115 (24%) | 0 | 0 | 0 | 2 (0,4%) | 328 (68,5%) |
| | I | 223 | 22 (9,9%) | 0 | 69 (30,9%) | 20 (9%) | 0 | 0 | 0 | 2 (0,9%) | 87 (39%) |
| | Subtotal | 702 | 131 (18,6%) | 1 (0,1%) | 326 (46,4%) | 135 (19,2%) | 0 | 0 | 0 | 4 (0,6%) | 415 (59,1%) |
| | Total | 790 | 170 (21,5%) | 5 (0,6%) | 389 (49,2%) | 198 (25,1%) | 1 (0,1%) | 41 (5,2%) | 8 (1%) | 4 (0,5%) | 497 (62,9%) |

Porcentagens foram calculadas dividindo o número de amostras positivas para parasitos pelo subtotal (número total de amostras coletadas em cada tipo de sistema).

TS, Tipo de Sistema;

Entam, *Entamoeba* sp., *A. suum*, *Ascaris suum*; *B. coli*, *Balantidium coli*; Cocc, Coccídeo; *G. lam*: *Giardia lamblia*;

Estron, Ovo de esntrogilídeo; *T. suis*, *Trichuris suis*; *S. ran*, *Strongyloides ransmoni*

^a Diferença estatística ($P < 0,05$) entre os dois tipos de sistemas (familiar e industrial).

^b Não tem diferença estatística ($P > 0,05$) entre os dois tipos de sistemas (familiar e industrial).

A: Rio Bonito; B: Araruama; C: Saquarema; D: Maricá; E: Itaboraí; F: Casimiro de Abreu; G: Silva Jardim,

H: Petrópolis, I: Itaperuna.

*estron: Strongilídeo - Ovos da Subordem Strongylata (ovos dessas superfamílias são idênticos).

Nas granjas de suínos com sistema tipo industrial, as categorias de suínos que apresentaram maior taxa de infecção foram: machos reprodutores, seguidos de fêmeas marrãs, gestantes (maior valor encontrado na granja H), fêmeas vazias, leitões de terminação, maternidade e creche (Tabela 2). Houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) por categorias de animais tanto nas frequências totais de parasitos, como nas específicas de: *B. coli*, *Entamoeba* sp. e coccídios, que foram os parasitos mais frequentes (Tabela 2).

Tabela 2. Parasitos gastrintestinais detectados em categorias de suínos de granjas com sistema industrial localizadas em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro.

| Granja Industrial | Categorias de suínos | Amostras coletadas | <i>Entam</i> ^a | <i>A. suum</i> ^b | <i>B. coli</i> ^a | Coccídio ^a | <i>S. ran</i> ^b | Total Positivas |
|-------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------|
| | | | | | | | | 110 |
| H | Fêmea | 116 | 18 (15,5%) | 1 (0,9%) | 72 (62%) | 87 (75%) | 0 | (94,8%) |
| I | gestante | 33 | 1 (3%) | 0 | 8 (24,2%) | 3 (9%) | 0 | 12 (36,4%) |
| | Subtotal | 149 | 19 (12,8%) | 1 (0,7%) | 80 (53,7%) | 90 (60%) | 0 | 122 (81,9%) |
| H | Fêmea | 64 | 3 (4,7%) | 0 | 22 (34,4%) | 7 (10,9%) | 0 | 29 (45,3%) |
| I | maternidade | 11 | 1 (9%) | 0 | 3 (27,2%) | 7 (63,6%) | 0 | 4 (36,4%) |
| | Subtotal | 75 | 4 (5,3%) | 0 | 25 (33,3%) | 14 (18,7%) | 0 | 33 (44%) |
| | | | | | | | 1 | |
| H | | 101 | 21 (20,8%) | 0 | 34 (33,7%) | 1 (1%) | (0,99%) | 46 (45,5%) |
| I | Creche | 98 | 13 (13,3%) | 0 | 20 (20,4%) | 1 (1%) | 1 (1%) | 25 (25,5%) |
| | Subtotal | 199 | 34 (17,1%) | 0 | 54 (27,1%) | 2 (1%) | 2 (1%) | 71 (35,7%) |
| | | | | | | | 1 | |
| H | | 104 | 28 (26,9%) | 0 | 68 (65,4%) | 1 (0,1%) | (0,96%) | 73 (70,2%) |
| I | Terminação | 68 | 3 (4,4%) | 0 | 31 (45,6%) | 5 (7,4%) | (0,96%) | 35 (51,5%) |
| | Subtotal | 172 | 30 (17,4%) | 0 | 99 (57,5%) | 6 (3,5%) | (1,16%) | 108 (62,8%) |
| H | | 41 | 3 (7,3%) | 0 | 21 (51,2%) | 4 (9,8%) | 0 | 25 (61%) |
| I | Vazia | 5 | 4 (80%) | 0 | 3 (60%) | 1 (20%) | 0 | 5 (100%) |
| | Subtotal | 46 | 7 (15,2%) | 0 | 24 (52,12) | 5 (10,9%) | 0 | 30 (65,2%) |
| H | | 45 | 33 (73,3%) | 0 | 34 (75,6%) | 9 (20%) | 0 | 40 (88,9%) |
| I | Marrã | 6 | 0 | 0 | 3 (50%) | 1 (16,6%) | 0 | 4 (66,6%) |
| | Subtotal | 51 | 33 (64,7%) | 0 | 37 (72,5%) | 10 (19,6%) | 0 | 44 (27,5%) |
| H | | 8 | 3 (37,5%) | 0 | 8 (100%) | 6 (75%) | 0 | 8 (100%) |
| I | Macho reprodutor | 2 | 0 | 0 | 1 (50%) | 2 (100%) | 0 | 2 (100%) |
| | Subtotal | 10 | 3 (30%) | 0 | 9 (90%) | 8 (80%) | 0 | 10 (100%) |
| | | | | | | | 4 | 415 |
| | Total | 702 | 131(18,7%) | 1 (0,1%) | 326(46,4%) | 135(19,2%) | (0,56%) | (59,1%) |

Porcentagens foram calculadas dividindo o número de amostras positivas para parasitos pelo subtotal

Entam, *Entamoeba* sp., *A. suum*, *Ascaris suum*; *B. coli*, *Balantidium coli*; Cocc, Coccídio; *S. ransomi*, *Strongyloides ransomi*

^a Diferença estatística ($P < 0,05$) entre os dois tipos de sistemas (familiar e industrial).

^b Não tem diferença estatística ($P > 0,05$) entre os dois tipos de sistemas (familiar e industrial).

H: Petrópolis, I: Itaperuna.

Das 790 amostras fecais de suínos coletadas, 67,6% apresentavam consistência sólida, 25,6% semi-sólida e 6,8% diarreicas. Trofozoítos de *B. coli* foram detectados pelo exame direto nas três categorias de consistências fecais, sendo que tal forma evolutiva foi evidenciada com maior frequência em fezes semi-sólidas e diarreicas, ocorrendo diferença significativa ($P < 0,05$) na frequência de diagnóstico dos trofozoítos entre as três categorias de consistência fecal (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de trofozoíto de *B. coli* detectada em amostras fecais com consistência sólida, semi-sólida e diarreica em granjas de suínos de diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro.

| | | Consistência das fezes | | | Total |
|------------------------------|-------|------------------------|--------------|------------|-------|
| | | Sólida* | Semi-sólida* | Diarreica* | |
| Trofozoíto <i>B. coli</i> | N | 510 (75,4%) | 133 (19,7%) | 33 (4,9%) | 676 |
| | P | 24 (21,1%) | 69 (60,5%) | 21 (18,4%) | 114 |
| | Total | 534 (67,6%) | 202 (25,6%) | 54 (6,8%) | 790 |

* $P < 0,05$.

N: Negativo; P: Positivo.

4. Discussão

O estado do Rio de Janeiro possui diferentes sistemas de produção de suínos, dentre eles destacam-se os produtores tipo indústria e os familiares, também conhecido como sistema tradicional. Neste estudo foi possível evidenciar diferença na positividade para parasitoses gastrintestinais entre suínos criados sob os diferentes tipos de manejo. A frequência parasitária total da produção familiar foi superior ao da industrial. Índices elevados de parasitoses gastrintestinais (96,1%) em granjas familiares também foram observados por Aguiar (2009) no Distrito Federal, Brasil. Frequências inferiores as granjas com sistema intensivo do Rio de Janeiro foram evidenciados por Nishi et al. (2000) em Minas Gerais (38,6%) e em São Paulo (39,7%). Positividade parasitária elevada em sistemas tradicionais também foram relatadas por Lai et al. (2011) em suínos de Chongqing, China, sem diferença significativa com a produção industrial.

Formas evolutivas de *B. coli*, oocisto não esporulados de coccídios e cisto uninucleados de *Entamoeba* sp. foram as mais detectadas em ambos os sistemas de produção, com diferença significativa entre eles, sendo a associação de poliparasitismo

mais evidenciada, entre esses protozoários (*B. coli* e *Entamoeba* sp., *B. coli* e coccídio). Resultados que diferem das granjas do Rio de Janeiro foram encontrados por Lai et al. (2011) que evidenciaram *B. coli* em criações tradicionais e industriais respectivamente, 22,1% e 23,4%, com menor frequência, sem diferença significativa entre os tipos de produção. Índices um pouco maiores de *B. coli* (47,2%) e coccídio (24,9%) foram evidenciados por Weng et al. (2005) em granjas de sistema intensivo industrial na Província de Guangdong, China.

Cistos uninucleados de *Entamoeba* sp., em amostras fecais de suínos, tem sido pouco relatados. Ismail et al. (2010) estudando suínos de áreas rurais de Chungcheongnam-do, Korea evidenciaram frequência menor de *Entamoeba* sp. (3,7%) do que as detectadas nas granjas do Rio de Janeiro. Apesar da distinção entre *E. polecki* e *E. suis* ser relevante, visto que apenas a primeira espécie é considerada zoonose e patogênica para suínos, neste estudo não foi possível identificá-las, pois as dimensões dos cistos apresentam-se em faixas de tamanho compatíveis com ambas as espécies (Stensvold et al. 2010). Cistos de *Giardia lamblia* foram detectados somente em uma amostra na granja familiar deste estudo, discordando do evidenciado por Uysal et al. (2009) que relataram *G. lamblia* em 9 suínos (3,7%) de diferentes propriedades rurais da Turquia. Segundo Armson et al. (2009) ainda há poucas informações sobre a importância da giardíase para a saúde desses animais.

Entre os helmintos, foram detectados apenas nematóides, e os mais evidenciados nas granjas familiares foram strongilídeos. Considerou-se nesse grupo tanto ovos da superfamília Strongyloidea quanto da superfamília Trichostrongyloidea, já que os mesmos são idênticos, necessitando-se de coprocultura e estudo morfológico das larvas para diferenciá-los. Também foram detectados ovos de *T. suis* e *A. suum*, sendo este último evidenciado em ambos os sistemas de produção sem diferença significativa. Tais helmintos têm importância na suinocultura, pois causam redução no ganho de peso do animal, e especificamente *A. suum*, por determinar condenação do fígado no matadouro-frigorífico (Bordin, 1987)

A frequência de nematóides nas granjas industriais foi de 0,6%, sendo evidenciados a partir de uma amostra com ovo de *A. suum* e quatro com ovos larvados de *S. ransomi*. Resultados semelhantes foram encontrados por D'Alencar et al. (2006) em Pernambuco, Brasil, que evidenciaram uma frequência baixa (0,3%) de nematóides nos 1126 suínos analisados, incluindo-se *A. suum* (0,1%). Nishi et al. (2000) também observaram baixa frequência, encontrando 3,5% de *A. suum* nos suínos de Minas Gerais

e 1,6% nos de São Paulo. Da mesma forma, baixa frequência de *S. ransomi* (0,4% - 11,8%) também foi evidenciada por Roepstorff et al. (1998) estudando 14.396 suínos de países nórdicos.

S. ransomi é um nematóide pouco relatado em estudos de parasitoses de suínos, possivelmente, devido à necessidade de mensuração dos ovos para diferenciá-los das superfamílias Trichostrongyloidea e Strongyloidea. Outro fator que pode interferir no encontro desse parasito, resultando em falso negativo, seria o mau acondicionamento térmico das amostras levando a eclosão dos ovos, fato relatado por Nansen e Roepstorff (1999).

A diferença significativa entre frequências: elevada em protozoários e baixa em nematóides, observadas principalmente nas granjas industriais pode ser atribuída a rotina anti-helmíntica, que é realizada principalmente nas fêmeas gestantes e nos animais de terminação. Geralmente, essa terapia anti-parasitária atua principalmente em helmintos, sendo pouco eficaz para protozoários. Beloeil et al. (2003) destacaram que a baixa positividade para helmintos pode estar relacionada com a prática de controle parasitário que é rotineiramente empregada em sistemas industriais de produção. Segundo Nishi et al. (2000) o encontro de nematóides em rebanhos com sistema intensivo, mesmo que baixo, pode estar associado à contaminação e à alta resistência dos ovos de alguns helmintos no meio ambiente.

A maior positividade parasitária no sistema familiar do que no industrial era esperado, pois as granjas industriais, geralmente são empresas que vendem os suínos para matadouros-frigoríficos os quais abastecem o mercado consumidor, possuindo maior rigor no manejo sanitário, com limpeza das instalações, sala de quarentena (instalações afastadas onde ficam os novos animais que serão inseridos no plantel) e rotinas de tratamento antiparasitário. Já nas granjas familiares, os produtores investem em pouco ou nenhum manejo sanitário, possuem pouca infra-estrutura (suínos semi-confinados ou não confinados) e os animais são, geralmente, destinados para consumo do produtor, ou para pequenas transações comerciais.

Neste estudo, as mais altas frequências parasitárias por categorias de suínos nas granjas industriais concentraram-se nos animais em idade reprodutiva como, machos reprodutores, fêmeas marrãs, gestantes e vazias e também nos leitões de terminação. Os protozoários *B. coli*, coccídios e *Entamoeba* sp. foram os parasitos mais detectados com diferença significativa entre as categorias. Estes resultados concordam com os de Weng

et al. (2005) que também evidenciaram na China maior positividade nas categorias reprodutivas de fêmeas e machos.

A maior frequência de parasitoses nos animais reprodutores pode ser explicada pelo fato de que tanto os machos, quanto as fêmeas gestantes e vazias, correspondem às categorias de suínos, com maior longevidade no plantel, vivendo em média, cinco a seis anos. O tempo de vida dos animais na granja pode ter favorecido a reinfecção desses em ambientes contaminados. Segundo Weng et al. (2005) as categorias reprodutoras quando parasitadas tornam-se reservatórios da infecção para outros grupos etários. Já, a alta taxa de parasitos no setor de terminação tanto da granja de Petrópolis (H) quanto de Itaperuna (I), pode estar relacionada ao confinamento em baias coletivas e a presença constante de lâminas d'água, fato ressaltado por Nishi et al. (2000) que associaram esse recurso, quando inadequadamente utilizado, a uma fonte de transmissão parasitária.

Trofozoítos de *B. coli* foram diagnosticados pelo exame direto em fezes de consistência sólida, semi-sólida e diarreica, com diferença de frequência estatisticamente significativa. Esta diferença pode ser explicada, em razão desta forma evolutiva ter sido mais evidenciada proporcionalmente em fezes semi-sólidas e diarreicas. Tal resultado já era esperado, pois fezes de consistência amolecidas, geralmente, ocorrem devido ao maior trânsito e/ou lubrificação intestinal o que facilita a eliminação fecal dos trofozoítos. Observou-se que o exame direto favoreceu o diagnóstico deste protozoário, pois em algumas amostras, *B. coli* só foi detectado nesta técnica. Além disso, houve o encontro de trofozoítos em fezes sólidas, o que ressalta a importância da realização do exame direto no diagnóstico da balantidiose em suínos. O monitoramento de *B. coli* em plantéis de suínos torna-se relevante, pois estes animais são, geralmente, considerados os principais reservatórios para a infecção humana (Schuster, Ramirez-Avila, 2008). Além disso, a balantidiose tem sido, principalmente relatada em países de climas tropicais e subtropicais, como os do Rio de Janeiro.

Comparações epidemiológicas a nível nacional e regional foram prejudicadas devido à escassez de estudos de parasitoses em suínos, o que sugere a necessidade de mais pesquisas sobre esse tema. Nas granjas de suínos localizadas em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro evidenciou-se elevada frequência de parasitos gastrintestinais principalmente de protozoários, com percentuais menores nas granjas com sistema industrial. Tal resultado demonstra a necessidade de adoção de controle sanitários individualizados, levando em consideração o tipo de produção, o manejo utilizado pelo produtor, à idade dos animais, à localização da propriedade bem como

estrutura física da granja, assim como as condições socioeconômicas e culturais do proprietário.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte fornecido pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Pró-reitoria de Pesquisa e Inovação da Universidade Federal Fluminense (PROPPI-UFF) e a Pró-reitoria de Assuntos Estudantis da Universidade Federal Fluminense (PROAES-UFF).

Referências

Abipecs - Brazilian Association of Producers and Exporters of Pork (in Portuguese). 2013. Relatório Anual 2012/2013. Available in: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf.

Aguiar PC. Aspectos epidemiológicos das parasitoses gastrintestinais de suínos naturalizados de criações familiares do Distrito Federal. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Universidade Federal de Brasília; 2009. Brasília, DF.

Armson A, Yang R, Thompson J, Johnson J, Reidb S, Ryanb UM. *Giardia* genotypes in pigs in Western-Australia: Prevalence and association with diarrhea. *Exp Parasitol.* 2009;121: 381-383.

Beloeil PA, Chauvin C, Fablet C, Jolly JP, Eveno E, Madec F, Reperant JM. Helminth control practices and infections in growing pigs in France. *Livest Prod Sci.* 2003; 81, 99-104.

Bordin EL. Relationship between infections and internal parasites of swine meal cost – Review. *A Hora Veterinária.* 1987;7(39):21-27. (In Portuguese).

Carregaro FB. Parasitos gastrintestinais em suínos raça/tipo naturalizados do Distrito Federal. Monografia, Universidade de Brasília. 2002; 31-32.

D’Alencar AS, Faustino MAG, Sousa DP, Lima MM, Alves LC. Infecção por helmintos e coccídios em criação de suínos de sistema confinado localizada no município de Camaragibe, PE. *Ciênc Vet Tróp.* 2006; 9:19-86.

Embrapa. Central Intelligence Poultry and Pork. 2011. Spatial distribution of pig production in Brazil. Available in: http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=59.

Faust EC, D’antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie JE, Walker JH. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *Am J Trop Med.* 1938; 18:169-183.

Huber F, Bomfim TC, Gomes RS. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-eter e da técnica de centrifugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. Rev Bras Parasitol Vet. 2003; 12:135-137.

IBGE – Brazilian Institute of Geography and Statistics. 2012. Available in: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rj>.

Ismail HAHA, Jeon H, Yu Y, Do C, Lee Y. Intestinal parasite infections in pigs and beef cattle in rural areas of Chungcheongnam-do, Korea. Korean J Parasitol. 2010; 48 (4):347 – 349.

Lai M, Zhou RQ, Huang HC, Hu SJ. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasites in pigs in Chongqing, China. Res Vet Sci. 2011; 91, 121-124.

Lutz AO. Schistosomum mansoni and Schistomatose according to observations made in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1919; 11:121-155.

Ministério da Agricultura. *Produção*. 2013. Available in: <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno/producao>.

Nansen P, Roepstorff A. Parasitic helminths of the pig: factors influencing transmission and infection levels. Int J Parasitol. 1999; 29:877-891.

Nishi AM, Gennari SM, Lisboa MNTS, Silvestrim A, Caproni Jr L, Umehara O. Parasitas intestinais em suínos confinados nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Arq Inst Biológico 2000;67:199-203.

Ritchie L S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. United States Army Medical Department Bulletin. 1948;8:326.

Roepstorff A, Nilsson O, Oksanen A, Gjerde B, Richter SH, Örtenberg E, Christensson D, Martinsson KB, Bartlett PC, Nansen P, Eriksen L, Helle O, Nikander S, Larsen K. Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: prevalence and geographical distribution. Vet Parasitol. 1998; 76:305-319.

Sheather AT. The detection of intestinal protozoa and monogene parasites by a flotation technique. J Comp Pathol. 1923;36:266-275.

Schuster FL, Ramirez-Avila L. Current world status of *Balantidium coli*. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(4):626-638.

Solaymani - Mohammadi S, Petri Jr WA. Zoonotic implications of the swine Transmitted-protozoal infections. Vet Parasitol. 2006; 140:189-203.

Stensvold CR, Lebbad M, Clark CG. Genetic characterisation of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* spp. from ruminants. Int J Parasitol. 2010; 40, 775-778.

Uysal HK, Boral O, Metiner K, Ilgaz A. Investigation of intestinal parasites in pigs feces that are also human pathogens. Turkey Parasitol. 2009; 33(2):218 -221.

Weng Y B, Hu YJ, Li Y, Li BS, Lin RQ, Xie DH, Gasser RB, Zhu XQ. Survey of intestinal parasites in pigs from intensive farms in Guangdong Province, People's Republic of China. *Vet Parasitol.* 2005;127, 333-336.

Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol.* 1979 ;10: 852-853.

5.2 CAPÍTULO 2

Este capítulo pleitea o objetivo: - Determinar a frequência de Balantidium sp. em diferentes espécies de primatas não humanos cativos.

Situação: Publicado pela Revista: Journal Medical Primatology (Anexo 6).

Versão em português do artigo.

Contexto: a frequência de Balantidium sp. foi realizada por meio de levantamento coproparasitológico em amostras de primatas, sendo registrado também outras enteroparasitoses.

***Balantidium coli* e outros parasitos gastrintestinais de primatas não humanos cativos do Rio de Janeiro, Brasil**

Alyne da Silva Barbosa¹, Alcides Pissinatti², Laís Verdan Dib³, Mayara Perlingeiro de Siqueira³, Matheus Lessa Cardozo³, Ana Beatriz Monteiro Fonseca⁴, Anderson de Barros Oliveira⁵, Fábio Alves da Silva⁵, Claudia M. Antunes Uchôa³, Otilio Machado Pereira Bastos³, Maria Regina Reis Amendoeira¹

1. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro). Instituto Oswaldo Cruz. Laboratório de Toxoplasmose, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.
2. Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ/INEA), Guapimirim, Rio de Janeiro, Brasil.
3. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, São Domingos, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.
4. Laboratório de Estatística, Departamento de Estatística, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil.
5. Serviço de Criação de Primatas não humanos (CECAL). Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

Parasitos gastrintestinais são importantes agentes de diarreia em primatas não humanos (NHP) cativos. Para ampliar as informações sobre tais agentes etiológicos nesses animais, as parasitos gastrintestinais de NHP cativos foram pesquisados em dois centros de criação localizados no estado do Rio de Janeiro. Foram coletadas amostras fecais de primatas, sendo 960 de recintos do Cecal/Fiocruz e 155 do CPRJ/INEA. Estão representadas neste estudo várias espécies de primatas do Novo Mundo (NM) e duas do Velho Mundo (VM). A prevalência global estimada para as parasitoses gastrintestinais foi de 56,7%. Destas, 91,3% apresentavam protozoários e 7,4% helmintos. Diferenças estatisticamente significativa entre os núcleos de criação ocorreram no valor global das parasitoses e na frequência isolada de *Balantidium coli* e *Entamoeba* sp., principalmente nas amostras de primatas do VM, que habitam o Cecal. Esses resultados demonstram a necessidade de implantação de programas sanitários no plantel dos primatas cativos.

Palavras-chave: Helmintos, Primatas do novo mundo, Primatas do Velho Mundo, Diagnóstico parasitológico, Protozoários.

1. Introdução

Várias espécies de primatas não humanos podem ser criadas em cativeiros, como as do Novo Mundo (NM) e Velho Mundo (VM). Tais animais podem ser encontrados em centros de criação voltados para pesquisas biomédicas, zoológicos, centro de conservação de espécies e ainda como animais domésticos de companhia (Johnson-Delaney, 2009).

Símios mantidos em cativeiro podem apresentar vários problemas de saúde, dentre os quais se destacam infecções por protozoários e helmintos (Ximenes, 1997). Geralmente, quando esses animais são mantidos por muito tempo em cativeiro, a sua fauna parasitológica pode ser alterada, apresentando formas evolutivas que também podem ser encontradas no homem (Michaud et al., 2003; Johnson-Delaney, 2009). Segundo Michaud et al. (2003) e Pourrut et al. (2011) devido a proximidade filogenética, símios e humanos são suscetíveis a infecções por diversos parasitos de mesma espécie, determinando ciclos de transmissão zoonóticos. Dentre os parasitos com esse potencial de transmissão diagnosticados em primatas não humanos destaca-se a alta prevalência de *Balantidium coli*, que tem sido evidenciado em diversas espécies de símios (Nakauchi et al., 1998), tendo sido esses animais apontados como reservatórios do protozoário (Schuster e Ramirez- Ávila 2008).

Sob condições naturais, infecções com elevada carga parasitária raramente ocorrem, enquanto que em cativeiro, os animais ficam sujeitos a estresse que pode debilitar o sistema imunológico, tornando-os mais suscetíveis a parasitoses (Malan et al., 1997). Superpopulação, baixos padrões de higiene, alimentação deficiente são fatores importantes que podem contribuir para o desenvolvimento de parasitos de primatas em cativeiro (Malan et al., 1997; Mul et al., 2007; Sanchez et al., 2009). Nesses animais, as infecções parasitárias sintomáticas do trato gastrointestinal, geralmente, determinam quadros clínicos de diarreia aquosa, hemorragia, disenteria, patologias extra-intestinais, tais como abscesso no fígado e até mesmo o óbito (Levecke et al., 2011). Carmo e Salgado (2003) ressaltam a importância do diagnóstico parasitológico de primatas em cativeiro, para permitir ações de monitoramento sanitário da colônia e manutenção da saúde dos manipuladores desses animais.

Embora a literatura mostre um grande número de estudos de parasitoses gastrointestinais em símios, poucos são os relatos em primatas cativos e em espécies neotropicais (Ximenes, 1997; Michaud et al., 2003; Levecke et al., 2007;). A maioria dos estudos é direcionado para grandes primatas (Kalema-Zikusoka et al., 2002; Rothman et

al., 2002; Mul et al., 2007), para os catarrinos (Melfi e Poiser, 2007; Jha et al. 2011; Pamar et al., 2012), para espécies neotropicais em vida livre (Stuart et al., 1993; Santos et al., 2004; Angonesi et al., 2009; Conga et al., 2013) e para animais confinados em zoológicos (Levecke et al., 2007; Cordón et al., 2008; Lim et al., 2008). Neste contexto, objetivou-se avaliar a prevalência estimada de parasitoses gastrintestinais de primatas não humanos cativos de dois centros de criação, um de pesquisa em saúde pública e outro de conservação de espécies, localizados no estado do Rio de Janeiro, correlacionando a positividade das parasitoses, bem como a frequência de trofozoíto de *Balantidium coli*, com as diferentes espécies de animais.

2. Material e Métodos

Este estudo recebeu parecer favorável pelo Comitê de Ética Animal (CEUA-Fiocruz), nº de linceça LW57/12, protocolo nº P 79/11-2 e mantém licença atualizada anual do SISBIO – IBAMA, sob número de protocolo 31900-2.

2.1 Local do estudo

O estudo foi conduzido em dois criatórios de primatas não humanos localizados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Um deles foi o Centro de criação de animais de laboratório (Cecal), situado no bairro de Manguinhos, dentro da Fundação Oswaldo Cruz. Nesse, os animais mantidos em cativeiro são destinados a pesquisa de enfermidades com importância em saúde pública, como a malária entre outras. O outro foi o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, (CPRJ/INEA), localizado no município de Guapimirim, situado geograficamente entre os paralelos de 22°27' e 22°32' S e os meridianos de 42°50' e 42°56' W. O principal objetivo dessa instituição é desenvolver pesquisas sobre a biologia das espécies de primatas não humanos neotropicais e seu habitat, de modo a favorecer ações de conservação, pois todas exemplares de símios do CPRJ estão em maior ou menor grau de extinção.

O Cecal possui quatro espécies de primatas não humanos, sendo que duas são do VM do gênero *Macaca* e duas espécies do Novo Mundo do gênero *Saimiri*. Já o CPRJ, abriga várias espécies de primatas do NM pertencentes aos gêneros *Cebuella*, *Callithrix*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callimico*, *Aotus*, *Callicebus*, *Saimiri*, *Cebus*, *Pithecia*, *Chryoptes*, *Cacajao*, *Alouatta*, *Ateles*, *Brachyteles* (Tabela 1). Em ambas as instituições os símios ficam abrigados em recintos familiares, sendo que no CPRJ, algumas espécies ficam em recintos individuais.

O criatório do Cecal possui três grandes colônias, que ficam localizadas em espaços físicos distintos. Em geral os recintos possuem uma parte coberta e outra descoberta, assoalho cimentado e troncos de árvores para enriquecimento ambiental. Já o CPRJ está localizado próximo à Mata Atlântica, sendo seus recintos dispostos em ambiente natural, cercado por floresta. Esse possui quatro ambientes divididos em setores. Os recintos são enriquecidos com troncos de árvores e chão coberto com folhas secas. Em ambas as instituições, não é permitida a visitação pública, a higiene das instalações é realizada de forma rotineira, os alimentos são colocados em vasilhames diariamente e os animais recebem tratamento antiparasitário por pelo menos uma vez ao ano.

2.2 Amostras fecais

No período de agosto de 2012 a janeiro de 2014 foram coletadas 1115 amostras fecais de primatas não humanos, sendo 960 do Cecal e 155 do CPRJ. Optou-se por coletar as amostras fecais do assoalho dos recintos dos primatas, para minimizar o estresse consequente do processo de contenção animal. As coletas foram padronizadas de acordo com cada local estudado. Nos recintos do Cecal, há um grande número de animais com pouca variedade de espécies. Nesse, as coletas foram feitas de forma pontual (uma única vez em cada recinto). A quantidade de amostra coletada foi idêntica à quantidade de primatas habitante de cada recinto.

Já no CPRJ há uma grande variedade de espécies de primatas com menor quantidade de exemplares do que no Cecal. Nesse local, a maioria dos símios pertencem aos gêneros *Mico*, *Saguinus*, *Callithrix* e *Leontopithecus*, sendo, portanto, primatas de menor porte que defecam um pequeno volume fecal. Para aumentar o volume da amostra e com isso garantir a realização com qualidade das técnicas laboratoriais, optou-se por coletar o material em triplicata (três dias consecutivos) de cada recinto. As triplicatas foram consideradas uma única amostra (pool de amostra). Ao final foi coletado no mínimo um pool de amostra por recinto.

Para todas as coletas deu-se preferência por conteúdos fecais frescos, que foram depositados em coletores plásticos de 80 mL sem conservante químico, sendo posteriormente acondicionados em recipientes isotérmicos.

2.3 Técnicas laboratoriais

Uma parte do material foi imediatamente processado pelo exame direto com solução salina tamponada para identificar a presença de trofozoítos de *Balantidium coli*. Outra parte da amostra foi homogeneizada e o filtrado foi aliquoteado em tubos de

centrífuga com volume de 15 mL de fundo cônico para a realização das técnicas de centrífugo sedimentação de Ritchie (1948) modificada por Young et al. (1979), centrífugo flutuação de Faust et al. (1938); centrífugo flutuação de Sheather (1923) modificada por Huber et al. (2003). Parte do filtrado foi submetido à técnica de sedimentação espontânea de Lutz (1919);

A leitura das lâminas obtidas em cada técnica foi realizada em microscópio óptico Olympus® BX41, inicialmente, em aumento de 100 vezes e, para confirmação, se necessário, em 400 vezes. Para morfometria das formas evolutivas de parasitos foi utilizado o microscópio óptico Olympus® CH30 em 400 vezes acoplado a uma ocular micrométrica.

2.4 Análise dos dados

A amostra fecal foi considerada positiva quando detectada pelo menos uma forma evolutiva de parasito (trofozoíto, ovo, larva, cisto e/ou oocisto). A estimativa de prevalência foi realizada dividindo o número de amostras positivas pelo número total de amostras coletadas de cada grupo de animais estudados. Foi utilizado o teste X^2 com o programa estatístico SPSS (versão 11.7, SPSS® Inc., Chicago, IL, 1999) com grau de confiança de 5%, para analisar a frequência de amostras com formas evolutivas de parasitos entre os diferentes locais e espécies estudadas.

Tabela 1. Espécies de primatas não humanos, quantidade de recintos e total de amostras fecais coletadas de animais cativos de dois centros de criação no Rio de Janeiro, Brasil

| Primatas não humanos | | Número de recintos | Número total de animais | Número de amostras coletadas |
|--|-------------------------------|--------------------|-------------------------|------------------------------|
| Nome científico | Nome comum | | | |
| Cecal | | | | |
| <i>Saimiri sciureus</i> | Macaco de cheiro | 22 | 285 | 285 |
| <i>Saimiri ustus</i> | Macaco de cheiro | 2 | 11 | 11 |
| <i>Macaca fascicularis</i> | Cynomolgus | 8 | 85 | 85 |
| <i>Macaca mulatta</i> | Rhesus | 19 | 579 | 579 |
| *CPRJ | | | | |
| <i>Cebuella pygmaea</i> | Sagui leãozinho | 1 | 3 | 1 |
| <i>Callithrix aurita</i> | Sagui da serra escuro | 2 | 4 | 2 |
| <i>Callithrix jacchus</i> | Sagui de tufos brancos | 2 | 4 | 2 |
| <i>Callithrix penicillata</i> | Sagui de tufos pretos | 2 | 3 | 4 |
| <i>Callithrix geoffroyi</i> | Sagui da cara branca | 2 | 3 | 2 |
| <i>Callithrix</i> Híbrido | - | 7 | 12 | 9 |
| <i>Calibella humilis</i> | Sagui anão | 1 | 1 | 1 |
| <i>Mico chrysoleucus</i> | Sagui ouro e branco | 1 | 1 | 2 |
| <i>Mico humeralifer</i> | Sagui de santarém | 2 | 7 | 2 |
| <i>Mico melanurus</i> | Sagui do serrado | 1 | 2 | 1 |
| <i>Mico saterei</i> | Sagui Sateré | 1 | 1 | 1 |
| <i>Saguinus bicolor</i> | Sagui de duas cores | 4 | 11 | 5 |
| <i>Saguinus midas</i> | Sagui de mãos amarelas | 3 | 11 | 3 |
| <i>Saguinus niger</i> | Sagui de mãos pretas | 4 | 8 | 4 |
| <i>Saguinus ochraceus</i> | Sagui com rosto nú | 1 | 1 | 1 |
| <i>Saguinus martinsi</i> | Sagui Martin's | 2 | 2 | 2 |
| <i>Saguinus</i> Híbrido | - | 2 | 1 | 2 |
| <i>Leontopithecus chrysomelas</i> | Mico leão da cara dourada | 37 | 73 | 39 |
| <i>Leontopithecus chrysopygus</i> | Mico leão preto | 9 | 19 | 9 |
| <i>Leontopithecus rosalia</i> | Mico leão dourado | 2 | 8 | 2 |
| <i>Leontopithecus</i> Híbrido | - | 3 | 5 | 3 |
| <i>Callimico goeldii</i> | Sagui - Goeldi | 1 | 1 | 1 |
| <i>Aotus nigriceps</i> + <i>Aotus trivigartus</i> | Macaco da noite | 1 | 2 | 1 |
| <i>Callicebus melanochir</i> + <i>Callicebus personatus</i> | Sauá | 1 | 2 | 2 |
| <i>Callicebus moloch donacophilus</i> + <i>C. personatus</i> | Sauá | 1 | 3 | 3 |
| <i>Saimiri sciureus</i> | Macaco de cheiro | 1 | 1 | 1 |
| <i>Cebus</i> sp. | - | 3 | 5 | 4 |
| <i>Cebus/Sapajus robustus</i> | Macaco prego | 2 | 7 | 7 |
| <i>Cebus/Sapajus xanthosternos</i> | Macaco prego do peito amarelo | 3 | 14 | 18 |
| <i>Cebus apella</i> | Macaco prego | 1 | 1 | 1 |
| <i>Pithecia monachus</i> | Macaco velho | 3 | 1 | 3 |
| <i>Chiropotes satanas</i> | Cuxiú-preto | 1 | 1 | 1 |
| <i>Cacajao melanocephalus</i> | Uacari | 1 | 3 | 4 |
| <i>Alouatta guariba clamitans</i> + <i>Alouatta caraya</i> | Bugio | 1 | 2 | 1 |
| <i>Ateles paniscus</i> | Macaco aranha | 2 | 2 | 3 |
| <i>Brachyteles arachnoides</i> | Muriqui | 1 | 6 | 8 |

*Amostra constituída por triplicata (três dias consecutivos).

3. Resultados

Foram coletadas 1115 amostras fecais, sendo 633 (56,7%) positivas para uma ou mais formas evolutivas de parasitos gastrintestinais. Destas 578 (91,3%) apresentavam protozoários e 47 (7,4%) helmintos. Das 960 amostras coletadas no Cecal, em 62,3% foram detectadas protozoários e/ou helmintos, enquanto que das 155, coletadas do CPRJ, somente em 22,5% foram diagnosticadas formas evolutivas compatíveis com parasitos, existindo diferença significativa ($p < 0,05$) no valor global das parasitoses entre as duas instituições (Tabela 2).

Nos recintos do Cecal, a maior frequência parasitária foi para *Balantidium coli* (47,6%), seguido de *Entamoeba* sp. (38,3%). Essa positividade ocorreu principalmente nas amostras do gênero *Macaca* (Tabela 3). No CPRJ, *B. coli* foi detectado em amostras de *Cebus* sp. (13,3%) e *Leontopithecus* sp (3,7%); e cistos de *Entamoeba* sp. em amostras de *Callicebus* sp. (60%), *Pithecia* sp.(33,3%) e *Cebus* sp. (3,3%) (Tabela 4 e 5).

De forma geral, no Cecal esses protozoários foram proporcionalmente mais frequentes do que no CPRJ, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Além desses, também foi evidenciado, somente em fezes de *Saimiri sciureus* do Cecal, cistos de *Giardia duodenalis* (1,7%) (Tabela 3).

Foram detectados ovos de *Trichuris trichiura* somente em amostras fecais de Rhesus (18,9%). Nas amostras coletadas de recintos de *Saimiri* de ambas as espécies do Cecal foram diagnosticadas ovos da Superfamília Rhabdithoidea, os quais, também foram observados em fezes de *Callicebus* sp. do CPRJ. Ovos do cestódeo, *Hymenolepis* sp. foram detectados em ambos os criatórios, em amostras fecais de *Saimiri sciureus* do Cecal e de *Aotus* sp., *Callicebus* sp. e de *Cacajao* sp. do CPRJ (Tabela 3-5).

Larvas de nematódeos foram observadas em recintos das duas Instituições, sendo no CPRJ a forma evolutiva mais frequente. No Cecal, tais estruturas, foram somente detectadas em amostras de *Saimiri sciureus* (Tabela 3-5). Apenas nas amostras fecais de *Leontopithecus* sp. foram observados ovos da Família Oxyuridae (3,7%) e da Família Acanthocephalidae (1,6%) (Tabela 5). Ovos de *Ascaris lumbricoides* foram detectados em amostras de *Cebus* sp. (3,3%).

Poliparasitismo foi evidenciado tanto no Cecal, 453/598 (75,7%) quanto no CPRJ, 12/35 (34,3%). A associação mais frequente no Cecal, ocorreu entre *B. coli* e *Entamoeba* sp. (30,83%). No CPRJ as principais associações foram entre larvas de nematódeos e ovos da Superfamília Rhabdithoidea (2,6%) (Dados não mostrados em tabela). Na Tabela 6, observam-se as espécies de primatas que apresentaram positividade para formas

evolutivas de *B. coli*. *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*, apresentaram as mais altas frequências, sem diferença estatística significativa para detecção de trofozoítos ($p>0,05$).

Tabela 2. Formas evolutivas de parasitos gastrintestinais detectadas nas amostras fecais de primatas não humanos cativos de dois centros de criação localizadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

| | Cecal | CPRJ | p -Valor |
|--|-------------|------------|----------|
| Amostras positivas para formas evolutivas de parasitos | 598 (62,3%) | 35 (22,5%) | 0,000* |
| Protozoários | | | |
| <i>Balantidium coli</i> | 457 (47,6%) | 6 (3,87%) | 0,000* |
| <i>Giardia duodenalis</i> | 5 (0,5%) | 0 | 0,604 |
| <i>Entamoeba sp.</i> | 368 (38,3%) | 5 (3,2%) | 0,000* |
| Oocisto de Coccídio | 2 (0,2%) | 0 | 0,364 |
| Nematoda | | | |
| <i>Trichuris trichiura</i> | 110 (11,4%) | 0 | 0,000* |
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | 0 | 1 (0,6%) | 0,140 |
| Ovo da Superfamília Rhabdithoidea | 3 (0,3%) | 7 (4,5%) | 0,002* |
| Larva de nematódeo | 9 (0,9%) | 20 (12,9%) | 0,000* |
| Família Oxyuridae | 0 | 2 (1,2%) | 0,003* |
| Cestoda | | | |
| <i>Hymenolepis sp.</i> | 9 (0,9%) | 10 (6,4%) | 0,012* |
| Família Acanthocephalidae | 0 | 1 (0,6%) | 0,140 |

Teste não paramétrico X^2 .

*Diferença estatística significativa ($P<0,05$) entre Cecal e CPRJ.

Tabela 3. Frequência de amostras positivas para formas evolutivas de parasitos gastrintestinais detectados em quatro diferentes espécies de primatas não humanos do Cecal, RJ.

| Cecal | <i>Saimiri sciureus</i> | <i>Saimiri ustus</i> | <i>Macaca fascicularis</i> | <i>Macaca mulatta</i> | Total |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------|
| Tamanho do grupo | 285 | 11 | 85 | 579 | 960 |
| Número de Amostras | 285 | 11 | 85 | 579 | 960 |
| Amostras positivas para formas evolutivas de parasitos | 26 | 1 | 78 | 493 | 598 |
| | (9.1%) | (1%) | (88.2%) | (85.1%) | (62.2%) |
| Protozoários | | | | | |
| <i>Balantidium coli</i> | 5 (1.7%) | 0 | 72 (84.7%) | 380 (65.6%) | 457 (47.6%) |
| <i>Giardia duodenalis</i> | 5 (1.7%) | 0 | 0 | 0 | 5 (0.5%) |
| <i>Entamoeba sp.</i> | 0 | 0 | 51 (60%) | 317 (54.7%) | 368 (38.3%) |
| Oocisto de Coccídio | 0 | 0 | 0 | 2 (0.3%) | 2 (0.2%) |
| Nematoda | | | | | |
| <i>Trichuris trichiura</i> | 0 | 0 | 0 | 110 (18.9%) | 110 (11.45%) |
| Ovo da Superfamília Rhabdithoidea | 2 (0.7%) | 1 (1%) | 0 | 0 | 3 (0.3%) |
| Larva de nematódeo | 9 (3.1%) | 0 | 0 | 0 | 9 (0.9%) |
| Cestoda | | | | | |
| <i>Hymenolepis sp.</i> | 9 (3.1%) | 0 | 0 | 0 | 9 (0.9%) |

Tabela 4. Frequência de amostras positivas para formas evolutivas de parasitos gastrintestinais detectados em diferentes gêneros de primatas não humanos da família Callitrichidae cativos do CPRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

| CPRJ | <i>Callithrix</i> sp. | <i>Cebuella</i> <i>pygmaea</i> | <i>Calibella</i> <i>humilis</i> | <i>Mico</i> sp. | <i>Saguinus</i> sp. | <i>Leontopithecus</i> sp. | <i>Callimico</i> <i>goeldii</i> | Total |
|---|--------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------|
| Tamanho do grupo | 26 | 3 | 1 | 11 | 34 | 105 | 1 | 181 |
| Número de amostras | 19 | 1 | 1 | 6 | 15 | 53 | 1 | 98 |
| Amostras com formas evolutivas de parasitos | 0 | 0 | 0 | 1 (16.6%) | 0 | 6 (11.3%) | 0 | 7 (7.1%) |
| Protozoários | | | | | | | | |
| <i>Balantidium coli</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (3.7%) | 0 | 2 (2%) |
| Nematoda | | | | | | | | |
| Larva de nematódeo | 0 | 0 | 0 | 1 (16.6%) | 0 | 2 (3.7%) | 0 | 0 |
| Família Oxyuridae | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (3.7%) | 0 | 0 |
| Família Acanthocephalidae | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (1.8%) | 0 | 1 (1%) |

Tabela 5. Frequência de amostras positivas para formas evolutivas de parasitos gastrintestinais detectados nos primatas não humanos dos gêneros *Aotus*, *Callicebus*, *Saimiri*, *Cebus*, *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao*, *Alouatta*, *Ateles*, *Brachyteles* cativos do CPRJ.

| CPRJ | <i>Aotus</i> sp. | <i>Callicebus</i> sp. | <i>Saimiri</i> <i>sciureus</i> | <i>Cebus</i> sp. | <i>Pithecia</i> <i>monachus</i> | <i>Chyroptes</i> <i>satanas</i> | <i>Cacajao</i> <i>melanocephalus</i> | <i>Alouatta</i> sp. | <i>Ateles</i> <i>paniscus</i> | <i>Brachyteles</i> <i>arachnoides</i> | Total |
|---|---------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|------------------------|----------------------------------|--|----------------|
| Tamanho do grupo | 2 | 5 | 1 | 27 | 1 | 1 | 3 | 2 | 2 | 6 | 50 |
| Número de amostras | 1 | 5 | 1 | 30 | 3 | 1 | 4 | 1 | 3 | 8 | 57 |
| Amostras com formas evolutivas de parasitos | 1 (100%) | 5 (100%) | 0 | 18 (60%) | 1 (33.3%) | 0 | 2 (50%) | 0 | 1 (33.3%) | 0 | 28 (49.1%) |
| Protozoários | | | | | | | | | | | |
| <i>Balantidium coli</i> | 0 | 0 | 0 | 4 (13.3%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 (7%) |
| <i>Entamoeba</i> sp. | 0 | 3 (60%) | 0 | 1 (3.3%) | 1 (33.3%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 (8.7%) |
| Nematoda | | | | | | | | | | | |
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | 0 | 0 | 0 | 1 (3.3%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (1.7%) |
| Ovo da Superfamília Rhabdithoidea | 0 | 1 (20%) | 0 | 6 (20%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 (12.2%) |
| Larva de nematódeo | 0 | 0 | 0 | 15 (50%) | 0 | 0 | 1 (25%) | 0 | 1 (33.3%) | 0 | 17 (29.8%) |
| Cestoda | | | | | | | | | | | |
| <i>Hymenolepis</i> sp. | 1 (100%) | 4 (80%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (25%) | 0 | 0 | 0 | 10 (17.54%) |

Tabela 6. Frequência de cisto e trofozoíto de *Balantidium coli* em amostras fecais de *S. sciureus*, *M. fascicularis*, *M. mulatta*, *L. chrysomelas* e *Cebus* sp. cativos de Cecal e CPRJ.

| | <i>Saimiri sciureus</i> | <i>Macaca fascicularis</i> | <i>Macaca mulatta</i> | <i>Leonthopitecus</i> sp. | <i>Cebus</i> sp. |
|---------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------|------------------|
| Cisto de <i>B. coli</i> | 4 (1.4%) | 47 (55.2%) | 273 | 1 (1.9%) | 4 (13.3%) |
| Trofozoíto <i>B. coli</i> | 1 (0.4%) | 25 (29.4%)* | 107 (18.5%)* | 1 (1.9%) | 0 |
| Total <i>B. coli</i> | 5 (1.7%) | 72 (84.7%) | 380 (65.6%) | 2 (3.7%) | 4 (13.3%) |

Teste não paramétrico χ^2 . * Sem diferença estatística entre espécies ($p > 0,05$).

4. Discussão

Sabe-se que *B. coli* pode parasitar diversos animais, incluindo suínos, avestruzes, humanos e primatas não humanos, apresentando caráter de transmissão zoonótico (Schuster e Ramirez-Ávila, 2008). Assim como no presente estudo, o parasito tem sido relatado em vários grupos de primatas de diversos lugares do mundo, tanto em animais de vida livre quanto cativos (Toft, 1982). O monitoramento do protozoário em primatas em cativeiro é relevante uma vez que, já foi relatado em babuíno (*Papio hamadryas*) imunocompetente determinando quadro clínico de disenteria (Tayib e Abdoun, 2013). Além disso, *B. coli* tem sido apontado como um dos principais parasitos capaz de diminuir o constituinte de gordura em leite de *M. mulatta*, prejudicando o desenvolvimento de lactentes e suas proles (Hinde, 2007).

O estudo das parasitoses gastrintestinais em amostras fecais de primatas não humanos cativos nos dois centros de criação revelou a predominância de formas evolutivas de protozoários principalmente de *Balantidium coli* seguida por *Entamoeba* sp, e baixa de helmintos. Contudo, houve uma grande variação na proporção de amostras positivas entre os dois centros e entre as diferentes espécies de primatas, tendo os *Cynomolgus* e *Rhesus* do Cecal, apresentado as maiores positivities parasitárias. Essa alta frequência pode explicar as diferenças estatísticas significativas entre as duas instituições tanto para o valor global das parasitoses quanto para os protozoários.

Elevada frequência de protozoários também foi observada por Levecke et al. (2007) em primatas cativos (prosímios, Novo Mundo, Velho Mundo e grandes primatas) de quatro zoológicos na Bélgica, por Córdon et al. (2008) em *Papio hamadryas* (babuínos) em zoológico na Espanha e por Lim et al. (2008) em cebídeos, cercopithecídeos, homínídeos e hilobatídeos cativos em zoológico na Malásia.

A presença desses protozoários em animais cativos pode ser associada pela simplicidade de seu ciclo de vida, não necessitando de hospedeiro intermediário, pela alta resistência do cisto no ambiente e pela infectividade da estrutura cística quando eliminada nas fezes (Tanyuksel e Petri, 2003; Thompson e Monis, 2004). Além disso, os protozoários apresentam baixa sensibilidade aos anti-helmínticos utilizados rotineiramente no manejo sanitário de animais cativos e talvez por uma maior sensibilidade de símios catarrinos a infecção por *B. coli* e *Entamoeba* sp. De uma forma geral, animais em cativeiro apresentam menor área de convívio do que em vida livre, o que favorece a transmissão das parasitoses gastrintestinais, pela concentração das suas formas evolutivas.

Neste estudo a identificação das diferentes espécies de *Entamoeba* sp. não foi realizada. Apesar das técnicas laboratoriais utilizadas terem sido qualitativas, pode-se visualizar nas amostras fecais, principalmente de Rhesus, uma alta quantidade de cistos de amebídeos com diferentes características morfológicas. Primatas não humanos podem albergar espécies de amebídeos similares aos encontrados em humanos como: *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba buetschlii*, *Endolimax nana*, complexo *Entamoeba histolytica/E. dispar*, além de *Entamoeba chattoni*, espécie específica de símios (Tachibana et al., 2001 e Stensvold et al., 2010). Sabe-se que a sintomatologia da amebíase em primatas cursa clinicamente similar aos casos humanos e que as infecções por *E. histolytica* tem sido mais relatadas em catarrinos do que platirinos (Toft, 1982), concordando com os resultados do presente estudo.

Cistos de *Giardia duodenalis* foram detectados somente em amostras de *Saimiri sciureus* (1,7%). Frequências de infecção superiores ao do presente estudo em *S. sciureus* (9%) foram detectadas por Levecke et al. (2007) em zoológico, em *Callithrix jacchus* (23,78%) no Núcleo de Primatologia no Rio Grande do Norte, Brasil por Ximenes (1997), em *Alouatta caraya* (27,7%) semi-cativos na Argentina por Milozzi et al. (2012). A genotipagem de *G. duodenalis* em símios tem revelado somente o padrão zoonótico, como, o genótipo A1 detectado em *Alouatta clamitans* cativos de Santa Catarina, Brasil (Volotão et al., 2008) e genótipo B a AB (infecções mistas) em símios cativos de zoológico na Bélgica (Levecke et al., 2009). Vale ressaltar que primatas não humanos cativos, vivem muito próximos ao ser homem, podendo ser suscetíveis a infecções com cepas de *G. duodenalis* de origem humana, determinado por ciclos de transmissão zooantroponóticos.

A frequência global de helmintos neste estudo foi baixa, tendo sido diagnosticados formas evolutivas da Classe Nematoda e Cestoda em ambas as instituições. De acordo com Munene et al. (1998) a baixa prevalência de helmintos geralmente tem sido relatadas em primatas não humanos cativos. Isto resulta da combinação de rotina de higiene sanitária com o uso de quimioprofiláticos regulares. Além disso, Pamar et al. (2012) ressaltam que muitos centros de primatas cativos realizam com frequência exames de fezes periódicos dos animais, mantendo um monitoramento de helmintíases no plantel. Tal prática de manejo sanitário foi utilizada rotineiramente pelos dois centros de criação estudados.

Dentre os nematódeos destacam-se os ovos de *T. trichiura* diagnosticados em Rhesus do Cecal. Ovos de *T. trichiura* também foram evidenciados em amostras de Rhesus de vida livre em florestas da Índia, com positividade superior a deste estudo, por Pamar et al. (2012). Já em amostras fecais de Rhesus do templo de Kathmandu, Nepal (Jha et al. 2011) a positividade para tal helminto foi inferior ao evidenciado no Cecal. Levecke et al. (2007) também estudando cercopithecídeos cativos de zoológico encontraram frequências similares a deste estudo.

Além desse nematódeo também foram detectados, principalmente no CPRJ, ovos de casca fina, ovais, morulados e algumas vezes larvados com mensuração compatíveis com a Superfamília Rhabdithoidea (variação 50 – 60 µm X 27 – 30 µm) e larvas de nematódeos. Optou-se em classificar os ovos nessa superfamília, pois as amostras foram coletadas do assoalho dos recintos, não sendo possível descartar a presença de formas evolutivas de vida livre não patogênica ou de nematódeos patogênicos pertencentes ao gênero *Strongyloides*. Além de ovos, também foram detectados larvas de nematódeos que não foram morfológicamente classificadas. É importante ressaltar que a associação de formas evolutivas mais evidenciada no CPRJ, foi entre larvas de nematódeos e ovos dessa Superfamília, indicando a possibilidade de eclosão desses ovos em ambiente, determinando o encontro das larvas. *Strongyloides* sp. tem sido detectado em orangotangos de vida livre e semi-cativos da Indonésia (Mul et al., 2007), em babuínos e cercopithecídeos cativos da África (Munene et al., 1998) e em *Callithrix jacchus* cativos no Rio Grande do Norte, Brasil (Ximenes et al., 1997).

O encontro de formas evolutivas dos nematódeos *T. trichiura*, ovos da Superfamília Rhabdithoidea, larvas de nematódeos, e também ovos de *Ascaris lumbricoides* detectados em amostra de *Cebus* sp., indicam que o ambiente cativo foi favorável a

evolução de formas parasitárias de geohelmintos até forma infectante, que podem parasitar primatas não humanos e humanos.

Ovos do cestódeo *Hymenolepis* sp. foram evidenciados tanto em *Saimiri sciureus* do Cecal, quanto em amostras fecais de *Aotus* sp., *Callicebus* sp. e *Cacajao melanocephalus* do CPRJ. Nas amostras coletadas dos recintos do Cecal, os ovos do cestódeo eram claros, com saliências mamelonares e diâmetro variando 40 – 50 µm, sendo morfologicamente similares a *H. nana*. No CPRJ, os ovos eram amarelados, não possuíam saliências mamelonares e variavam entre 70 - 80 µm, sendo compatíveis com *H. diminuta*. Positividade para *Hymenolepis* sp. inferiores a deste estudo, foram relatadas por Michaud et al. (2003) em exemplares neotropicais cativos em Centro de Reprodução e Conservação do Peru. Ovos deste cestódeo também foram diagnosticados em *Callicebus personatus nigrifrons* cativos em Minas Gerais, Brasil por Melo et al. (1997). Vale ressaltar que primatas não humanos podem se infectar ingerindo ovos do ambiente, alimentos e água contaminados com fezes de roedores, dos próprios primatas parasitados ou de humanos. Além disso, insetos podem albergar a forma larvar cisticercóide, que também pode infectar os símios quando são ingeridos. Ovos da família Acantocephalidae foram detectados somente em *Leontopithecus* sp. recém chegados ao CPRJ. Os animais ainda permaneciam em quarentena quando foram realizados os exames, o que indica que a infecção do primata ocorreu quando este estava em vida livre.

Formas evolutivas de *B. coli* foram detectadas pelo exame direto tanto em espécies de primatas não humanos do Velho Mundo quanto do Novo Mundo. Amostras fecais de *M. fascicularis* e *M. mulatta* foram as que apresentaram maior frequência de trofozoítos, não apresentando diferenças estatísticas significativas quando comparadas. Nakauchi (1999) também relatou a presença de trofozoíto de *B. coli* em amostras fecais de grandes primatas, chimpanzés e gibão, e em primata do Velho Mundo, *Macaca fuscata*. A elevada liberação de trofozoítos somente nas espécies de Velho Mundo pode indicar maior susceptibilidade destas à infecção por *B. coli*.

Nos centros de criação de primatas não humanos estudados evidenciou-se elevada frequência de protozoários, principalmente no Cecal, onde se encontram *Macaca mulatta* e *M. fascicularis*, que nos exames parasitológicos foram as espécies que apresentaram maior frequência parasitária. A menor positividade parasitária em espécies do neotropicais pode ter ocorrido, pois esses símios passam a maior parte do tempo sobre troncos de árvores, diminuindo o tempo de contato com o chão, onde se encontra a maioria das fezes. Tais resultados demonstram a necessidade de programas sanitários

orientados para controle das parasitoses gastrintestinais, principalmente das protozooses. Cabe ressaltar também a necessidade de mais estudos na área de parasitologia com espécies neotropicais para obtenção de maior conhecimento na epidemiologia das infecções parasitárias.

Agradecimentos

Ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ/INEA) e Cecal/Ficoruz, por disponibilizar material científico. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Pró-reitoria de Pesquisa e Inovação da Universidade Federal Fluminense (PROPPI-UFF) e a Pró-reitoria de Assuntos Estudantis da Universidade Federal Fluminense (PROAES-UFF).

Referências

Angonesi OS, Almeida-Silva B, Mendes SL, Pyrrho AS: Endoparasitos em muriquis do norte, *Brachytelles hypoxanthus*, isolados em pequeno fragmento de mata Atlântica. Neotrop Primates. 2009; 16:15-18.

Carmo AMC, Salgado CA. Ocorrência de parasitos intestinais em *Callithrix* sp. (Mammalia, Primates, Callithrichidae). Rev Bras Zooc. 2003;5: 267-272.

Conga DF, Browler M, Tantalean M, Montes D, Serra-Freire NM, Mayor P: Intestinal helminths in wild Peruvian red uakari monkeys (*Cacajao calvus ucayalii*) in the northeastern Peruvian Amazon. J Med Primatol. 2013:1-4.

Córdon GP, Prados AH, Romero D, Moreno MS, Pontes A, Osuna A, Rosales MJ: Intestinal parasitism in the animals of the zoological garden "Pena Escrita (Almuñecar, Spain). Vet Parasitol 2008; 156: 302-309.

Faust EC, D'antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, Thomen, LF, Tobie JE, Walker JH: A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. Am J Trop Med. 1938; 18:169-183.

Hinde K. Milk composition varies in relation to the presence and abundance of *Balantidium coli* in the mother in captive Rhesus macaques (*Macaca mulatta*). Am J Primatol. 2007; 69:625-634.

Huber F, Bomfim TC, Gomes RS. Comparison between the efficiency of the formaldehyde-ether sedimentation technique and the sugar fluctuation technique for the detection of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* sp. oocysts in fecal samples from calves. Rev Bras Parasitol Vet. 2003;12:135-137.

- Jha A, Chalise MK, Shrestha RM, Karki K. Intestinal parasitic investigation in temple Rhesus Monkeys of Kathmandu. The initiation. 2011; 1 – 7.
- Johnson-Delaney CA: Parasites of Captive nonhuman primates. Vet Clin Exot Anim 2009;12 :563 - 581.
- Kalema-Zikusoka G, Kock RA, Macfie EJ. Scabies in free-ranging mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. Vet Rec. 2002;150:12–15.
- Levecke B, Dorny P, Geurden T, Vercammen F, Vercruyssen J. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. Vet Parasitol. 2007;148: 236–246.
- Levecke B, Geldhof P, Calerebout E, Dorny P, Vercammen F, Cacció SM, Vercruyssen J, Geurden T. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates reveals mixed assemblage A and B infections and novel polymorphism. Int J Parasitol. 2009; 39:1595-1601.
- Lim YAL, Nigui R, Shukri J, Rohela M, Mat Naim HR: Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. Vet Parasitol. 2008; 57:154-159.
- Lutz AO. *Schistosomum mansoni* and Schistomatose according to observations made in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1919;11:121-55.
- Malan FS, Horak IG, Vos V, Van Wik JA: Wildlife parasites: lessons for parasites control in livestock. Vet Parasitol. 1997;71:137–153.
- Melfi V, Poyser F: Trichuris burdens in zoo-housed *Colobus guereza*. Int J Primatol. 2007; 28:1449-1456.
- Melo AL, Neri FM, Ferreira MB: Helminths of Sauás, *Callicebus personatus nigrifrons* (SPIX, 1823), Primates: Cebidae collected during a faunistic rescue during the construction of the Nova Ponte hydroelectric power plant, MG. A Primatologia no Brasil 1997; 6:193-198.
- Michaud C, Tantalean M, Ique C, Montoya E, Gozalo A. A survey for helminth parasites in feral New World non-human primate populations and its comparison with parasitological data from man in the region. J Med Primatol. 2003;32 :341-345.
- Milozzi C, Bruno G, Cundom E, Mudry MD, Navone GT. Intestinal parasites of *Alouatta caraya* (Primates, Ceboidea): preliminary study in semi-captive and in the wild in Argentina. Mastozool neotrop. 2012; 19: 271-278.
- Mul IF, Paembonan W, Singleton I, Wich SA, Van Bolhuis G. Intestinal parasites of free-ranging, semicaptive, and captive *Pongo abelli* in Sumatra, Indonesia. Int J Primatol 2007; 28: 407-420.
- Munene E, Otsyula M, Mbaabu D, Mutahi WT, Muriuki SMK. Helminth and protozoan gastro-intestinal (GIT) parasites in captive and wild-trapped African non human primates. Vet Parasitol. 1998;78:1995–2201.

- Nakauchi K. The prevalence of *Balantidium coli* infection in fifty-six mammalian species. J Vet Med Sci. 1999; 61: 63–65.
- Pamar SM, Jani RG, Mathakiya RA. Study of parasitic infections in non-human primates of Gujarat state, India. Vet World. 2012; 5:362-364.
- Pourrut X, Dikko JLD, Somo RM, Bilong Bilong CF, Delaporte E, Lebreton M, Gonzalez JP. Prevalence of gastrointestinal parasites in primate bushmeat and pets in Cameroon. Vet Parasitol. 2011; 175: 187-191.
- Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Unit S Arm Med Depart Bull. 1948; 8: 326.
- Rothman JM, Bowman DD, Eberhard ML, Pell AN. Intestinal parasites found in the research group of mountain gorillas in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda-Preliminary results. Ann New York Academ Sci. 2002; 969:346–349.
- Sanchez VVV, Patiño AS, Segundo VJP, Sandoval JAC, Esquivel CVC, Sanchez TAC. Prevalence of gastrointestinal parasites among captive primates in Panama. J Anim Vet Adv. 2009; 8: 2644-2649.
- Santos SM, Nogueira CP, Carvalho AR, Strier KB. Levantamento coproparasitológico em muriqui (*Brachyteles arachnoides hipoxanthus*) da estação biológica de Caratinga, Minas Gerais. A Primatologia no Brasil. 2004; j8: 327-332.
- Schuster FL, Ramirez-Avila L. Current world status of *Balantidium coli*. Clin Microbiol Rev. 2008; 21:626-638.
- Sheather AT. The detection of intestinal protozoa and monge parasites by a flotation technique. J Comp Pathol. 1923; 36: 266-275.
- Stensvold CR, Lebbad M, Clark CG. Genetic characterisation of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* spp. from ruminants. Int J Parasitol. 2010; 40: 775-778.
- Stuart MD, Strier KB, Pierberg SM. A coprological survey of parasites of wild muriquis *Brachyteles arachnoides*, and Brown Howling Monkeys, *Alouatta fusca*. J Heminthol Soc Wash. 1993; 60: 111-115.
- Tachibana H, Cheng XJ, Kobayashi S, Matsuabayashi N, Gotoh S, Matsuabayashi K. High prevalence of infection with *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, in captive macaques. Parasitol Res. 2001; 87: 14-17.
- Tanyuksel M, Petri WA. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. 2003; 16:713–729.
- Tayib OA, Abdoun KA. *Balantidium coli* infection in Hamadryas Baboon in Saudi Arabia. A Case Report. J Anim Plant Sci. 2013; 23: 940-943.
- Toft JD. The pathoparasitology of the alimentary tract and pancreas of nonhuman primates: A review. Vet Pathol. 1982; 9: 44-85.

Thompson RCA, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol.* 2004; 58:69–137.

Volotão ACC, Souza Júnior JC, Grassini C, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from Brown Howler Monkeys (*Alouatta clamitans*) from Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 158:133-137.

Ximenes MFFM. Parasitismo por helmintos e protozoários no sagui comum (*Callithrix jacchus*). *A Primatologia no Brasil.* 1997; 6:249-256.

Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol.* 1979;10: 852-853.

5.3 CAPÍTULO 3

Este capítulo pleitea o objetivo: - Determinar a frequência de Balantidium sp. em profissionais tratadores de suínos e primatas não humanos;

Situação: Sob correção pelos orientadores e colaboradores.

Versão em português do artigo.

Contexto: a frequência de Balantidium sp. foi realizada por meio de levantamento coparasitológico em amostras fecais de humanos, sendo registrado também outras enteroparasitoses.

Avaliação da frequência de *Balantidium coli* em tratadores de suínos e primatas não humanos no estado do Rio de Janeiro

Alyne da Silva Barbosa¹, Otilio Machado Pereira Bastos², Claudia M. Antunes Uchôa², Laís Verdán Dib¹ e Maria Regina Reis Amendoeira¹

1. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro). Instituto Oswaldo Cruz. Laboratório de Toxoplasmose, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.
2. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, São Domingos, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

Esta comunicação relata a frequência de *Balantidium coli* nos tratadores de suínos e primatas não humanos que trabalham em criatórios localizados em distintos municípios do estado do Rio de Janeiro. No período de 2012 a 2014, foram coletadas 104 amostras fecais, totalizando 52 tratadores, 790 amostras fecais de suínos e 1115 de primatas não humanos. Todas as amostras foram coletadas sem conservante químico, sendo submetidas às técnicas de Faust et al., Sheather modificada, Ritchie modificada, Lutz e exame direto. Formas evolutivas de *B. coli* não foram detectadas nas amostras fecais dos tratadores, porém foram evidenciadas em 49,2% dos suínos e em 41,5% do material fecal dos símios. A ausência da balantidiose em humanos, mesmo que estejam em contato próximo com animais parasitados, como demonstrado neste estudo, pode ter ocorrido devido à adoção de adequadas medidas higiênico sanitárias na manipulação desses animais ou devido à resistência humana a infecção por esse protozoário.

Palavras-chave: Balantidiose; Tratadores animais; Zoonose; Parasitoses intestinais.

1. Introdução

Balantidium coli é o único protozoário ciliado que infecta os humanos, embora possa parasitar uma grande diversidade de animais. Suínos e primatas não humanos são considerados os reservatórios mais importantes da parasitose, favorecendo a transmissão zoonótica (Walzer e Healy, 1982; Nakauchi, 1999). A infecção é adquirida de forma indireta pela ingestão de cistos contaminando água e alimentos, ou pelo

contato direto com hospedeiros infectados, o que torna médicos veterinários e tratadores de animais, os principais grupos de risco (Woody e Woody, 1960; Schuster e Ramirez – Ávila, 2008).

O protozoário é essencialmente um parasito de intestino grosso, habitando, principalmente a regiões de ceco e cólon (Zaman, 1978; Schuster e Ramirez - Ávila, 2008). O parasito pode causar nos hospedeiros infectados manifestações clínicas, que variam desde casos assintomáticos até quadros clínicos de gastrinterites severas com episódios de disenteria, que pode evoluir para o óbito (Dorfman et al., 1984; Vásquez e Vidal, 1999; Schuster e Ramirez - Ávila, 2008).

Infecções por *B. coli* foram relatadas em diversas partes do mundo, sendo que os maiores focos endêmicos foram documentados nas Américas Central e do Sul; Filipinas; Papua Nova Guiné; região da antiga Pérsia; Ásia Central e do Sul e algumas ilhas do Pacífico (Zaman, 1978; Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006).

As informações sobre a ocorrência da balantidiose humana são escassas (Hernández e Rivera, 1991). No Brasil, Machado et al. (1969) relataram a frequência da parasitose em 0,74% dos pacientes atendidos no município de Niterói, Rio de Janeiro. Dos nove pacientes diagnosticados somente dois tinham contato com suínos. Em hospitais no estado do Pará, Vasconcelos (1981) relatou 0,9% de positividade para *B. coli* em 110 crianças que apresentavam quadro clínico de diarreia aguda. Em 2005, em estudo de levantamento de dados secundários de prontuários de pessoas atendidas em hospitais no município de Concórdia, Santa Catarina, Marques et al. (2005) demonstraram a frequência do parasito em 0,2% dos casos atendidos. Já Pereira (2010) estudando as parasitoses em escolares em Jequié na Bahia evidenciou 0,74% de positividade para o protozoário.

B. coli é considerado um patógeno negligenciado, sendo pouco estudado (Schuster e Ramirez-Ávila, 2008). Walzer et al. (1973) ressaltaram que a maioria dos relatos de balantidiose humana são de casos clínicos de indivíduos sintomáticos, casos com complicações ou fatais, sendo poucos os relatos de surtos ou inquéritos coproparasitológicos específicos para pesquisa deste protozoário. Diante da escassez de informações sobre a epidemiologia deste parasito e tendo em vista que os tratadores de animais são grupo de risco de aquisição da balantidiose. Este estudo teve como objetivo determinar a frequência de *B. coli* em material fecal de tratadores de suínos e primatas não humanos que trabalham em criatórios localizados em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro.

2. Material de Métodos

2.1 Local do estudo

O estudo foi conduzido em nove granjas de suínos e em dois criatórios de primatas não humanos localizados em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro. As granjas de suínos participantes estão situadas nas cidades de Itaboraí, Maricá, Petrópolis, Rio Bonito, Saquarema, Silva Jardim, Casimiro de Abreu e Itaperuna. Os criatórios dos primatas não humanos incluídos na pesquisa foram o Setor criação de animais de laboratório (Cecal), situado no bairro de Manguinhos, dentro da Fundação Oswaldo Cruz e no Centro de Primatologia do estado do Rio de Janeiro, (CPRJ/INEA), localizado no município de Guapimirim.

2.2 População do estudo

A pesquisa de *B. coli* foi realizada no período agosto de 2012 a janeiro de 2014. O inquérito parasitológico envolveu 104 amostras fecais dos tratadores de suínos e primatas não humanos, 790 amostras de suínos e 1115 dos símios cativos.

2.3 Considerações Éticas

O estudo obteve parecer favorável em 18 de junho de 2012 do Comitê de Ética Humano (CEP/IOC), protocolo nº648/12, em 02 de julho de 2012 do Comitê de Ética Animal (CEUA-Fiocruz), nºde licença LW57/12, protocolo nº P 79/11-2 e do SISBIO – IBAMA, sob número de protocolo 31900-2. Após esclarecimentos sobre o estudo, os manipuladores que aceitaram participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

2.4 Coleta de amostras

Os participantes receberam um kit de coleta de fezes que continha dois coletores fecais de cor branca com capacidade de 80 mL etiquetados sem conservante, duas pazinhas de madeira primoutilizados e um informe detalhando o procedimento de coleta. Também, foi explicado verbalmente a cada pessoa que a amostra deveria ser coletada de dois dias distintos, armazenadas em temperatura de geladeira e

identificadas com nome e data de coleta. O recolhimento dos coletores foi realizado de forma programada com cada tratador.

Também foram coletadas 790 amostras fecais de suínos, sendo: 88 de propriedades familiares dos municípios de Rio Bonito (21), Araruama (7), Saquarema (12), Maricá (8), Itaboraí (12), Casimiro de Abreu (23) e Silva Jardim (5) e 702 de granjas do tipo industriais de Petrópolis (479) e Itaperuna (223). As amostras foram coletadas individualmente diretamente da ampola retal com luva de palpação longa, sendo posteriormente identificadas, acondicionadas em recipiente isotérmico. Para os primatas não humanos cativos optou-se por coletar as amostras fecais do assoalho dos seus recintos, minimizando o estresse consequente do processo de contenção animal. Ao todo foram coletadas 1115 amostras fecais dos símios, sendo 960 do Cecal e 155 do CPRJ. Para as coletas deu-se preferência por conteúdos fecais frescos, que foram depositados em coletores plásticos de 80 mL sem conservante químico, sendo posteriormente acondicionados em recipientes isotérmicos. Todas as amostras fecais foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense para análises.

2.5 Processamento laboratorial

Uma parte do material fecal foi imediatamente processada pelo exame direto com solução salina tamponada para identificar a presença de trofozoítos de *B. coli*. Outra parte da amostra foi homogeneizada e o filtrado foi alíquotado em tubos de centrífuga com volume de 15 mL de fundo cônico para a realização das técnicas de centrífugo sedimentação de Ritchie (1948) modificada por Young et al. (1979), centrífugo flutuação de Faust et al. (1938); centrífugo flutuação de Sheather (1923) modificada por Huber et al. (2003). Parte do filtrado foi submetido à técnica de sedimentação espontânea de Lutz (1919);

A leitura das lâminas obtidas em cada técnica foi realizada em microscópio óptico Olympus® BX 41, inicialmente, em aumento de 100 vezes e, para confirmação, se necessário, em 400 vezes.

3. Resultados

Ao total foram processadas 104 amostras fecais humanas, constituindo 52 tratadores de animais. Nas propriedades familiares de suínos, os tratadores, na grande maioria, foram constituídos pelos proprietários dos animais e em alguns casos, por membros de sua família. Na granja familiar de Rio Bonito aderiram ao estudo cinco pessoas (100%), em Araruama um (100%), Saquarema três (100%), Maricá dois (100%), Itaboraí um (50%), Silva Jardim um (100%) e Casimiro de Abreu dois (100%). Nas granjas industriais, o grupo dos tratadores foi composto por auxiliares de manejo e em alguns casos, como em Itaperuna, também pelos proprietários, sendo que na granja de Petrópolis seis (60%) pessoas participaram e em Itaperuna quatro (100%). Nos criatórios de símios a maioria do grupo de tratador era composto por auxiliares de manejo e em alguns casos por médicos veterinários. Nos CPRJ/INEA, 14 (77,7%) pessoas participaram do estudo e no Cecal/Fiocruz, 13 (50%).

Formas evolutivas de *B. coli* não foram diagnosticadas nas amostras dos tratadores de suínos e primatas não humanos, porém foram detectadas em 49,4% e 41,5% das amostras fecais coletadas de suínos e primatas não humanos, respectivamente (Tabela 1).

Outros protozoários e também helmintos foram evidenciados no material fecal das pessoas. Em três tratadores do Centro de Primatologia de Guapimirim e nas propriedades familiares de suíno de Rio Bonito, Silva Jardim e Casimiro de Abreu. A frequência dos parasitos foi: 3,8% de ancilostomídeos, 1,9% de *Trichuris trichiura*, 3,8% de cistos do complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em amostras do Centro de Primatologia de Guapimirim. Associação de *Entamoeba coli* e *Giardia duodenalis* apresentou frequência de 1,9%, sendo diagnosticadas em amostra de Rio Bonito e obteve-se 3,8% de positividade para *Endolimax nana* que foi detectada em Silva Jardim e em Casimiro de Abreu.

Tabela 1. Frequência de *Balantidium coli* em amostras fecais de suínos, primatas não humanos e seus tratadores.

| | Total de amostras | <i>Balantidium coli</i> |
|----------------------|-------------------|-------------------------|
| tratadores | 104 | 0 |
| Suínos | 790 | 389 (49,2%) |
| Primatas não humanos | 1115 | 463 (41,5%) |

4. Discussão

Todas as amostras fecais analisadas dos tratadores dos animais, tanto as que tinham contato com suínos ou com primatas não humanos, resultaram em negativas para formas evolutivas de *B. coli*, embora tenha sido detectada elevada frequência do parasito no material fecal dos animais. Diagnóstico elevado de *B. coli* em amostras de suínos (acima de 60%) e resultado negativo nos exames de fezes dos seus criadores também foram relatados em comunidades da Venezuela por Guzmán et al. (2013).

A infecção por *B. coli* tem distribuição mundial, sua incidência em humanos é pouco frequente. Até 1980, foram descritos na literatura 1000 casos humanos (Solaymani-Mohammadi et al., 2006). Apesar da baixa frequência, estudos coproparasitológicos realizados na América Latina tem demonstrado a positividade da balantidiose em humanos, principalmente, os que entram em contato com suínos. Esteban et al. (1998) demonstraram positividade entre 1,2% a 5,3% para *B. coli* em escolares de comunidades rurais na Bolívia e 54% de positividade nas amostras de suínos dessas comunidades. Mesmo não tendo avaliado as amostras dos animais, Castillo (2013) evidenciou o parasito em 5% de 100 produtores de suínos na província de Balsas localizada na região sul do Equador. Todos esses resultados diferem do detectado no presente estudo.

Segundo Hernández e Rivera (1991) a literatura relacionada a essa parasitose é muito escassa, devido a duas razões fundamentais: a primeira, a baixa prevalência do parasito em humanos, e a segunda, a poucas publicações, que geralmente estão orientadas a casos clínicos isolados. Geralmente, artigos de casos clínicos são vistos pelos revisores de muitas revistas com receio, sendo, portanto, publicados como notas curtas, frequentemente em espanhol nos países latinos, em revistas de pouca circulação. Com isso, essa literatura torna-se pouco conhecida a nível mundial. As revisões de literatura trazem mais casos de países europeus ou norte-americanos, onde geralmente a parasitose tem baixos índices de prevalência, exceto quando um latino é o autor. Esse fato pode gerar uma falsa informação de que a balantidiose, seja uma parasitose rara.

A balantidiose pode ser considerada uma doença de transmissão zoonótica, já que há muitos casos clínicos relatados em humanos em que foram observados a presença do contato humano – animais (Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006), fato não evidenciado no presente estudo. Entretanto, são descritos casos de transmissão

onde não há participação de animais como fonte da infecção, como os relatados em populações muçulmanas (Geddes, 1952), em instituições fechadas como, hospitais psiquiátricos por Elliot e Hotson (1953) e em casos de pessoas que vivem em ambiente urbano e que não tem contato com animais (Figueiredo et al., 2012).

Geralmente a infecção pelo protozoário em humanos, está associada a precárias condições sanitárias, baixa dieta com proteínas e alta em carboidratos, acloridria, ingestão elevada de álcool, infecção por bactérias ou outros protozoários, estado de imunocomprometimento e fatores ambientais como umidade e temperatura, que favorecem a viabilidade dos cistos durante várias semanas (Schuster e Ramírez-Ávila, 2008).

Walzer et al. (1973) ressaltaram também que a baixa prevalência do protozoário em humanos pode ser explicada por diferenças antigênicas, onde o homem seria resistente a infecção mesmo que viva em contato próximo aos animais, em condições sócio econômicas deficientes. A presença marcante das formas evolutivas de *B. coli* nas amostras fecais dos animais estudados e a ausência das mesmas nos exames dos seus tratadores, nesse caso, pode também estar diretamente relacionada aos hábitos higiênicos – sanitários adotados por esses indivíduos, que favorecem em minimizar a sua exposição à forma infectante do parasito.

Agradecimentos

Ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ/INEA) e Cecal/Ficoruz, por disponibilizar material científico. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Pró-reitoria de Pesquisa e Inovação da Universidade Federal Fluminense (PROPPI-UFF) e a Pró-reitoria de Assuntos Estudantis da Universidade Federal Fluminense (PROAES-UFF).

Referências

Covree, L. M. J.; Rijpstra, A. C. The prevalence of *Balantidium coli* in the central highlands of Western New Guinea. Doc. Med. Geogr. Trop. 1961. 13:284-286.

Castillo KES. Identificación de *Balantidium coli* en personas dedicadas a la porcicultura en el cantón balsas durante septiembre 2012 a febrero 2013 [Monografía]. Ecuador. Universidad Nacional de Loja; 2013

Dorfman S, Rangel O, Bravo LG. Balantidiais: report of a fatal case with appendicular and pulmonary involvement. T Roy Soc Trop Med H. 1984; 78: 833 – 834.

- Elliot, G.B., Hotson, R.T. Balantidial dysentery. *Canad MAJ*, 69: 317 – 318, 1953.
- Esteban JG, Aguirre C, Angles R, Ash LR, Mas-Coma S. Balantidiasis in Aymara children from northern Bolivian altiplano. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59:922-927.
- Faust EC, D'antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, Thomen, LF, Tobie JE, Walker JH: A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *Am J Trop Med*. 1938; 18:169-183.
- Figueiredo SM, Filippis T, Santos U M P, Caixeta SS, Rocha J F S, Guimarães MMM. Report on a Balantidiasis case in a person living with HIV/AIDS (PLWHA). *Patol Trop*. 2012; 41(4):505-509.
- Geddes McC. A. *Balantidiasis* in South Persia. *Br Med J*. 1952; 1:629-631.
- Guzmán CR, Nessi AP, Gonzáles OH, Hernández MO, Galindo M. *Balantidium* spp en cerdos y sus criadores: Prevalencia em comunidades de dos Estados de Venezuela. *VITAE*. 2013; 54: 1-10.
- Hernández F, Rivera P. Balantidiasis: Recopilacion de Conceptos. *Rev Costarric Cienc Med*.1991;12 (3/4):67 – 75.
- Lutz AO. *Schistosomum mansoni* and Schistomatose according to observations made in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1919;11(1):121-55.
- Machado O, Pinho AL, Silva S. Aspectos parasitológicos na balantidiose humana. *O Hospital*. 1969; 75: 1969-76.
- Marques SMT, Bandeira C, Quadros RM. Prevalência de enteroparasitoses em Santa Catarina, Brasil. *Parasitol Latinoam*. 2005; 60: 78 - 81.
- Nakauchi K. The prevalence of *Balantidium coli* infection in fifty-six mammalian species. *J Vet Med Sci*. 1999; 61:63–65.
- Pereira C. Ocorrência da esquistossomose e outras parasitoses intestinais em crianças e adolescentes de uma escola municipal de Jequié, Bahia, Brasil. *Rev Saúde Com*. 2010; 1:24-30.
- Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull U S Arm Med Dep*. 1948; 8:326.
- Sheather LA. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J Comp Pathol Ther*.1923;36:266-75.
- Schuster F L, Ramirez-Avila L. Current world status of *Balantidium coli*. *Clin Microbiol Rev*.2008; 21(4):626-638.

- Solaymani-Mohammadi S, Petri Jr. WA. Zoonotic implications of the swine Transmitted-protozoal infections. *Vet Parasitol.* 2006; 140:189-203.
- Vasconcelos JC. Bactérias enteropatógenicas de diarreia infantil aguda em Tucuruí, Pará. *Acta Amazonica.* 1981;11(3): 527 – 535.
- Vásquez W, Vidal J. Colitis balantidiasica: a proposito de un caso fatal en el departamento de Huancavelica. *An Fac Med.* 1999; 60:119-123.
- Walzer P D, Judson FN, Murphy KB, Healy GR, English DK, Schultz MG. Balantidiasis outbreak in Truk. *Am J Trop Med Hyg.* 1973; 22:33-41.
- Walzer PD, Healy GR. Balantidiasis. In Steele, JH (Ed), *Handbook Series in Zoonoses*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982; 15-24.
- Woody NC, Woody HB. Balantidiasis in infancy: Review of the literature and report of a case. *J Pediatrics.* 1960; 56(4):485-489.
- Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol.* 1979; 10:852-853.
- Zaman V. *Balantidium coli*. In: Kreier JP (Ed). *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, 1978; 633-653.

5.4 CAPÍTULO 4

Este capítulo pleitea o objetivo: - Comparar a eficiência das técnicas coproparasitológicas para diagnóstico da balantidiose;

Situação: : Sob correção pelos orientadores e colaboradores.

Versão em português do artigo.

Contexto: A eficiência das técnicas para detecção de cistos de Balantidium sp. foi avaliada por meio de detecção desta forma evolutiva nas amostras fecais de suínos e primatas não humanos. Foram consideradas para avaliação técnicas parasitológicas tradicionais utilizadas na rotina laboratorial.

Comparação de cinco técnicas parasitológicas para o diagnóstico laboratorial de cistos de *Balantidium coli* (Malmsten, 1857)

Alyne da Silva Barbosa¹, Otilio Machado Pereira Bastos², Claudia M. Antunes Uchôa², Alcides Pissinatti³, Augusto César Machado Pereira Bastos², Igo Vieira de Souza⁴, Lais Verdán Dib¹, Eduarda Peixoto Azevedo², Mayara Perlingeiro de Siqueira², Matheus Lessa Cardozo², Maria Regina Reis Amendoeira¹.

1. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro). Instituto Oswaldo Cruz. Laboratório de Toxoplasmose. Endereço: Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.
2. Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Endereço: Rua Professor Hernani Mello, São Domingos, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.
3. Centro de Primatologia do Rio de Janeiro - CPRJ / INEA, RJ. Endereço: Estrada do Paraíso, Guapimirim, Rio de Janeiro, Brasil.
4. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro). Serviço de Criação de Primatas não humanos (CECAL). Endereço: Fundação Oswaldo Cruz. Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

Balantidium coli é um protozoário que pode determinar disenteria em humanos, suínos e primatas não humanos apresentando potencial zoonótico. Na literatura ainda são escassas as informações sobre a eficiência das diferentes técnicas laboratoriais para o diagnóstico dessa parasitose. Este estudo comparou e avaliou o desempenho das

técnicas de Lutz, Ritchie modificada, Faust et al., Sheather modificada e do exame direto para a detecção de cistos desse protozoário. Entre 2012 a 2014 foram coletadas 1905 amostras fecais de animais cativos no estado do Rio de Janeiro. Destas, 790 foram obtidas da ampola retal de suínos e 1115 dos recintos de primatas não humanos. Cistos de *B. coli* foram mais evidenciados pelo exame direto, 22,4% e pela técnica de Lutz, 21% das amostras. Concordância regular ($Kappa = 0,41$; $p < 0,05$) foi observada somente entre exame direto e Lutz. As técnicas de flutuação, Faust et al. e Sheather modificada não apresentaram boa recuperação dos cistos. Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na frequência de cistos entre suínos e primatas não humanos pode ser observada somente no exame direto e na técnica de Lutz. A metodologia mais eficiente para diagnóstico dessa parasitose foi observada pela associação do exame direto e da técnica de sedimentação espontânea.

Palavras-chave: *Balantidium coli*; Técnicas parasitológicas; Cistos; Diagnóstico laboratorial.

1. Introdução

Balantidium coli é um protozoário ciliado que pode parasitar o intestino grosso de uma grande diversidade de animais. Geralmente, o suíno doméstico e os primatas não humanos são os mais acometidos por essa parasitose, sendo considerados, importantes fontes de infecção para o homem (Schuster e Ramirez-Ávila, 2008). O parasito possui dois estágios evolutivos: trofozoíto e cisto, o primeiro tem formato alongado ou ovóide, com comprimento que pode variar de 30 μm a 300 μm , e largura de 30 μm a 100 μm . Já o cisto tem formato esférico ou ovóide, diâmetro variando entre 40 μm a 60 μm , parede geralmente espessa e hialina (Zaman, 1978).

A transmissão desse protozoário intestinal para humanos e outros animais ocorre, principalmente, pela ingestão de cistos, por meio de contato direto entre hospedeiros, ou pela transmissão indireta, com ingestão de água e alimentos contaminados. As manifestações clínicas da balantidiose podem variar, desde casos leves, assintomáticos, até casos graves com disenteria, que podem evoluir para óbito (Vásquez e Vidal, 1999).

B. coli é considerado um patógeno negligenciado, apesar das infecções pelo protozoário já terem sido relatadas em diversas partes do mundo, incluindo regiões no extremo norte do planeta, como Suécia, Finlândia, Noruega e norte da Rússia.

Entretanto, as taxas de prevalência mais elevadas são encontradas nas regiões de clima tropical e subtropical, sendo os maiores focos endêmicos relatados nas Américas Central e do Sul, destacando Brasil, Venezuela; Filipinas; Papua Nova Guiné; algumas regiões da Ásia e nas ilhas do Pacífico (Schuster e Ramirez-Ávila, 2008; Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006).

O diagnóstico da balantidiose é baseado, principalmente, na detecção por microscopia óptica dos trofozoítos e cistos nas fezes (Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006). Em amostras diarreicas, onde é predominante o encontro de trofozoítos, preconiza-se a realização do exame direto, pois o movimento ciliar, tamanho do protozoário e formato do macronúcleo são características que facilitam o diagnóstico do parasito (Anargyrou et al., 2003).

A forma cística é geralmente encontrada em fezes sólidas e semi-sólidas (Schuster e Ramirez-Ávila, 2008). Para seu diagnóstico os estudos tem relatado o uso de diferentes técnicas parasitológicas. Castillo (2013) e Pereira (2010) relatam o uso do exame direto e da sedimentação espontânea, respectivamente, no diagnóstico da parasitose em amostras fecais humanas. Na pesquisa do protozoário em fezes de primatas não humanos, Lim et al. (2008) realizaram a sedimentação por centrifugação em acetato de etila e Pourrut et al. (2011) o exame direto associado com a centrifugo sedimentação em formol-éter. Já nas amostras fecais de suínos, Guzmán et al. (2013) optaram pela centrifugo flutuação com sulfato de zinco associada ao exame direto, Nishi et al. (2000) pelas técnicas de centrifugo flutuação com sacarose e a centrifugo sedimentação em éter e Weng et al. (2005) pelo exame direto e a flutuação com cloreto de sódio.

Apesar dos relatos dessa parasitose, na literatura ainda são escassos os estudos que avaliam a eficiência dos testes de diagnóstico para detecção das formas císticas de *B. coli*. Diferentes procedimentos laboratoriais para a detecção desse protozoário foram relatados apenas por Machado et al. (1969). Na parasitologia, geralmente, técnicas com padrão-ouro, ou seja, teste diagnóstico com 100% de precisão com o qual a sensibilidade e especificidade são estimadas, geralmente não estão disponíveis, principalmente, na pesquisa de parasitoses intestinais (Gonçalves et al., 2014). Portanto, torna-se fundamental análises de desempenho de técnicas laboratoriais para determinação de resultados mais precisos, que conseqüentemente, contribuirão para ampliar informações sobre a epidemiologia do parasito (Harhay et al. 2011; Tarafder et al. 2010).

As técnicas de diagnóstico laboratorial utilizadas para detecção de parasitos intestinais possuem diferentes fundamentos e processamentos, apresentando vantagens e limitações (Dryden et al., 2005). Atualmente, a maioria dos métodos utilizados para detecção de parasitos intestinais dispõem de soluções e reagentes que minimizam os debrís fecais e facilitam a visualização das estruturas parasitárias. Além disso, os laboratórios de parasitologia contam com o auxílio de centrífugas e microscópios, que diminuem o tempo de execução dos exames e aumentam a precisão dos resultados (Proudman e Edwards, 1992). Contudo, as técnicas possuem metodologias específicas, sendo necessários estudos comparativos, para definir as mais sensíveis e rápidas.

Devido a poucas informações sobre *B. coli* na literatura, principalmente quanto à metodologia de diagnóstico, este estudo teve como objetivo analisar a detecção dos cistos desse protozoário em amostras fecais de diferentes hospedeiros utilizando cinco técnicas parasitológicas, comparando a eficiência de recuperação dos cistos entre essas técnicas.

2. Material e Métodos

2.1 Considerações Éticas

Este estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética Animal (CEUA-Fiocruz) nº de licença LW57/12, protocolo nº P 79/11-2 e licença do SISBIO – IBAMA, sob número de protocolo 31900-2.

2.2 Coleta de amostras

No período de agosto de 2012 a janeiro de 2014 foram coletadas 1905 amostras fecais de animais cativos do estado do Rio de Janeiro. Destas, 790 foram obtidas de suínos (*Sus scrofa*), sendo: 88 amostras de animais de propriedades familiares localizadas nos municípios de Rio Bonito (21), Araruama (7), Saquarema (12), Maricá (8), Itaboraí (12), Casimiro de Abreu (23) e Silva Jardim (5) e 702 de criações do tipo industriais, de Petrópolis (479) e Itaperuna (223). Dos primatas não humanos, 960 amostras foram coletadas no Centro de criação de animais de laboratório (Cecal) da Fiocruz situada na própria cidade do Rio de Janeiro e 155 do Centro de Primatologia do INEA (CPRJ) localizado no município de Guapimirim. Foram representadas neste estudo mais de 30 espécies de primatas do Novo Mundo (NM), destacando as pertencentes ao gênero *Cebuella*, *Callithrix*, *Calibella*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus*,

Callimico, *Aotus*, *Callicebus*, *Saimiri*, *Cebus*, *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao*, *Alouatta*, *Ateles* e *Brachyteles* que são principalmente encontradas no CPRJ e duas espécies do Velho Mundo (VM) do gênero *Macaca* do Cecal/Fiocruz.

As amostras fecais dos suínos foram obtidas diretamente da ampola retal de cada animal com utilização de luva de palpação. Para fins de amostragem, nas granjas familiares, foi coletado o máximo possível de amostras dos animais, pois o número de suínos em cada propriedade era pequeno. Nas granjas industriais foi utilizado o intervalo de confiança de no mínimo 80% com 5% de precisão, com exceção da granja de Petrópolis, onde, em alguns setores foi adotada amostragem por conveniência, sendo coletadas, no mínimo, 100 amostras fecais, pois havia mais de 1.000 animais em alguns recintos.

Para os símios optou-se por coletar as amostras fecais do assoalho dos seus recintos, objetivando minimizar o estresse consequente do processo de contenção animal. As coletas foram padronizadas de acordo com cada local estudado. No Cecal, há um grande número de animais com pouca variedade de espécies. Nesse, as coletas foram feitas de forma pontual (uma única vez em cada recinto). A quantidade de amostra coletada foi idêntica à quantidade de primatas habitantes de cada recinto. Já no CPRJ há uma grande variedade de espécies de primatas com menor quantidade de exemplares do que no Cecal. Nesse local, a maioria dos símios pertencem aos gêneros *Callithrix*, *Mico*, *Saguinus* e *Leontopithecus*, sendo, portanto, primatas de menor porte que defecam um pequeno volume fecal. Para aumentar o volume da amostra e com isso garantir a realização com qualidade das técnicas laboratoriais, foi realizada coleta do material em três dias consecutivos, sendo as triplicatas consideradas uma única amostra.

Em todas as coletas deu-se preferência por conteúdos fecais frescos, que foram depositados em coletores plásticos de 80 mL sem conservante químico, e posteriormente acondicionados em recipientes isotérmicos. As amostras fecais foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Biomédico, da Universidade Federal Fluminense.

2.3 Processamento das amostras fecais

Uma parte do material foi imediatamente processada pelo exame direto com solução salina tamponada. Outra parte da amostra foi homogeneizada em água destilada e o filtrado foi aliquotado em tubos de centrífuga com volume de 15 mL de

fundo cônico para a realização das técnicas de centrífugo sedimentação de Ritchie (1948) modificada por Young et al. (1979), centrífugo flutuação de Faust et al. (1938) empregando solução de sulfato de zinco com densidade de 1,180 g/mL; centrífugo flutuação de Sheather (1923) modificada por Huber et al. (2003) utilizando solução de sacarose com densidade de 1,300 g/mL. Parte do filtrado foi submetido à técnica de sedimentação espontânea de Lutz (1919).

A leitura de uma lâmina obtida de cada técnica parasitológica foi realizada em microscópio óptico Olympus® BX 41, inicialmente, em aumento de 100 vezes e, para confirmação, se necessário, em 400 vezes.

2.4 Tratamento estatístico

O teste estatístico de X^2 foi utilizado para comparar a recuperação dos cistos de *B. coli* entre amostras fecais dos hospedeiros utilizando diferentes técnicas parasitológicas. Estatística Kappa (k) foi empregada para determinar a concordância do diagnóstico entre as técnicas parasitológicas. O programa SPSS® (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) foi utilizado, sendo considerado o grau de significância de 5%.

O índice Kappa foi interpretado da seguinte forma: <0, concordância pobre; 0 – 0,20, concordância leve; 0,21 – 0,40, concordância razoável; 0,41 – 0,60, concordância moderada; 0,61 – 0,80, concordância substancial; e 0,81 – 1,0, concordância quase perfeita (Landis e Koch, 1977).

3. Resultados

Nas amostras fecais de suínos e primatas não humanos estudadas, pode-se evidenciar positividade para formas evolutivas de *B. coli* em 49,2% e 41,5%, sendo a forma cística detectada em 42,6% e 29,5%, respectivamente com a associação de cinco técnicas parasitológicas (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de formas evolutivas de *Balantidium coli* detectados nas amostras fecais de suínos e primatas não humanos.

| Nº de amostras | Suínos (n=790) | Primatas (n=1115) | Total (1905) |
|---|-----------------------|--------------------------|---------------------|
| Positividade total (trofozoítos e cistos) | 389 (49,2%) | 463 (41,5%) | 852 (44,7%) |
| Positividade para cistos | 337 (42,6%) | 329 (29,5%) | 666 (34,9%) |

Cistos de *B. coli* foram diagnosticados com mais frequência pelo exame direto, 22,4%, seguido pelas técnicas de sedimentação de Lutz, 21% e de Ritchie modificada, 20,5%. As técnicas de flutuação, Faust et al. e Sheather modificada apresentaram baixo desempenho na detecção dos cistos. Comparando a positividade entre amostras fecais de suínos e primatas não humanos, pode-se observar diferença estatística significativa somente no exame direto e em Lutz ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Detecção dos cistos de *Balantidium coli* em amostras fecais de suínos e primatas não humanos detectadas pelas técnicas de exame direto, Lutz, Ritchie modificada, Faust et al. e Sheather modificada.

| Técnicas | Total (n=1905) | Suínos (n=790) | Primatas (n=1115) | p valor |
|----------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| | No+ | No+ | No+ | (Suíno X Primata) |
| Exame direto | 427 (22,4%) | 211 (26,7%) | 216 (19,3%) | 0,00* |
| Lutz | 401 (21%) | 146 (18,4%) | 255 (22,8%) | 0,01* |
| Ritchie mod. | 391 (20,5%) | 158 (20%) | 233 (20,8%) | 0,33 |
| Faust | 74 (3,8%) | 41 (5,1%) | 33 (2,9%) | 0,07 |
| Sheather mod. | 21 (1,1%) | 6 (0,7%) | 15 (1,3%) | 0,16 |

No+: Número de amostras positivas; ED: Exame direto; * $p < 0,05$.

Os maiores valores do índice de concordância Kappa foram observados nas comparações entre o exame direto - Lutz, exame direto - Ritchie modificada e Lutz - Ritchie modificada. Somente a comparação entre o exame direto - Lutz apresentou um grau de concordância regular. As outras comparações foram classificadas como leve ou pobre. Todos os valores de Kappa apresentaram-se estatisticamente significativos com $p < 0,05$ (Tabela 3).

Tabela 3. Concordância dos resultados obtidos pelas técnicas parasitológicas na detecção de cisto de *Balantidium coli* em amostras fecais de suínos e primatas não humanos.

| Técnicas | Total No+ | k | p valor |
|-------------------------------------|------------------|----------|----------------|
| ED X Lutz | 227 | 0,41 | 0,02 |
| ED X Ritchie mod. | 208 | 0,37 | 0,02 |
| ED X Faust et al. | 40 | 0,10 | 0,02 |
| ED X Sheather mod. | 9 | 0,20 | 0,01 |
| Lutz X Ritchie mod. | 188 | 0,34 | 0,02 |
| Lutz X Faust et al. | 41 | 0,11 | 0,02 |
| Lutz X Sheather mod. | 14 | 0,04 | 0,01 |
| Ritchie mod. X Faust | 47 | 0,14 | 0,02 |
| Ritchie mod. X Sheather mod. | 17 | 0,06 | 0,01 |
| Faust et al. X Sheather mod. | 11 | 0,22 | 0,05 |

No+: Número de amostras positivas; ED: Exame direto; k= Kappa; p<0,05. Kappa <0, concordância pobre; 0 – 0,20, concordância leve; 0,21 – 0,40, concordância razoável; 0,41 – 0,60, concordância moderada; 0,61 – 0,80, concordância substancial; e 0,81 – 1,0, concordância quase perfeita.

4. Discussão

Neste estudo a associação das cinco técnicas parasitológicas permitiu o diagnóstico de cistos de *B. coli*, tanto nas fezes de suínos como nas amostras fecais de primatas não humanos. Sabe-se que a utilização simultânea de diversas técnicas com diferentes fundamentos aumenta a acurácia no diagnóstico das parasitoses (Carvalho et al., 2002). A maioria dos estudos que pesquisaram e detectaram *B. coli* relatam a realização de uma (Castillo, 2013; Pereira, 2010) à no máximo duas técnicas parasitológicas (Guzmán et al., 2013; Nishi et al., 2000; Pourrut et al., 2011; Weng et al., 2005), havendo em alguns estudos, associações de métodos de coloração permanente (Lim et al., 2008). Para detecção de *B. coli* foram sempre coletadas amostras fecais frescas sem conservante, sendo empregado o exame direto, duas técnicas de sedimentação, Lutz e Ritchie modificada, e duas de flutuação, Faust et al. e Sheather modificada. De forma similar, Machado et al. (1969) optaram por utilizar procedimentos parasitológicos com diferentes fundamentos, como o exame direto, uma técnica de sedimentação, Lutz e duas de flutuação, Faust et al. e Willis, para pesquisa de *B. coli* em amostras fecais de humanos no município de Niterói.

De forma geral o exame direto foi o teste que mais recuperou cistos de *B. coli*, 22,4%. No momento de sua realização, o material fecal foi submetido à retirada de

alíquotas de vários pontos, tanto da superfície como em profundidade. Acredita-se que os cistos de *B. coli* tendem a se concentrar mais na camada superficial do bolo fecal, pois, no intestino grosso, o material oriundo da digestão alimentar passa por poucos movimentos de homogeneização, dificultando a dispersão das estruturas parasitárias. A raspagem da superfície do bolo fecal pode ter favorecido a frequência de detecção dos cistos pelo exame direto. Essa maior concentração de estruturas parasitárias na superfície do bolo fecal, já foi comprovada em amostras fecais positivas para ovos de *Schistosoma* sp., trematoda que elimina ovos na parede do intestino grosso (Ye et al., 1998).

Comparando a eficiência das técnicas parasitológicas em amostras fecais de diferentes hospedeiros, pode-se observar diferença estatística significativa na frequência de cistos de *B. coli*, tanto no exame direto, quanto em Lutz. O tempo prolongado de adaptação parasitária, suíno – *B. coli*, pode ter contribuído para tornar esse animal um excelente reservatório, ou seja, um hospedeiro com elevada produção de formas císticas, que, nesse estudo foram detectadas, principalmente pelo exame direto. Segundo Estevez e Levine (1985) o exame direto apresenta muitas vantagens, destacando a simplicidade metodológica, pouco tempo de execução, além de ser preconizado para detecção de trofozoítos em fezes sem conservante químico. Cabe ressaltar que o exame direto, é atualmente, a técnica de diagnóstico parasitológico da rotina laboratorial de fezes que apresenta o menor custo.

Capacidade de recuperação de cistos com percentual de positividade um pouco menor, foi observado nas técnicas de sedimentação de Lutz e Ritchie modificada, 21% e 20,5%, respectivamente. Nas amostras fecais de primatas não humanos a técnica de Lutz foi a que apresentou a maior frequência, 22,8%, fato que explica a diferença estatística significativa, quando se comparou a eficiência das técnicas entre as amostras dos diferentes hospedeiros. As amostras fecais dos primatas não humanos estudados apresentavam volume fecal menor do que as de suínos. O menor volume pode ter promovido à concentração das estruturas parasitárias, fato que deve ter favorecido a maior recuperação das mesmas pelas técnicas de sedimentação.

Apesar de *B. coli* ser um protozoário intestinal, o seu cisto apresenta dimensões compatíveis com alguns ovos de helmintos. Esse tamanho associado à densidade elevada favorece a sua detecção pelas técnicas de Lutz e Richie modificada, que são principalmente indicadas para o diagnóstico de estruturas parasitárias pesadas, como ovos e larvas de helmintos (Dryden et al., 2005; Táparo et al., 2006). Segundo Truant

et al. (1981) a sedimentação espontânea, tem a vantagem de recuperar as formas evolutivas dos parasitos sem deformá-las, mantendo a viabilidade da estrutura parasitária, porém, pode apresentar período de execução demorado, dependendo do tempo de sedimentação aplicado, que pode variar de 1 a 24 horas.

A técnica de Ritchie utilizada neste estudo foi a modificação de Young et al. preconizada por Cerqueira (1988). Young et al. substituíram o éter pelo acetato de etila, devido seu efeito tóxico. Segundo os autores, esta alteração aumentou a eficiência de detecção das formas evolutivas, principalmente para cistos de *Giardia duodenalis* e ovos de *Hymenolepis nana*. Além disto, o acetato de etila é menos inflamável que o éter, não apresentando limitações para seu uso. Anos mais tarde Cerqueira adicionou a esta técnica, detergente neutro, que quando combinado com acetato de etila, favorece a retirada de gordura e fibras do material fecal.

A lâmina de microscopia resultante do exame direto e das técnicas sedimentação de Lutz e Ritchie modificada, geralmente, apresentam muitos resíduos, dificultando a visualização das estruturas. Para minimizar essa limitação, neste estudo optou-se pela utilização de uma lamínula de 24 X 32 mm, maior do que a utilizada na rotina laboratorial, 22 X 22 mm. O aumento no tamanho da lamínula permitiu espalhar o material fecal, facilitando a leitura do sedimento.

As técnicas de flutuação, Faust et al. e Sheather modificada apresentaram baixa recuperação dos cistos de *B. coli*, tanto nas amostras fecais de suínos quanto nas de primatas não humanos. Esses resultados discordam de Machado et al. (1969) que relataram maior eficiência de diagnóstico dos cistos de *B. coli* por Faust et al. (0,74%), seguido de exame direto (0,57%), sedimentação espontânea (0,49%) e Willis (0,49%) em amostras fecais de 1214 humanos. Cabe ressaltar que as técnicas de flutuação são utilizadas, principalmente para recuperar cistos e oocistos de protozoários, sendo processadas com soluções de diferentes densidades, o que facilita a flutuação das estruturas parasitárias leves (Dryden et al., 2005). Elevada sensibilidade na recuperação de cistos e oocistos tem sido demonstrada por diversos autores, como Machado et al. (2001) que relataram a maior positividade de cistos de *Giardia duodenalis* em fezes de crianças pela técnica de Faust et al., do que pela hematoxilina férrica, exame direto com lugol e ensaio imunoenzimático e por Huber et al. (2003) que evidenciaram maior frequência de oocistos de *Cryptosporidium* sp. e cistos de *Giardia duodenalis* em fezes de bezerros utilizando a técnica de Sheather modificada do que a sedimentação em formaldeído – éter.

A técnica de Sheather modificada por Huber et al. foi à mesma aplicada neste estudo, onde, se utiliza uma solução de sacarose com elevada densidade, 1,30 g/mL. Segundo Broussard et al. (2003) a técnica de Sheather tem sido a mais utilizada na parasitologia veterinária e Faust et al. já pode ser considerada a técnica padrão ouro para *Giardia* sp. Porém, neste estudo, Faust et al. e Sheather modificada além de terem apresentado baixa eficiência no diagnóstico, também determinaram alteração morfológica dos cistos, fato que dificultou, muitas vezes o seu reconhecimento.

Em todas as comparações o índice Kappa foi estatisticamente significativo, determinando confiabilidade nos resultados. Valor de Kappa mais elevado foi observado entre exame direto e Lutz, técnicas que apresentaram as maiores frequências de positividade. Embora essa concordância seja classificada como razoável, tal valor ainda se encontra muito longe do máximo (valor Kappa =1). Assim para aumentar a eficiência no diagnóstico de cisto de *B. coli*, os resultados apontam a necessidade de associação do exame direto com uma técnica de sedimentação.

No diagnóstico parasitológico de fezes as metodologias laboratoriais devem ser sempre previamente avaliadas de acordo com a espécie do parasito. Como pode ser observado neste estudo, as técnicas de centrífugo flutuação não apresentaram boa taxa de recuperação dos cistos de *B. coli*, não sendo, portanto, indicadas para pesquisa deste protozoário. Entretanto, deve-se enfatizar a realização do exame direto não somente para pesquisa de trofozoítos de *B. coli*, como também para diagnóstico de seus cistos. A associação exame direto – Lutz foi a melhor metodologia para o diagnóstico dessa parasitose.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos produtores de suínos, setor de Primatologia do Cecal/Fiocruz e ao Centro de Primatologia pelos fornecimentos das amostras biológicas que permitiram a realização desse estudo.

Referências

Anargyrou K, Petrikos GL, Suller, TEM, Skiada A, Siakantaris MP, Osuntoyinbo RT, Pangalis G, Vaiopoulos G. Pulmonary *Balantidium coli* infection in leukemic patient. Am J Hematol. 2003; 73:180-183.

Broussard JD. Optimal fecal assessment. Clin Tech Small An P. 2003; 18: 218 -230.

Carvalho FM, Falcão AO, Albuquerque MC, da Silva P, Bastos OMP, Uchôa CMA. Diagnóstico coproparasitológico: estudo comparativo entre os métodos de Faust e cols., Lutz, Baermann e Moraes e Coprotest. Rev Bras Anál Clín. 2002; 34:75 -77.

Castillo KES. Identificación de *Balantidium coli* en personas dedicadas a la porcicultura en el cantón balsas durante septiembre 2012 a febrero 2013 [Monografía]. Ecuador. Universidad Nacional de Loja; 2013

Cerqueira FL. Coprotest: Metodologia confiável para exame parasitológico de fezes. Laes. 1988; 51: 5-12

Dryden MW, Payne PA, Ridley R, Smith V. 2005. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. Vet Ther. 2005; 6: 15 - 28.

Estevez GE, Levine JA. Examination of preserved stool specimens for parasites: Lack of value of the direct wt mount. J Clin Microbiol. 1985; 22: 666 – 667.

Faust EC, D'antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie JE, Walker JH. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. Am J Trop Med. 1938; 18: 169-183.

Gonçalves AQ, Abellana R, da Silva HDP, Santos I, Serra PT, Julião GR, Orlandi PP, Ascaso C. Comparison of the performance of two spontaneous sedimentation techniques for the diagnosis of human intestinal parasites in the absence of a gold standard. Acta Tropica. 2014; 131: 63-70.

Guzmán CR, Nessi AP, Gonzáles OH, Hernández MO, Galindo M. *Balantidium* spp. en cerdos y sus criadores: Prevalencia em comunidades de dos Estados de Venezuela. VITAE. 2013; 54: 1-10.

Harhay MO, Horton J, Olliaro PL, Utzinger J. Diagnostics are central for a truly holistic approach against intestinal parasitic diseases. Int J Infect Dis. 2011; 15: 76–77.

Huber F, Bomfim TC, Gomes RS. Comparison between the efficiency of the formaldehyde-ether sedimentation technique and the sugar fluctuation technique for the detection of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* sp. oocysts in fecal samples from calves. Rev Bras de Parasitol Vet. 2003; 12: 135-137.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33:159–174.

Lutz AO. *Schistosomum mansoni* and *Schistosomatosis* according to observations made in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1919; 11: 121-55.

Lim YAL, Nigui R, Shukri J, Rohela M, Mat Naim HR. Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. Vet Parasitol 2008; 57:154–9.

Machado O, Pinho AL, Silva S. Aspectos parasitológicos na balantidiose humana. O Hospital. 1969; 75: 1969-76.

Machado RLDM, Figueiredo MC, Frade AF, Kudó ME, Filho MGS, Póvoa MM. Comparação de quatro métodos laboratoriais. *Rev Soc Med Trop.* 2001, 34 (1): 91-93.

Nishi AM, Gennari SM, Lisboa MNTS, Silvestrim A., Caproni Jr. L, Umehara O. Intestinal parasites in swine confined farms of São Paulo and Minas Gerais State. *Arq Inst Biol.* 2000; 67:199-203.

Pereira C. Ocorrência da esquistossomose e outras parasitoses intestinais em crianças e adolescentes de uma escola municipal de Jequié, Bahia, Brasil. *Rev Saúde Com.* 2010; 1:24-30.

Pourrut X, Dikko JLD, Somo RM, Bilong Bilong CF, Delaporte E, Lebreton M, Gonzalez JP. Prevalence of gastrointestinal parasites in primate bushmeat and pets in Cameroon. *Vet Parasitol.* 2011; 175: 187-191.

Proudman CJ, Edwards GB. Validation of a centrifugal/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Vet Rec.* 1992; 31:71-71.

Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Unit S Arm Med Depart Bull.* 1948; 8, 326.

Schuster FL, Ramirez Ávila L. Current World Status of *Balantidium coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21:626-638.

Sheather AT. The detection of intestinal protozoa and monge parasites by a flotation technique. *J Comp Pathol.* 1923, 36: 266-275.

Solaymani-Mohammadi S, Petri WA Jr. Zoonotic implications of the swine Transmitted-protozoal infections. *Vet Parasitol.* 2006; 140:189-203.

Tarafder MR, Carabin H, Joseph L, Balolong E Jr, Olveda R, McGarvey ST. Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections in humans in the absence of a gold standard. *Int J Parasitol.* 2010; 40: 399–404.

Táparo CV, Perri SHV, Serrano ACM, Ishizaki MN, Da Costa TP, Do Amarante AET, Bresciani KDS. Comparação entre técnicas coproparasitológicas no diagnóstico de ovos de helmintos e oocistos de protozoários em cães. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2006; 15:1-5.

Truant AL, Elliott SH, Kelly MT, Smith JH. Comparison of formalin-ethyl ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites. *J Clin Microbiol.* 1981; 13: 882 – 884.

Vásquez W, Vidal J. Colitis balantidiasica: a proposito de un caso fatal en el departamento de Huancavelica. *An Fac Med.* 1999; 60:119-123.

Zaman V. *Balantidium coli*. In: Kreier JP (Ed). *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, 1978; 633-653.

Weng YB, Hu YJ, Li Y, Li BS, Lin RQ, Xie DH, Grasser RB, Zhu XQ. Survey of intestinal parasites in pigs from intensive farms in Guangdong Province, People's Republic of China. *Vet Parasitol.* 2005; 127: 333-336.

Ye XP, Donnelly CA, Anderson RM. The distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Ann Trop Med Parasit.* 1998; 92: 181 – 185.

Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol.* 1979 ; 10: 852-853.

5.5 CAPÍTULO 5

Este capítulo pleitea o objetivo: Isolar cepas de Balantidium sp. em meio de cultura xênico;

Situação: Publicado pela Veterinary Parasitology (Anexo 7).

Versão em português do artigo.

Contexto: os isolados de Balantidium sp. foram obtidos a partir de amostras fecais ricas em formas evolutivas do protozoário, por meio da padronização das etapas de isolamento e manutenção das cepas in vitro em meio de cultivo Pavlova modificado.

Isolamento e manutenção de *Balantidium coli* (Malmsten, 1857) em cultura a partir de amostras fecais de suínos e primatas não humanos

Alyne da Silva Barbosa¹, Otilio Machado Pereira Bastos², Claudia M. Antunes Uchôa², Alcides Pissinatti³, Paulo Ricardo Ferreira Filho⁴, Lais Verdan Dib², Eduarda Peixoto Azevedo², Mayara Perlingeiro de Siqueira², Matheus Lessa Cardozo², Maria Regina Reis Amendoeira¹.

1. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro). Instituto Oswaldo Cruz. Laboratório de Toxoplasmose. Endereço: Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.
2. Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Endereço: Rua Professor Hernani Mello, São Domingos, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.
3. Centro de Primatologia do Rio de Janeiro - CPRJ / INEA, RJ. Endereço: Estrada do Paraíso, Guapimirim, Rio de Janeiro, Brasil.
4. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro). Serviço de Criação de Primatas não humanos (CECAL). Endereço: Fundação Oswaldo Cruz. Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

Balantidium coli é um protozoário que pode determinar disenteria em humanos, suínos e primatas não humanos podendo apresentar potencial zoonótico. A falta de padronização no seu isolamento e manutenção dificulta o desenvolvimento de pesquisas sobre sua biologia e epidemiologia. Este estudo teve como objetivo padronizar o isolamento e a manutenção desse protozoário, a partir de fezes de animais, em meio de cultura, Pavlova modificado por Jones. De 2012 até 2014 foram coletadas 1905 amostras fecais de animais cativos do Rio de Janeiro. Foram selecionadas para isolamento amostras que apresentaram no mínimo 10 trofozoítos e/ou 30 cistos de *B. coli*, totalizando 88 de suínos, 26 de *Cynomolgus* e 90 de Rhesus. Na presença de cistos somente, a amostra foi homogeneizada em solução salina, sendo 500 µL inoculados em meio de cultura. No material que continha apenas

trofozoítos, o inóculo foi produzido a partir de 240 µL de solução fecal. Todos os tubos com os inóculos foram mantidos à 36°C, sendo sempre acrescentado amido de arroz estéril. Os isolados de suínos 34% e de *Cynomolgus* 38,4% estão sendo mantidos *in vitro* por período superior a 24 meses. Os procedimentos adotados demonstraram ser adequados para isolamento e manutenção de cepas de *B. coli* mesmo parasitando diferentes espécies de animais, sendo de baixo custo e de fácil execução.

Palavras-chave: *Balantidium coli*; Isolamento; Cultivo xênico; Suíno, Primata não humano; Brasil.

1. Introdução

Balantidium coli é o único protozoário ciliado que infecta os humanos, embora possa parasitar uma grande diversidade de animais. Suínos e primatas não humanos tem sido considerados os reservatórios mais importantes para transmissão humana (Walzer e Healy, 1982; Nakauchi, 1999). O mecanismo de infecção de *B. coli* é passivo oral tendo como principais veículos água e alimentos contaminados com cistos. Esse parasito habita o intestino grosso, podendo desencadear nos hospedeiros infectados diversas manifestações gastrintestinais, onde se destacam as diarreias com muco e sangue (Schuster e Ramirez - Ávila, 2008).

O diagnóstico da balantidiose tem sido realizado, principalmente, pelo exame direto e/ou pelas técnicas parasitológicas de concentração, sendo poucos os estudos que utilizam o cultivo (Auerback, 1953; Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006). Sabe-se que a manutenção de protozoários intestinais *in vitro* viabiliza a obtenção de material biológico para as pesquisas de imunodiagnóstico (Zaman, 1964; Dzbenski, 1966), infecção experimental (Jones, 1946), triagem de fármacos (Carneri, 1972), estudos moleculares e ultraestruturais (Nilles-Bije e Rivera, 2010).

O primeiro relato de isolamento e manutenção de *B. coli* em cultivo xênico ocorreu com Barret e Yarbrough (1921), utilizando solução salina acrescida de soro humano inativado. Acredita-se que os cultivos xênicos empregados há muitos anos para *Entamoeba histolytica* podem também ser utilizados para isolamento e manutenção de *B. coli* (Zaman, 1978; Solaymani – Mohammadi e Petri Jr., 2006). Tendo em vista a complexidade dos sistemas xênicos utilizados, Pavlova (1938) descreveu um meio monofásico simples, com o qual obteve desenvolvimento de *Entamoeba* sp.. Jones (1946) conseguiu bons resultados no isolamento de amebídeos

com meio Pavlova, adicionando extrato de levedo. Esta modificação foi utilizada por diversos autores para cultivo de cepas de *E. histolytica* isoladas de humanos (Lima e Hirschfeld, 1996; Silva, 1997) e também por Carneri (1972) para manutenção de *B. coli* isolado de suíno.

Apesar de *B. coli* já ter sido isolado com sucesso, ainda não há padronização nas etapas pré-processamento da amostra fecal para produção do inóculo e a quantidade de reagentes adicionados ao meio xênico, como o amido de arroz. Para otimizar o cultivo de *B. coli*, este estudo teve como objetivo padronizar seu isolamento e manutenção a partir de amostras fecais de suínos e primatas não humanos no meio xênico Pavlova modificado por Jones.

2. Materiais e métodos

2.1 Considerações Éticas

Este estudo recebeu parecer favorável pelo Comitê de Ética Animal (CEUA-Fiocruz), nº de licença LW57/12, protocolo nº P 79/11-2 e mantém licença atualizada anual do SISBIO – IBAMA, sob número de protocolo 31900-2.

2.2 Amostras fecais

No período de agosto de 2012 a outubro de 2014 foram coletadas e analisadas 1905 amostras fecais de animais cativos do estado do Rio de Janeiro. Destas, 790 foram obtidas de suínos (*Sus scrofa*), sendo: 88 amostras de animais de propriedades familiares localizadas nos municípios de Rio Bonito, Araruama, Saquarema, Maricá, Itaboraí, Casimiro de Abreu, Silva Jardim e 702 de criações industriais, de Petrópolis e Itaperuna. Dos primatas não humanos, 960 amostras foram coletadas no Centro de criação de animais de laboratório (Cecal) da Fiocruz situada na própria cidade do Rio de Janeiro e 155 do Centro de Primatologia do INEA localizado em Guapimirim. As amostras fecais dos suínos foram obtidas diretamente da ampola retal com a utilização de luva de palpação longa e para os símios optou-se por coletar material fecal do assoalho dos seus recintos, sendo as amostras armazenadas em coletores plásticos.

2.3 Análise laboratorial e seleção das amostras

Imediatamente após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Biomédico da UFF/Niterói, Rio de Janeiro. Parte da

amostra foi eluída em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) e submetida ao exame direto. A presença dos parasitos foi confirmada pela observação da amostra com microscopia óptica sob aumento de 100 vezes. As amostras inoculadas em meio de cultura xênico foram as que apresentaram como parâmetro, no mínimo, 10 trofozoítos móveis e/ou 30 cistos na análise microscópica.

2.4 Preparação do meio de cultura

O meio xênico de Pavlova (1938) modificado por Jones (1946) foi utilizado para isolamento e manutenção das cepas, sendo produzido com os seguintes reagentes: hidrogenofosfato de sódio 1,292 g; diidrogenofosfato de potássio 0,42 g; cloreto de sódio 7,27 g e extrato de levedura 1,46 g. Os reagentes foram homogeneizados em 1000 mL de água destilada, mantendo-se o pH final entre 7,2 a 7,4. Posteriormente, o meio de cultura foi autoclavado (120°C/20 minutos) e armazenado a 4°C. No momento do uso foi acrescentado 5% de soro fetal bovino inativado e estéril e soluções de antibióticos, que foram produzidas assepticamente. Adicionou-se um mililitro de solução de sulfato de estreptomicina com concentração final de 500 µg/mL e de penicilina G potássica, com concentração final de 1000 UI/ mL. Ao final, 10 mL do meio completo foi distribuído em tubos de ensaio de vidro estéreis com tampa rosqueável.

Um grama do amido estéril foi suspenso em 10 mL de meio Pavlova modificado, sendo armazenado sob refrigeração a 4°C. No momento da inoculação, bem como a cada subcultivo de manutenção, 60 µL desta suspensão foi adicionada nos tubos contendo meio novo e fresco.

2.5 Isolamento das cepas de *Balantidium coli*

As amostras fecais selecionadas que apresentavam somente o parâmetro para cistos foram eluídas em PBS e filtradas em tamiz coberto com gaze. O filtrado foi transposto para dois tubos de fundo cônico com 15 mL, centrifugado a 1500 RPM por cinco minutos sendo, posteriormente, o sobrenadante descartado. Em seguida, o sedimento foi suspenso em solução salina e novamente centrifugado. Esse procedimento de lavagem do material foi realizado por três vezes consecutivas. Após esta etapa, 500 µL do sedimento foi inoculado no meio de cultura. Na amostra que possuía apenas trofozoítos, o inóculo foi produzido a partir de 240 µL de fezes eluídas em solução salina estéril. Os dois procedimentos de isolamento foram utilizados quando as amostras apresentavam parâmetros para trofozoítos e cistos. A inoculação

foi sempre realizada em duplicata, com dois tubos contendo 10 mL de meio Pavlova modificado, que foram mantidos verticalmente em estufa microbiológica à 36°C (Figura 1).

Os tubos foram examinados após 24 horas de incubação, sendo retirados 60 µL de seu sedimento, que foi depositado em lâmina de microscopia coberta com lamínula. A leitura da lâmina foi realizada em microscópio óptico com aumento de 100 vezes. Nos cultivos onde foi visualizado trofozoítos móveis, 500 µL do seu sedimento foi transposto para tubo contendo meio novo e fresco. Tubos negativos, sem trofozoítos em movimentação, foram reincubados por 24 horas e, posteriormente verificados. Nestes casos, o procedimento de verificação e incubação foi realizado por três vezes, período máximo de 72 horas, sendo ao final, se negativo, o material descartado. Considerou-se isolamento, quando havia, trofozoítos móveis nesta etapa de verificação.

2.6 Manutenção das cepas de *Balantidium coli*

Cepas isoladas que permaneceram após subcultivos subsequentes ao do isolamento foram admitidas em manutenção. Inicialmente, as culturas com trofozoítos móveis foram mantidas com intervalos de 24 horas. Após o oitavo ao décimo repasse, ou seja, quando não havia mais a presença de detritos fecais, o tempo de subcultivo foi alongado para intervalos de 48 horas.

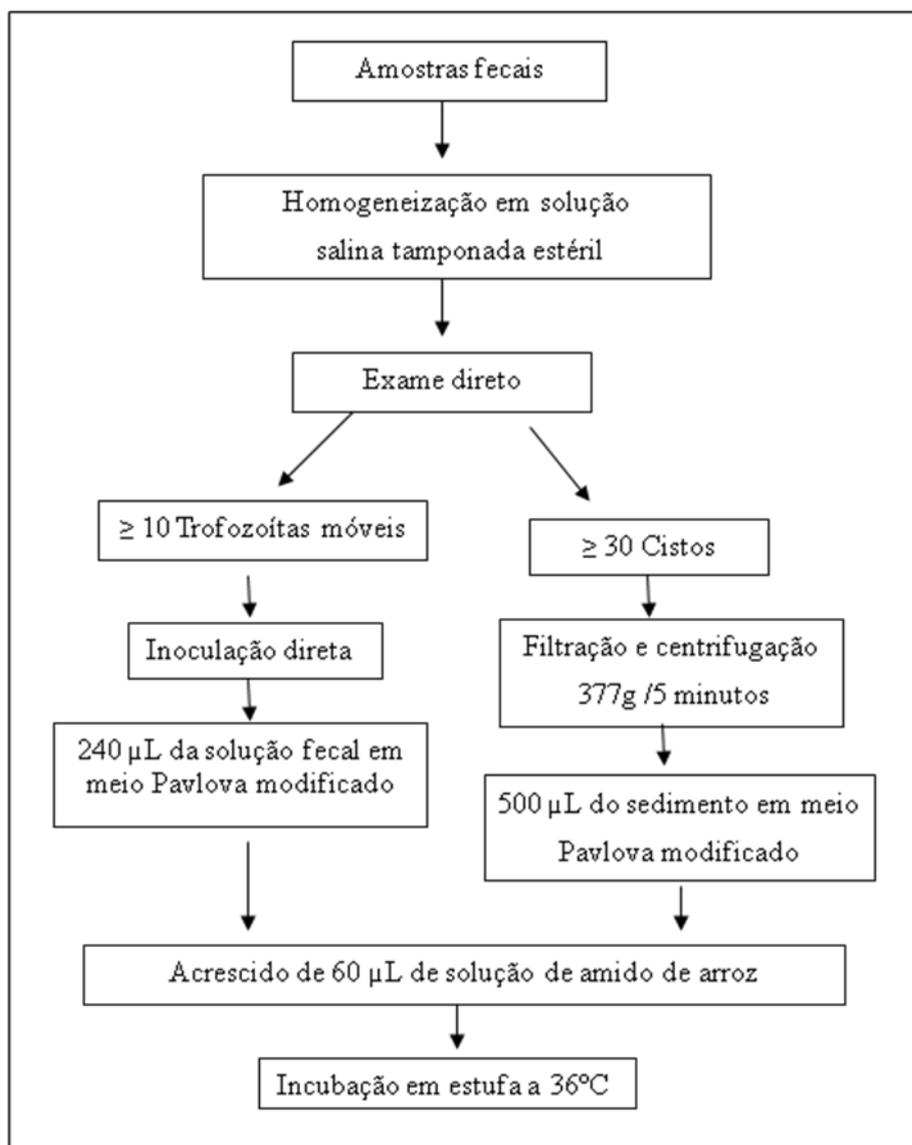


Figura 1. Fluxograma de isolamento de *Balantidium coli* em meio Pavlova

3. Resultados

Do total de 1905 amostras fecais coletadas e avaliadas pelo exame direto, 204 apresentaram parâmetros de inoculação. Das amostras selecionadas, 88 foram de suínos, e 116 de primatas não humanos sendo, 26 de *Cynomolgus* e 90 de Rhesus, ambas espécies de símios do Velho Mundo e habitantes do Cecal/Fiocruz (Tabela 1 e 2).

Das 204 amostras selecionadas, 107 (52,4%) cepas foram isoladas em meio Pavlova modificado e destas 51 (25%) foram mantidas por pelo menos uma semana. Das cepas mantidas, 28 originaram-se de amostras fecais com padrão de inoculação

para trofozoítos (Figura 2A), seguidas de amostras com cistos 15 (Figura 2B) (Tabela 2). Manutenção no meio Pavolva modificado, por mais de 24 meses, tem sido observada somente em 40 cepas, sendo 10/26 (38%) isoladas de *Cynomolgus* (Figura 2C) e 30/88 (34%) de suínos. Todas as cepas de *B. coli* oriundas de Rhesus que foram mantidas em *in vitro*, permaneceram viáveis por no máximo uma semana de incubação.

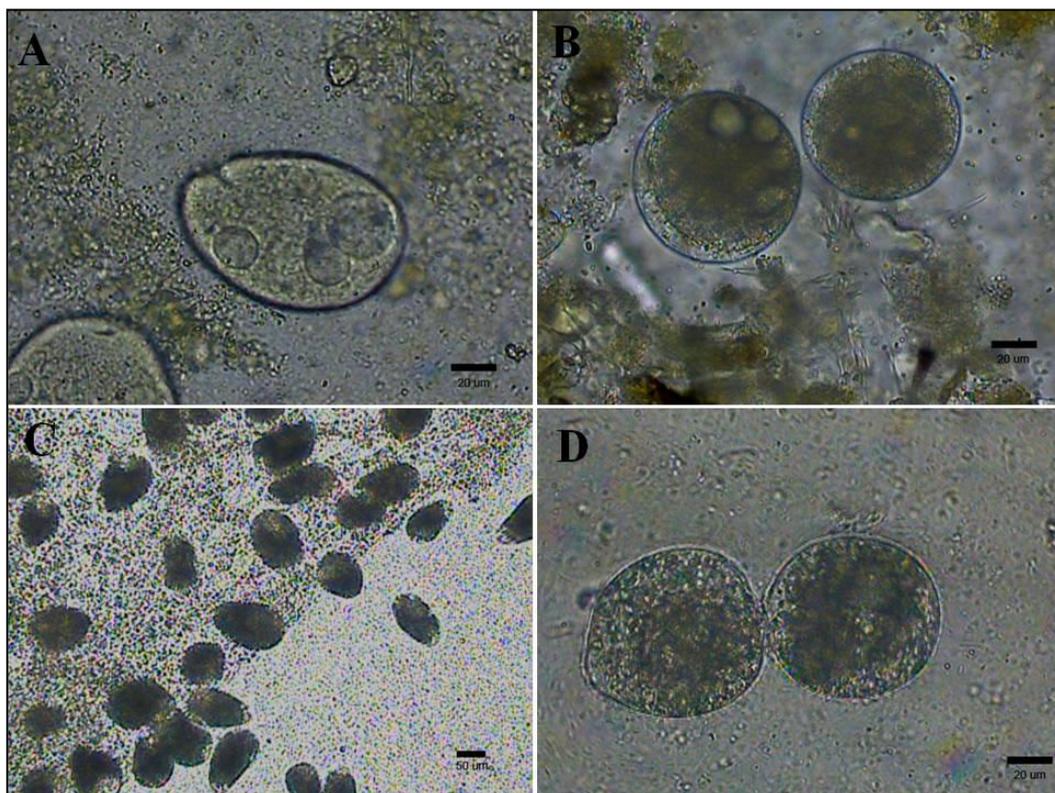


Figura 2. Ilustração das formas evolutivas de *Balantidium coli* observadas nas amostras fecais e em cultivo xênico. **A**- Trofozoíto de *B. coli* (100 X) detectado no exame direto em amostra fecal de *Cynomolgus*. **B** – Cisto de *B. coli* (100 X) detectado em amostra fecal de suíno. **C** – Trofozoíto de *B. coli* (50X) observado em cepa isolada de *Cynomolgus* mantida cultivo xênico. **D** – Trofozoíto de *B. coli* (100 X) em processo de divisão transversal observado em cepa isolada de suíno mantida em cultivo xênico.

Tabela 1. Frequência de amostras fecais positivas para *Balantidium coli* em animais cativos do estado do Rio de Janeiro.

| Espécies | Município | Amostras coletadas |
|--|-------------------|--------------------|
| Pigs | | |
| <i>Sus scrofa</i> | Rio Bonito | 21 |
| <i>Sus scrofa</i> | Araruama | 7 |
| <i>Sus scrofa</i> | Saquarema | 12 |
| <i>Sus scrofa</i> | Maricá | 8 |
| <i>Sus scrofa</i> | Itaboraí | 12 |
| <i>Sus scrofa</i> | Casimiro de Abreu | 23 |
| <i>Sus scrofa</i> | Silva Jardim | 5 |
| <i>Sus scrofa</i> | Petrópolis | 479 |
| <i>Sus scrofa</i> | Itaperuna | 223 |
| Subtotal | | 790 |
| Nonhuman primates | | |
| Cecal | Rio de Janeiro | |
| <i>Saimiri sciureus</i> | | 285 |
| <i>Saimiri ustus</i> | | 11 |
| <i>Macaca fascicularis</i> | | 85 |
| <i>Macaca mulatta</i> | | 579 |
| Subtotal | | 960 |
| CPRJ | Rio de Janeiro | |
| <i>Cebuella pygmaea</i> | | 1 |
| <i>Callithrix aurita</i> | | 2 |
| <i>Callithrix jacchus</i> | | 2 |
| <i>Callithrix penicillata</i> | | 4 |
| <i>Callithrix geoffroyi</i> | | 2 |
| <i>Callithrix hybrid</i> | | 9 |
| <i>Calibella humilis</i> | | 1 |
| <i>Mico chrysoleucus</i> | | 2 |
| <i>Mico humeralifer</i> | | 2 |
| <i>Mico melanurus</i> | | 1 |
| <i>Mico saterei</i> | | 1 |
| <i>Saguinus sp.</i> | | 17 |
| <i>Leontopithecus sp.</i> | | 53 |
| <i>Callimico goeldii</i> | | 1 |
| <i>Aotus sp.</i> | | 1 |
| <i>Callicebus sp.</i> | | 5 |
| <i>Saimiri sciureus</i> | | 1 |
| <i>Cebus sp.</i> | | 30 |
| <i>Pithecia monachus</i> | | 3 |
| <i>Chiropotes satanas</i> | | 1 |
| <i>Cacajao melanocephalus</i> | | 4 |
| <i>Alouatta guariba clamitans</i> + <i>Alouatta caraya</i> | | 1 |
| <i>Ateles paniscus</i> | | 3 |
| <i>Brachyteles arachnoides</i> | | 8 |
| Subtotal | | 155 |
| Total | | 1905 |

Tabela 2. Frequência de isolamento e manutenção em meio Pavlova modificado de amostras fecais de suínos, Cynomolgus e Rhesus cativos em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro.

| Animal/Município | Selecionadas | | | | Isoladas | | | | Manutenção (*) | | | |
|-----------------------------|--------------|-------------|------------|------------------------|-------------|-------------|------------|------------------------|----------------|-------------|------------|------------------------|
| | Total | trofozoítos | cistos | trofozoítos/ cistos | Total | trofozoítos | Cistos | trofozoítos/ cistos | Total | trofozoítos | cistos | trofozoítos/ cistos |
| Suínos | | | | | | | | | | | | |
| Rio Bonito | 5 | 2 (40%) | 3 (60%) | 0 | 4 (80%) | 2 (40%) | 2 (40%) | 0 | 2 (40%) | 1 (20%) | 1 (20%) | 0 |
| Araruama | 3 | 1 (33,3%) | 2 (66,6%) | 0 | 3 (100%) | 1 (33,3%) | 2 (66,6%) | 0 | 1 (33,3%) | 1 (33,3%) | 0 | 0 |
| Saquarema | 6 | 2 (33,3%) | 2 (33,3%) | 2 (33,3%) | 4 (66,6%) | 2 (33,3%) | 1 (16,6%) | 1 (16,6%) | 4 (66,6%) | 2 (33,3%) | 1 (16,6%) | 1 (16,6%) |
| Maricá | 4 | 2 (50%) | 1 (25%) | 1 (25%) | 2 (50%) | 1 (25%) | 0 | 1 (25%) | 1 (25%) | 0 | 0 | 1 (25%) |
| Itaboraí | 10 | 0 | 9 (90%) | 1 (10%) | 4 (40%) | 0 | 3 (30%) | 1 (10%) | 1 (10%) | 0 | 0 | 1 (10%) |
| Casimiro de Abreu | 19 | 7 (36,8%) | 9 (47,3%) | 3 (15,7%) | 10 (52,6%) | 2 (10,5%) | 8 (42,1%) | 0 | 6 (31,5%) | 0 | 6 (31,5%) | 0 |
| Silva Jardim | 3 | 1 (33,3%) | 1 (33,3%) | 1 (33,3%) | 3 (100%) | 1 (33,3%) | 1 (33,3%) | 1 (33,3%) | 3 (100%) | 1 (33,3%) | 1 (33,3%) | 1 (33,3%) |
| Petrópolis | 28 | 20 (71,4%) | 3 (10,7%) | 5 (17,8%) | 15 (67,8%) | 9 (32,1%) | 2 (7,1%) | 4 (14,2%) | 10 (35,7%) | 7 (25%) | 1 (3,5%) | 2 (7,1%) |
| Itaperuna | 10 | 10 (100%) | 0 | 0 | 7 (70%) | 7 (70%) | 0 | 0 | 2 (20%) | 2 (20%) | 0 | 0 |
| Subtotal Non-human primates | 88 | 45 (51,1%) | 30 (34%) | 13 (14,7%) | 52 (59%) | 25 (28,4%) | 19 (21,5%) | 8 (9%) | 30 (34%) | 14 (15,9%) | 10 (11,3%) | 6 (6,8%) |
| Cynomolgus /Rio de Janeiro | 26 | 14 (53,8%) | 12 (46,1%) | 0 | 17 (65,3%) | 10 (38,4%) | 7 (26,9%) | 0 | 10 (38,4%) | 7 (26,9%) | 3 (11,5%) | 0 |
| Rhesus/Rio de Janeiro | 90 | 59 (65,5%) | 8 (8,8%) | 23 (25,5%) | 38 (31,1%) | 21 (23,3%) | 6 (6,6%) | 11 (12,2%) | 11 (12,2%) | 7 (7,7%) | 2(2,2%) | 2(2,2%) |
| Subtotal | 116 | 73 (62,9%) | 20 (17,2%) | 23 (19,8%) | 55 (47,4%) | 31 (26,7%) | 13 (11,2%) | 11 (11,2%) | 21 (18,1%) | 14 (12%) | 5 (4,3%) | 2 (1,7%) |
| Total | 204 | 118 (57,8%) | 50 (24,5%) | 36 (17,6%) | 107 (52,4%) | 56 (27,4%) | 32 (15,6%) | 19 (9,3%) | 51 (25%) | 28 (13,7%) | 15 (7,3%) | 8 (3,9%) |

*Manutenção em meio xênico Pavlova modificado por no mínimo uma semana.

4. Discussão

O protocolo de isolamento e manutenção de *B. coli* no meio Pavlova modificado aplicado neste estudo permitiu o isolamento de 107 cepas e a manutenção de 51, a partir de 204 amostras fecais selecionadas de espécies animais diferentes. Ainda são escassos os relatos de frequência de isolamento e manutenção de cepas do ciliado. Além disso, a maioria dos estudos de cultivo de *B. coli* descreve pequeno número de cepas em manutenção, variando de um a no máximo cinco (Cunha e Muniz, 1937; Klaas, 1974; Nilles - Bije e Rivera, 2010; Tempelis e Lysenko, 1957). Um maior número de isolados, assim como relatado neste estudo, foi descrito por Svensson (1955) ao manter com sucesso 60 cepas de *B. coli* isoladas de suínos abatidos em matadouros, em meio bifásico contendo soro coagulado de cavalo e parte líquida do mesmo soro.

Levine (1940), Svensson (1955), Tempelis e Lysenko (1957), Zaman (1964), Nilles-Bije e Rivera (2010) relatam isolamento e manutenção de *B. coli* a partir de material obtido do ceco de suínos. Nesse estudo, a retirada do material fecal foi realizada diretamente da ampola retal dos suínos e do assoalho dos recintos dos primatas não humanos cativos, não havendo necessidade de realização de necropsia, o que tornou a coleta mais rápida, menos trabalhosa, além de favorecer o bem estar animal.

Meios xênicos bifásicos tem sido mais empregados no isolamento do ciliado do que os monofásicos. Tempelis e Lysenko (1957) estudando a produção de hialuronidase em cepas de *B. coli*, modificaram o meio de Nelson (1947) substituindo a base de ovo por ágar. Sabe-se que meios bifásicos necessitam de mais de um dia para serem confeccionados, abrangendo etapas de inclinação e solidificação da parte sólida, autoclavação da solução de cobertura líquida e montagem do meio completo nos tubos. Já Pavlova modificado, por ser um meio monofásico líquido, apresentou montagem simples, onde são utilizados poucos reagentes, necessitando em média, duas horas, para produção completa.

Para garantia do sucesso no isolamento e manutenção do protozoário intestinal foi adotada a metodologia descrita por Clark e Diamond (2002) que preconiza a utilização de amostras fecais ricas em células parasitárias, a semeadura direta na presença de trofozoítos, centrifugação de amostras com cistos e a adição de antibióticos de largo espectro como penicilina e estreptomicina, porém foram feitas algumas adaptações.

A inoculação direta das fezes que apresentavam trofozoítos de *B. coli* e a centrifugação de amostras que continham cistos, empregada nesse estudo facilitou o isolamento, pois diminui a etapa de pré-isolamento preconizada por Nelson (1940), onde

o conteúdo fecal era depositado em copo de béquer, posteriormente homogeneizado em solução salina tamponada, filtrado em gaze e depois transferido para um tubo de fundo cônico. Tal material era incubado por 48 horas e somente após esse período, o sedimento dos tubos que apresentassem os melhores crescimentos quantitativos de trofozoítos, poderiam, então, ser inoculados em meio de cultura.

A mais importante adaptação foi o acréscimo de 60 µL de suspensão de amido de arroz nos tubos de ensaio com meio, a cada subcultivo. Isso foi necessário para garantir as reservas energéticas dos parasitos. No momento da montagem do protocolo de isolamento foi observado que cultivos que não recebiam o acréscimo do amido ou que recebiam o amido diretamente diluído no meio, morriam logo nos primeiros dias de incubação. Foi observado também que, trofozoítos que recebem amido de arroz em excesso tornam-se mais arredondados, aumentam de tamanho e diminuem a sua multiplicação, reduzindo, portanto, a quantidade de formas em oito, trofozoítos em processo de divisão (Figura 2D). Tal fato também foi observado por Levine (1940) estudando a morfologia de cepas de *B. coli* isoladas de suínos em meio composto de 5% de soro de cavalo, solução de Ringer e amido de arroz. Cabe ressaltar que o ciliado e os grãos de amido por serem pesados, tendem a se depositar no fundo do tubo, facilitando a ingestão do alimento. Neste estudo foi observado também que com o passar do tempo, os trofozoítos mantidos *in vitro* tornaram-se maiores e mais arredondados do que os trofozoítos das amostras fecais (trofozoítos selvagens), que se apresentavam menores e mais delgados.

Durante a realização deste estudo, manteve-se a mesma concentração de penicilina utilizada por Silva (1997) no isolamento de cepas de *Entamoeba histolytica*, porém aumentou-se a concentração de estreptomicina de 100 µg para 500 µg para melhor controle da microbiota. Os tubos foram mantidos verticalmente em estufa bacteriológica a 36°C, pois Cox (1961) observou que cepas de *B. coli* incubadas nessa faixa de temperatura conseguem se manter viáveis por até quatro dias, o que permite alongar os intervalos de subcultivos.

Os principais componentes dos meios xênicos são fontes de ácidos nucléicos (extrato de levedo), carboidratos (glicose e amido) e lipídeos (soro). O soro de origem animal é um dos reagentes fundamentais para o crescimento dos protozoários intestinais *in vitro*. O soro fetal bovino mostrou-se adequado para manutenção das necessidades nutricionais de *B. coli* concordando com os resultados de Klaas (1974) que conseguiu manter duas cepas de origem suína por até 30 meses e sete meses, respectivamente,

com intervalos de subcultivos de 72 horas utilizando meios xênicos a base de mucina gástrica acrescida deste soro.

Conforme pode-se observar, nem todas as amostras selecionadas obtiveram sucesso no isolamento e na manutenção do protozoário. Este caso pode ser confirmado pela ausência ou presença de formas degeneradas de trofozoítos. Várias hipóteses poderiam justificar tal ocorrência. Entre elas, a pequena quantidade de formas evolutivas viáveis na amostra fecal, não capacidade de desencistamento *in vitro*, equilíbrio inadequado da microbiota – ciliado - meio de cultura e também devido à existência de cepas incapazes de crescer no sistema xênico proposto.

Os melhores resultados para o isolamento do ciliado no meio xênico Pavlova modificado foram obtidos de amostras fecais ricas em trofozoítos, concordando com os relatos de Lima e Hirschfeld (1996) no isolamento de *E. histolytica*. O elevado isolamento a partir de trofozoítos pode ser devido à elevada frequência desta forma evolutiva nas amostras selecionadas. Tal fato ocorreu tanto no material fecal de suínos quanto dos primatas do Velho Mundo do gênero *Macaca*, como os *Cynomolgus* e *Rhesus* do Cecal.

Das 51 cepas de *B. coli* em manutenção, 40 se estabilizaram no meio, onde estão sendo mantidas em período superior a 24 meses. Dessas, 10 foram isoladas de *Cynomolgus* e 30 de suínos. Apesar de elevado tempo de manutenção do protozoário em meio de cultivo Pavlova modificado acrescido de antibióticos, ainda observa-se um sistema xênico, constituído por *B. coli*, flagelados e bactérias. Em nenhum momento do isolamento ou na manutenção do ciliado foi observado a presença de estruturas fúngicas. Elevado tempo de manutenção em cultivo xênico também foi relatado por Zaman (1978) que manteve cepa de *B. coli* isolada de suíno em meio composto de solução salina acrescida de mucina gástrica, soro bovino e amido de arroz por período de 30 meses. Tentativas de manutenção a longo prazo de *B. coli* de suíno *in vitro* sem resultado satisfatório foram relatadas por Nilles - Bije e Rivers (2010) em meio Ringer, acrescido de 10% de soro de cavalo e amido de arroz, onde os trofozoítos mantiveram-se viáveis somente por no máximo 14 dias.

As 11 cepas isoladas de *Rhesus* não apresentaram sucesso na manutenção por longo período no meio proposto. Na grande maioria das vezes as cepas se desenvolviam até uma semana. Esse fato também foi relatado por Cunha e Muniz (1937), que também não conseguiram manter por tempo prolongado cepas de *B. coli* de *Rhesus* em meio xênico bifásico de Boeck e Drobolav modificado. Os autores atribuem à alta acidificação

que ocorre no meio em virtude do metabolismo bacteriano presentes na amostra fecal de Rhesus, que dificulta o desenvolvimento do ciliado.

Atualmente as passagens das cepas para meios novos e frescos tem sido realizadas com intervalos de 48 a 72 horas. Tal adaptação dos intervalos de subcultivos concorda com a prática adotada por Auerbach (1953) que isolou cepa de *B. coli* de suíno em meio xênico bifásico com ovo e solução de Ringer acrescido de soro de cavalo, amido de arroz e soluções de penicilina e estreptomicina e com Rees (1927) em cepas isoladas de suíno e porquinho da Índia (*Cavia porcellus*) mantidas com o meio de Barret e Yarbrough. Assim como evidenciado nos tubos em cultivo desse estudo, Auerbach também relatou a presença de meios com coloração azul após quatro dias de incubação das cepas. Sabe-se que o cultivo xênico, *in vitro*, é sempre acompanhado por bactérias da microbiota intestinal do animal, que ainda não foram identificadas. A função dessa microbiota no metabolismo do ciliado não foi determinada.

O protocolo proposto além de ter contribuído para o isolamento de cepas de *B. coli* em meio xênico, também se mostrou adequado para manutenção do protozoário *in vitro*, pois apresentou uma metodologia facilmente aplicável em laboratórios de pesquisa. Este estudo foi o primeiro a demonstrar todas as etapas de isolamento de *B. coli* e o único que isolou várias cepas do ciliado de fezes de diferentes hospedeiros. Apesar de ser definida neste estudo que os isolados do ciliado pertencem a espécie *B. coli*, ressalta-se a necessidade de tipagem molecular das cepas para melhor classificação taxonômica do protozoário.

Agradecimentos

Os autores agradecem a: FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio de Janeiro), IOC (Instituto Oswaldo Cruz), PROPPI-UFF (Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação da Universidade Federal Fluminense) e PROAES-UFF (Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis da Universidade Federal Fluminense).

Referências

Auerbach E. The study of *Balantidium coli* (Stein, 1863) in relation to cytology and behavior in culture. J Morphol. 1953; 93:405- 445.

Barrett HP, Yarbrough N. A method for the cultivation of *Balantidium coli*. Am J Trop Med. 1921; 1:161-165.

- Carneri I. Isolation of *Balantidium coli* in culture and study of the speed of action of metronidazole and nitrimidazine. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1972; 14:321-325.
- Clark GC, Diamond SL. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. Clin Microbiol Rev. 2002; 15, 329-341.
- Cox FEG. The cultivation of *Balantidium coli* throughout its viable temperature range. Ann Trop Med Parasitol. 1961; 55:305-308.
- Cunha AM, Muniz J. Conjugation and Endomixis in ciliates of the genus *Balantidium*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1937; 32:75-93.
- Dzbenksi TH. Immuno-fluorescent studies on *Balantidium coli*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1966; 60: 387-389.
- Jones WR. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; Method for Evaluating with the anti-amoebic properties of new compounds. Ann Trop Med Parasitol. 1946; 40:130-140.
- Klaas J. Two new gastric mucin cultivation media and a chemically defined maintenance medium for *Balantidium coli*. J Parasitol. 1974; 60:907-910.
- Levine ND. Changes in the dimensions of *Balantidium* from swine upon cultivation. Am J Hyg. 1940; 32, 1-7.
- Lima LM, Hirschfeld MMP. Cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 from fecal samples. Rev Bras Análises Clínicas. 1996; 28:179-181. (Portuguese).
- Nakauchi K. The prevalence of *Balantidium coli* infections in fifty-six mammalian species. J Vet Med Sci. 1999;61:63-65.
- Nelson EC. An intestinal content cultivation medium: I. Methods of preparation and use and data obtained in the cultivation of *Balantidium coli* from the pig. Am J Trop Med Hyg. 1940; 20:731-745.
- Nelson CE. Alcoholic extract medium for the diagnosis of *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med. 1947; 27: 545-552.
- Nilles-Bije ML, Rivera WL. Ultrastructural and molecular characterization of *Balantidium coli* isolated in the Philippines. Parasitol Res. 2010; 106:387 -394.
- Pavlova EA. Sur les Méthodes de la culture d'*Entamoeba histolytica*. Parazitol Med. 1938; 7:224-227. (French).
- Rees CW. Balantidia from pigs and guinea-pigs: Their viability, cyst production and cultivation. Science. 1927;61, 89-91.
- Schuster FL, Ramirez L-Avila. Current World Status of *Balantidium coli*. Clin Microbiol Rev. 2008; 21: 626-638.
- Silva EF. *Entamoeba histolytica*: isolation, axenização and characterization of different strains by morphological, biochemical, biological and pathogenicity in vivo and in vitro. PhD thesis. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 1997; 73 pp. (Portuguese)

Solaymani-Mohammadi S, Petri Jr W.A. Zoonotic implications of the swine Transmitted-protozoal infections. *Vet Parasitol.* 2006;140:189-203.

Svensson R. On the resistance to heating and cooling of *Balantidium coli* in culture and some observations regarding conjugation. *Exp Parasitol.* 1955; 4: 502-525.

Tempelis CH, Lysenko MG. The production of hyaluroidase by *Balantidium coli*. *Exp Parasitol.* 1957; 6:31-36.

Walzer PD, Healy GR. Balantidiasis. In Steele, JH (Ed), *Handbook Series in Zoonoses*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.1982:15-24.

Zaman V. Studies on the immobilization reaction in the genus *Balantidium*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964; 58:255-259.

Zaman V. *Balantidium coli*. In: Kreier JP (Ed). *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, 1978; p. 633-653.

5.6 CAPÍTULO 6

Este capítulo pleitea o objetivo: Analisar o comportamento de Balantidium sp. em diferentes meios de cultura xênicos.

Situação: Artigo em construção

Contexto: O comportamento de 40 cepas em manutenção de Balantidium sp. foram avaliadas após a incubação em três meios xênicos com distintos tempos de incubação.

Avaliação do comportamento de cepas de *Balantidium coli* (Malmsten, 1857) em meios de cultura xênicos

Resumo

Balantidium coli é um protozoário parasito que tem como principais hospedeiros suínos, primatas não humanos e humanos. A balantidiose é considerada uma zoonose, podendo determinar quadros clínicos de disenteria. Infecções pelo protozoário foram relatadas em diversas partes do mundo. Seu diagnóstico laboratorial é rotineiramente realizado por técnicas parasitológicas de concentração, sendo poucas as pesquisas que utilizam cultivo para isolá-lo ou mantê-lo. Para ampliar as informações sobre a manutenção *in vitro* de *B. coli*, esse estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de cepas desse protozoário em três meios de cultura xênicos. De agosto de 2013 a fevereiro de 2015 foram estudadas 40 cepas do parasito que estavam em manutenção, sendo 10 isoladas de *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) e 30 de suínos (*Sus scrofa*). Foi utilizado um inóculo padrão de 500 trofozoítos, que foi transferido para tubos de ensaio contendo os meios LES, TYSGM-9 e Pavlova modificado por Jones, sendo incubados em estufa a 36° C. Os ciliados em cultivo foram analisados nos tempos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas. A avaliação foi realizada a partir da contagem de trofozoítos por mililitro em cada um dos meios. TYSGM-9 mostrou ser ideal para procedimentos que necessitam de massa parasitária rápida, pois apresentou nível máximo de trofozoítos em menor tempo de incubação, 48 horas e onde pode ser observado altas contagens de células parasitárias por mililitro em cepas isoladas de ambos os animais. Pavlova modificado apresentou nível máximo de células em 72 horas de incubação, demonstrando desenvolvimento mais lento, porém por maior tempo. Em LES foi possível manter os trofozoítos viáveis somente até 24 horas de incubação. Apesar do resultado satisfatório em TYSGM-9, Pavlova modificado foi considerado o meio ideal para manutenção das cepas, por garantir a viabilidade do parasito em intervalos de subcultivos mais longos, determinando, assim, maior segurança para manutenção do protozoário, além de ser o meio de cultivo, entre os estudados, de menor custo e de fácil preparo.

Palavras-chave: *Balantidium coli*; Cinética; Pavlova modificado, TYSGM-9, LES.

1. Resultados

As cepas de *B. coli* isoladas de *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) mantidas em meio TYSGM-9 apresentaram crescimento quantitativo a partir do inóculo até 48 horas de incubação. Em Pavlova modificado a fase de crescimento das cepas pode ser observada até 72 horas. Após esses períodos, o número de protozoários começou a declinar em ambos meios. No meio LES os trofozoítos não apresentaram crescimento quantitativo a partir do inóculo nos quatro tempos de incubação analisados (24, 48, 72 e 96 horas) (Figura 1).

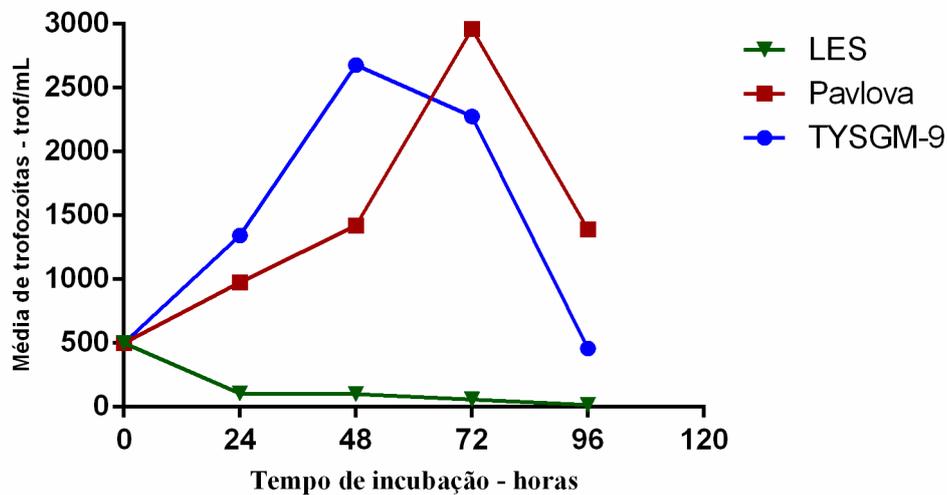


Figura 1. Padrão quantitativo de crescimento de trofozoítos de *Balantidium coli* isolados de *Cynomolgus* mantidos sob diferentes tempos de incubação nos meios de cultura Pavlova modificado, TYSGM-9 e LES.

As maiores contagens de células por mililitro ocorreram com 72 horas de incubação, com a cepa M23 mantida no meio TYSGM-9, seguida de M98, M26 no meio Pavlova modificado, que apresentaram mais de 10.000 trofozoítos por mililitro após análises dos tubos quando avaliadas neste mesmo tempo de incubação. O meio Pavlova modificado e TYSGM-9 conseguiram manter os trofozoítos nos quatro tempos de incubação estudados em todas as cepas analisadas, o que não ocorreu no meio xênico LES, nas cepas M43 e M73 com 72 horas e M41, M43, M69 e M73 com 96 horas. O meio LES conseguiu manter os trofozoítos, mesmo que em pouca quantidade, somente até 48 horas de incubação (Tabela 1).

Tabela 1. Número total de trofozoítos de *Balantidium coli* isolados de primatas não humanos mantidos sob diferentes tempos de incubação nos meios de cultura xênicos Pavlova modificado, TYSGM-9 e LES.

| Cepas | Meio Pavlova modificado | | | | Meio TYSGM9 | | | | LES | | | |
|-------|-------------------------|--------|--------|--------|-------------|--------|--------|-------|-------|-------|------|------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| M23 | 1280 | 1410 | 1230 | 380 | 6440 | 12895 | 16575 | 25 | 115 | 430 | 145 | 115 |
| M26 | 980 | 3500 | 10310 | 4550 | 820 | 800 | 325 | 545 | 585 | 325 | 70 | 10 |
| M41 | 4000 | 765 | 635 | 15 | 705 | 1930 | 2365 | 980 | 10 | 80 | 310 | 0 |
| M43 | 180 | 265 | 580 | 110 | 100 | 165 | 130 | 270 | 5 | 15 | 0 | 0 |
| M47 | 720 | 2070 | 3532,5 | 2162,5 | 402,5 | 1320 | 127,5 | 7,5 | 5 | 5 | 7,5 | 7,5 |
| M48 | 980 | 1830 | 1225 | 655 | 585 | 805 | 325 | 187,5 | 127,5 | 62,5 | 35 | 10 |
| M54 | 240 | 280 | 255 | 40 | 115 | 295 | 165 | 265 | 25 | 35 | 10 | 5 |
| M69 | 282,5 | 385 | 395 | 22,5 | 520 | 1007,5 | 630 | 345 | 7,5 | 5 | 5 | 0 |
| M73 | 240 | 930 | 115 | 20 | 385 | 6655 | 1320 | 1490 | 20 | 5 | 0 | 0 |
| M98 | 875 | 2775 | 11345 | 5950 | 3365 | 920 | 805 | 475 | 170 | 40 | 10 | 5 |
| Média | 977,8 | 1421,0 | 2962,3 | 1390,5 | 1343,8 | 2679,3 | 2276,8 | 459,0 | 107,0 | 100,3 | 59,3 | 15,3 |

As cepas de *B. coli* isoladas de suínos apresentaram crescimento no meio TYSGM-9 até 48 horas de incubação. No meio Pavlova modificado pode ser observado um crescimento quantitativo a partir de 24 horas de incubação, sendo que o crescimento máximo ocorreu no período de 48 a 72 horas. No meio LES não foi observado crescimento quantitativo das cepas a partir do inóculo (Figura 2).

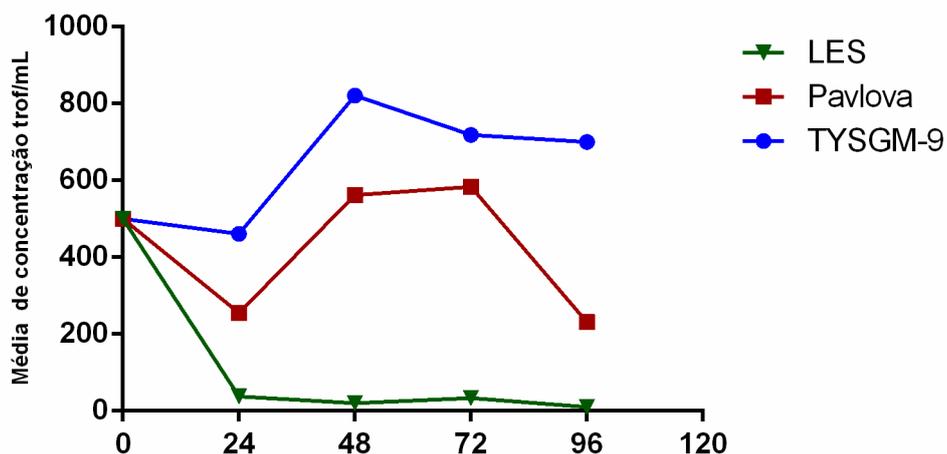


Figura 2. Padrão quantitativo de crescimento de trofozoítos de *Balantidium coli* isolados de suínos mantidos sob diferentes tempos de incubação nos meios de cultura Pavlova modificado, TYSGM9 e LES.

A maior contagem de células parasitárias dos isolados de suínos ocorreu com 48 horas de incubação no meio TYSGM-9, nas cepas S1, que apresentou mais de 6.000 trofozoítos. O meio TYSGM-9 e o Pavlova modificado conseguiram manter os trofozoítos isolados de suínos até 72 horas de incubação. Já o meio LES conseguiu manter somente até as 24 horas (Tabela 2).

Tabela 2. Número total de trofozoítos de *Balantidium coli* isolados de suínos mantidos sob diferentes tempos de incubação nos meios de cultura xênicos Pavlova modificado, TYSGM-9 e LES.

| Cepas | Pavlova modificado | | | | TYSGM-9 | | | | LES | | | |
|-------|--------------------|--------|--------|-------|---------|--------|--------|--------|-------|------|-------|------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| S1 | 1385 | 930 | 115 | 20 | 4730 | 6655 | 1320 | 1490 | 650 | 5 | 0 | 0 |
| S19 | 182,5 | 210 | 300 | 27,5 | 332,5 | 680 | 450 | 242,5 | 40 | 72,5 | 7,5 | 0 |
| S25 | 20 | 32,5 | 67,5 | 220 | 70 | 252,5 | 210 | 57,5 | 2,5 | 0 | 0 | 0 |
| S29 | 37,5 | 52,5 | 35 | 12,5 | 65 | 620 | 310 | 5 | 7,5 | 10 | 7,5 | 5 |
| S30 | 600 | 805 | 927,5 | 187,5 | 252,5 | 540 | 447,5 | 2385,5 | 2,5 | 0 | 0 | 0 |
| S32 | 205 | 230 | 25 | 0 | 415 | 360 | 215 | 120 | 25 | 0 | 0 | 0 |
| S39 | 185 | 1187,5 | 320 | 12,5 | 202,5 | 347,5 | 920 | 132,5 | 27,5 | 20 | 7,5 | 2,5 |
| S46 | 237,5 | 237,5 | 97,5 | 0 | 630 | 630 | 1850 | 1025 | 102,5 | 105 | 127,5 | 0 |
| S58 | 132,5 | 395 | 307,5 | 60 | 182,5 | 572,5 | 215 | 1635 | 10 | 25 | 2,5 | 0 |
| S73 | 135 | 342,5 | 300 | 0 | 82,5 | 240 | 342,5 | 7,5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| S74 | 74 | 457,5 | 567,5 | 802,5 | 782,5 | 1777,5 | 1085 | 1055 | 82,5 | 120 | 590 | 55 |
| S77 | 307,5 | 900 | 2670 | 35 | 382,5 | 1102,5 | 1122,5 | 3375 | 22,5 | 17,5 | 7,5 | 0 |
| S80 | 90 | 180 | 797,5 | 55 | 150 | 172,5 | 262,5 | 130 | 7,5 | 12,5 | 2,5 | 0 |
| S82 | 220 | 405 | 662,5 | 1145 | 167,5 | 847,5 | 2402,5 | 2315 | 5 | 5 | 12,5 | 0 |
| S83 | 667,5 | 620 | 1167,5 | 327,5 | 52,5 | 877,5 | 682,5 | 17,5 | 22,5 | 5 | 0 | 0 |
| S84 | 165 | 2592,5 | 915 | 150 | 210 | 1647,5 | 1910 | 2147,5 | 2,5 | 52,5 | 17,5 | 0 |
| S86 | 105 | 545 | 250 | 80 | 87,5 | 720 | 1302,5 | 1337,5 | 25 | 67,5 | 30 | 5 |
| S87 | 127,5 | 47,5 | 77,5 | 10 | 192,5 | 500 | 130 | 25 | 15 | 10 | 5 | 0 |
| S98 | 285 | 412,5 | 237,5 | 12,5 | 420 | 820 | 1437,5 | 762,5 | 27,5 | 15 | 17,5 | 0 |
| S100 | 432,5 | 1487,5 | 2537,5 | 2065 | 102,5 | 320 | 440 | 1010 | 2,5 | 0 | 0 | 0 |
| S215 | 490 | 700 | 575 | 0 | 340 | 1152,5 | 670 | 27,5 | 5 | 17,5 | 0 | 0 |
| S223 | 275 | 295 | 505 | 140 | 270 | 145 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| S329 | 2 | 15 | 5 | 0 | 2483 | 740 | 475 | 92,5 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| S373 | 10 | 15 | 2,5 | 2,5 | 15 | 22,5 | 25 | 15 | 2,5 | 5 | 0 | 0 |
| S479 | 240 | 730 | 845 | 355 | 270 | 485 | 310 | 15 | 2,5 | 10 | 15 | 17,5 |
| S542 | 442,5 | 1445 | 912,5 | 185 | 387,5 | 337,5 | 110 | 27,5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| S548 | 297,5 | 780 | 1037,5 | 547,5 | 390 | 1392,5 | 875 | 642,5 | 1 | 5 | 62,5 | 92,5 |
| S564 | 75 | 252,5 | 190 | 0 | 120 | 397,5 | 825 | 60 | 10 | 20 | 7,5 | 0 |
| S628 | 270 | 440 | 1075 | 490 | 60 | 265 | 1230 | 885 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| S650 | 55 | 75 | 12,5 | 0 | 1 | 20 | 2,5 | 1 | 2,5 | 5 | 0 | 0 |
| Média | 291,8 | 481,7 | 477,7 | 114,8 | 704,1 | 1152,3 | 669,5 | 741,4 | 86,8 | 32,5 | 67,5 | 5,7 |

De forma geral a fase log (fase de crescimento) das cepas de *B. coli* no meio TYSGM-9 ocorreu entre 24 a 48 horas de incubação e em Pavlova modificado entre de 24 a 72 horas, tanto para os trofozoítos isolados de *Cynomolgus*, quanto para os de suínos. A fase estacionária foi muito curta ou quase ausente e o declínio em TYSGM-9 e em Pavlova modificado começou a ocorrer após 48 e 72 horas de incubação, respectivamente.

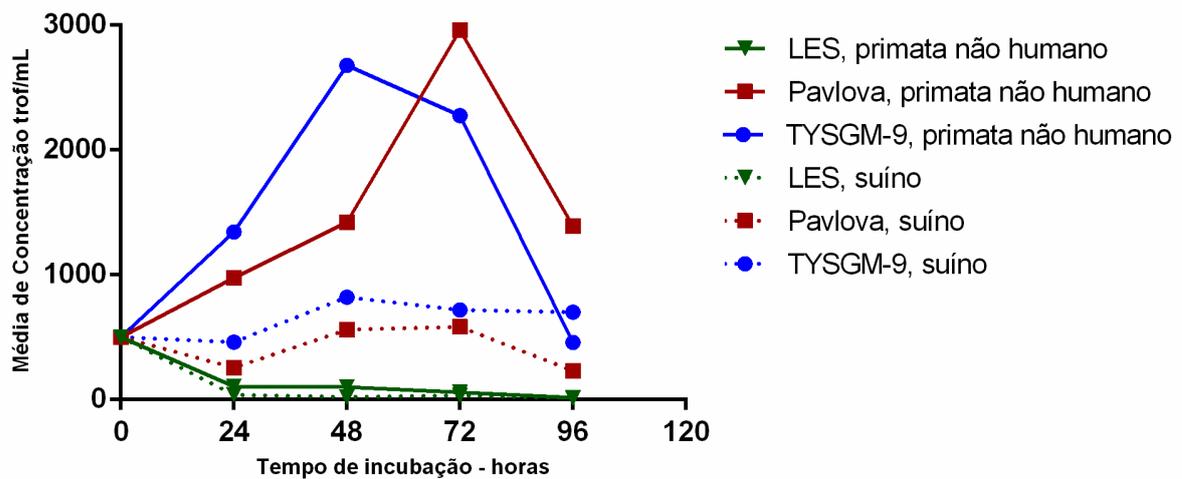


Figura 3. Padrão quantitativo de crescimento de trofozoítos de *Balantidium coli* isolados de *Cynomolgus* e suínos mantidos sob diferente tempos de incubação nos meios de cultura Pavlova modificado, TYSGM9 e LES.

2. Discussão

Diversas são as pesquisas que utilizam culturas de protozoários como base na aquisição de células (Clark e Diamond, 2002). Porém, ainda são poucos os estudos que avaliam o comportamento do parasito quando mantido em diferentes meios de cultura xênicos, tendo sido recuperado em base científica, os estudos de Diamond (1953) para *Trichomonas gallinae*, Botero (1961) para *Entamoeba histolytica*, Klaas (1974) para *B. coli*, Diamond (1982) para *E. histolytica* e Limoneu et al. (2007) para *Trichomonas vaginalis*.

O comportamento de *B. coli* nos meios Pavlova modificado, TYSGM-9 e LES foram avaliados em quatro tempos de incubação 24, 48, 72 e 96 horas. Os tempos de 24 e 48 horas tem sido os mais utilizados na manutenção desse ciliado (Barret e Yarbrough, 1921; Cunha e Muniz, 1937; Svensson, 1955; Zaman, 1964), porém a manutenção das cepas do protozoário em tempos de incubação em 72 e 96 horas já foram obtidas com sucesso por Cox (1961). A metodologia da avaliação cinética realizada neste estudo teve que ser toda padronizada. Devido ao elevado tamanho do trofozoíto, a contagem das cepas foi sempre realizada em duplicatas de lâmina de microscopia, pois muitas células parasitárias do ciliado eram perdidas quando se tentou realizar a contagem em câmara de Neubauer.

Nesse estudo, TYSGM-9 apresentou-se como um sistema xênico adequado para manutenção de trofozoítos de *B. coli in vitro*, pois cepas de *Cynomolgus* e de suínos quando inoculadas nesse meio apresentaram crescimento a partir do inóculo. A fase log ficou caracterizada até 48 horas de incubação. Após esse período, a quantidade de células começou a declinar, sendo os trofozoítos de suínos mantidos viáveis até 72 horas de incubação e os de *Cynomolgus* até 96 horas. Estes resultados indicam a necessidade de transferências de cepas para meios novos e frescos, a cada três dias o que garante uma maior produtividade no laboratório e menor gasto de insumos.

Segundo Diamond (1982) meios como o TYSGM-9, que contém mucina gástrica, tem se mostrado satisfatórios no cultivo de diversos enteroprotzoários. Resultados similares, aos obtidos com TYSGM-9 nesse estudo, foram relatados por Klaas (1974) que conseguiu manter com êxito cepas de *B. coli* de suínos com intervalos de repasse a cada três dias utilizando meio xênico contendo mucina gástrica. Dolkart e Halpern (1958) afirmaram que a mucina gástrica possui

substâncias que favorecem o crescimento de protozoários intestinais, pois é um componente natural da mucosa intestinal, habitat desse parasito. Além disso, TYSGM-9 foi o único meio de cultura analisado no qual pode ser observado o maior desenvolvimento quantitativo das cepas de suínos. Acredita-se que a mucina gástrica do tipo porcina, utilizada neste estudo, pode ter contribuído para o melhor desenvolvimento das cepas suínas.

TYSGM-9 mostrou ser ideal para estudos que necessitam de massa parasitária rápida, pois foi o meio de cultivo que apresentou nível máximo de trofozoítos, em menor tempo, 48 horas, e onde pode ser observado altas contagens de trofozoítos por mililitro em cepas isoladas de ambas as espécies de animais, destacando M23 que apresentou contagens acima de 10.000 e S1 com contagens acima de 6.000. Tais resultados concordam com os obtidos por Diamond (1982) que também relatou elevado crescimento em 48 horas utilizando esse meio no cultivo de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba gingivalis* e *Dientamoeba fragilis* a partir da inoculação de 5.000 trofozoítos por mililitro.

Assim como o TYSGM-9, o meio Pavlova modificado conseguiu manter cepas de *B. coli* isoladas de *Cynomolgus* e de suínos em 72 a 96 horas de incubação respectivamente, evidenciando também a necessidade de passagens para meios novos e frescos em intervalos de três dias. Lima e Hirschfeld (1996) e Silva (1997) também relataram a manutenção com sucesso, utilizando cepas de *E. histolytica*, no mesmo meio Pavlova modificado com intervalos de subcultivos a cada 72 horas. Apesar de não ter mencionado os tempos de subcultivos, Carneri (1972) relatou que cepas de *B. coli* de suínos foram mantidas por muito tempo em meio Pavlova modificado na Inglaterra e na Itália. Além disso, esse autor também utilizou esse meio de cultivo para produção de trofozoítos utilizados em estudos de triagem de fármacos. Cabe ressaltar que somente os meios monofásicos utilizados nesse estudo, TYSGM-9 e Pavlova modificado por Jones (1946) possuem em sua composição extrato de levedo. Tal substância tem sido considerada uma das principais estimuladoras de crescimento de cultivos xênicos, por ser uma excelente fornecedora de ácidos nucleicos (Clark e Diamond, 2002).

Em média, no meio Pavlova modificado também foi observada elevadas contagens de trofozoítos isolados de *Cynomolgus*, obtendo-se o nível máximo de células em 72 horas de incubação, demonstrando multiplicação mais lenta, porém por um período maior de tempo quando comparado com a manutenção de tais

cepas em TYSGM-9. Segundo Cox (1961) cepas que alcançam o nível máximo de crescimento rapidamente irão, conseqüentemente, exaurir os nutrientes do meio de cultivo e com isso, apresentarão fase de declínio precoce. Pavlova modificado, assim como TYSGM-9, manteve todas as culturas de símios viáveis por até 96 horas. Contudo, tal fato não foi observado com cepas de origem suína, nas quais foi observado crescimento moderado a partir do inóculo, apesar de tais cepas terem apresentado viabilidade até 72 horas de incubação.

Apesar do meio LES e de suas modificações já terem sido utilizados com sucesso no isolamento e manutenção *in vitro* de amebídeos (Clark e Diamond, 2002) e de cepas de *B. coli* isoladas de suíno, humano e símio (Cunha e Muniz 1937), no presente estudo esse meio não demonstrou ser um sistema de cultivo xênico indicado para manutenção *in vitro* dos trofozoítos isolados de *Cynomolgus* e de suínos. De forma geral LES conseguiu garantir a manutenção de trofozoítos somente até 24 horas de incubação. Além disso, foram poucas as cepas que cresceram a partir do inóculo, como M26 e S1 em 24 horas.

Segundo Diamond (1982) LES vem sendo cada vez menos utilizado por apresentar preparação trabalhosa e demorada. Por ser bifásico, esse meio de cultivo necessita de mais de um dia para ser confeccionado, abrangendo etapas de inclinação e endurecimento da parte sólida; autoclavação da solução de cobertura (solução de Locke) e da porção sólida e montagem dos tubos contendo o bisel sólido com a porção líquida que consiste na solução de Locke acrescida de soro. Já os meios Pavlova modificado e TYSGM-9 apresentam montagem e produção mais simples, por se tratarem de meios monofásicos líquidos, necessitando de apenas um dia para sua preparação. Além disso, esses meios monofásicos podem ser mantidos por um mês ou até mais em temperatura de geladeira (4°C), enquanto que o LES não pode ser estocado por muito tempo, pois, possui fase sólida a base de ovo, que tende a rachar com o tempo.

No presente estudo, o desempenho desfavorável do meio LES pode ser atribuído à falta de nutrientes necessários para manutenção do metabolismo do ciliado. Os resultados obtidos por Diamond (1953) avaliando 28 meios de cultivo para manutenção de *Trichomonas gallinae*, concordam com esse estudo, pois o flagelado também não apresentou bom crescimento e manutenção em LES. O autor apontou que o tipo de bactéria produzida nesse meio pode desfavorecer a multiplicação do protozoário, e a glicose utilizada na solução de Locke, pode

funcionar como substrato para o desenvolvimento bacteriano. Já em 1982, o mesmo autor relatou que o meio LES apresentou sensibilidade de manutenção para várias espécies de amebídeos duas vezes menor do que o meio TYSGM-9 (Diamond, 1982).

A superfície sólida em formato de bisel do meio LES, produzida com ovo de galinha, pode ter desempenhado efeito negativo na manutenção de cepas de *B. coli*. Os ciliados e os grãos de amido de arroz, sua fonte de carboidrato, podem ter ficado aderidos ao longo do bisel, dificultando a movimentação do parasito e a aquisição do alimento. Tal dificuldade de aquisição do carboidrato, por parte do protozoário não foram observados nos meios monofásicos líquidos estudados, pois tanto em Pavlova modificado, quanto em TYSGM-9, o ciliado e os grãos de amido de arroz por serem pesados, tenderam a se depositar no fundo do tubo, facilitando o acesso ao alimento.

Neste estudo pode-se evidenciar que, a grande maioria das cepas isoladas de *Cynomolpus* cresceu quantitativamente mais nos meios avaliados do que as cepas de suínos, determinando de forma geral a maior concentração de trofozoítos, acima de 2500 células parasitárias por mililitro. Segundo Diamond (1953) e Schuster e Ramirez-Ávila (2008) as cepas podem apresentar comportamento *in vitro* diferentes, mesmo quando isoladas de uma única espécie de hospedeiro.

Comportamentos distintos também ocorreram entre cepas de *Cynomolpus*. Observou-se que M23 apresentou crescimento muito superior do que foi observado nas outras cepas, principalmente em meio TYSGM-9, onde ocorreu contagem acima de 16.500 trofozoítos por mililitro, valor 32 vezes maior que o inoculado. Por outro lado cepas como a M43 apresentaram, no mesmo tempo de incubação e meio, apenas 270 trofozoítos por mL, cerca de metade do inoculado. O mesmo aconteceu no meio Pavlova modificado, na cepa M54, na qual a maior contagem foi 280 trofozoítos por mL com 48 horas de incubação, enquanto que com M98 no mesmo meio, apresentou a máxima concentração de células parasitárias de 11.000 por mL em 72 horas de incubação. Nas cepas de suínos também ocorreram diferenças notáveis entre as contagens de cepas S1 que apresentou mais de 6.000 trofozoítos por mililitro em TYSGM-9 em 48 horas de incubação, mais de 1300 em Pavlova modificado em 24 horas e mais de 600 em meio LES também em 24 horas.

O crescimento das cepas foi avaliado tomando como base a estimativa da quantidade de trofozoítos móveis presentes em cada tubo de ensaio sob diferentes

tempos de incubação. De forma geral, a avaliação do comportamento de cepas de microrganismos pode ser observada por meio de um delineamento de uma curva de crescimento que leva em consideração uma média. A diferença no comportamento dos isolados torna difícil, muitas vezes, a escolha de um meio de cultivo ótimo para todos, sendo, portanto, ideal para a manutenção de tais protozoários, sistemas xênicos que consigam com o maior intervalo de tempo de incubação possível garantir pelo menos a viabilidade de todas as cepas.

Neste estudo, pode-se evidenciar a importância dos meios xênicos monofásicos líquidos, TYSGM-9 e Pavlova modificado, destacando a utilização de ambos na garantia de manutenção das cepas utilizadas. Cabe ressaltar que o meio TYSGM-9 demonstrou ser o mais adequado para estudos que necessitam de produção de massa parasitária, devido a rápida fase log e talvez como indicado por Diamond (1982) no cultivo de amebídeos, possa no futuro, ser utilizado como meio de transição de culturas xênicas para axênicas. Porém TYSGM-9, ainda está longe de se tornar o meio indicado para manutenção laboratorial de rotina, pois a mucina gástrica, não é um reagente fácil de ser encontrado, além de apresentar custo elevado. No entanto, quando se comparou os meios monofásicos estudados, Pavlova (1938) modificado por Jones (1946) foi considerado o ideal para manutenção das cepas do ciliado, por garantir a viabilidade do parasito até as 72 horas de incubação, proporcionando um intervalo de subcultivo seguro, sendo um sistema xênico de baixo custo e de fácil preparo.

O presente estudo além de ter contribuído para o conhecimento do comportamento de *B. coli* quando mantido em diferentes meios xênicos, também delineou a curva de crescimento cinético. Esse delineamento permitiu otimizar a rotina laboratorial de manutenção desse ciliado *in vitro*, pois, depois da análise desses resultados, foi possível aumentar os intervalos de subcultivos, de 48 horas para 72 horas. Esse maior espaçamento diminuiu o número de subcultivos, consequentemente reduzindo o gasto com reagentes utilizados na confecção do meio, propiciando também a redução da carga de trabalho na rotina laboratorial. Cabe ressaltar a necessidade de mais estudos que avaliem a cinética de crescimento de *B. coli*, pois ainda são poucas as informações a respeito da manutenção *in vitro* desse ciliado.

Referências

- Barrett HP, Yarbrough N. A method for the cultivation of *Balantidium coli*. Am J Trop Med. 1921; 1:161-165.
- Botero RD. Rate of growth of *Entamoeba histolytica* in different culture media. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1961; 55(6):539 – 546.
- Carneri I. Isolation of *Balantidium coli* in culture and study of the speed of action of metronidazole and nitrimidazine. Rev Inst Med Trop São Paulo 1972; 14:321-325.
- Clark GC, Diamond SL. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. Clin Microbiol Rev. 2002; 15, 329-341.
- Cox FEG. The cultivation of *Balantidium coli* throughout its viable temperature range. Ann Trop Med Parasitol. 1961; 55, 305-308.
- Cunha AM, Muniz J. Conjugation and Endomixis in ciliates of the genus *Balantidium*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1937; 32, 75-93.
- Diamond LS. A comparative study of 28 culture media for *Trichomonas gallinae*. Experiment Parasitol. 1953; 3(3):251–258.
- Diamond LS. A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen dwelling protozoa. J Parasitol. 1982; 958 – 959.
- Dolkart RE, Halpern B. A new monophasic medium for the cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg. 1958; 7:595-596.
- Kim JCS, Abee CR, Wolf RH. Balantidiosis in a chimpanzee (*Pan troglodytes*). Lab Anim. 1978; 12: 231-233.
- Klaas J. Two new gastric mucin cultivation media and a chemically defined maintenance medium for *Balantidium coli*. J Parasitol. 1974; 60; 907-910.
- Jones WR. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; Method for Evaluating with the anti-amoebic properties of new compounds. Ann Trop Med Parasitol. 1946; 40: 130-140.
- Lima LM, Hirschfeld MMP. Cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 from fecal samples. Rev Bras Análises Clínicas. 1996; 28: 179-181.

Limoneu ME, Kilimeioğlu AA, Kurt Ö, Östan I, Özkütük N, Özbilgin A. Two novel serum-free media for the culture of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol Res. 2007; 100:599-602.

Pavlova E.A. Sur les Méthodes de la culture d'*Entamoeba histolytica*. Parazitol Med. 1938; 7: 224-227. (French).

Schuster FL, Ramirez – Ávila L. Current World Status of *Balantidium coli*. Clin Microbiol Rev. 2008; 21, 626-638.

Silva EF. *Entamoeba histolytica*: isolamento, axenização e caracterização de diferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade “in vivo” e “in vitro”. PhD thesis. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 73 pp. 1997.

Svensson R. On the resistance to heating and cooling of *Balantidium coli* in culture and some observations regarding conjugation. Exp. Parasitol. 1955; 4:502-525.

Zaman V. Studies on the immobilization reaction in the genus *Balantidium*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1964; 58, 255-259.

5.7 CAPÍTULO 7

*Este capítulo pleitea o objetivo: Caracterizar os isolados em manutenção de *Balantidium* sp. por meio de ferramentas moleculares.*

Situação: Artigo em construção.

Contexto: Foram avaliadas por meio de análises moleculares isolados do parasito de suínos e símios em manutenção in vitro e amostras fecais contendo cistos.

Caracterização filogenética de *Balantidium coli* (Malmsten, 1857) isolados de suínos e primatas não humanos

Resumo

Balantidium sp. é um parasito de ampla distribuição geográfica, já tendo sido descritas mais de 50 espécies com base em sua morfologia e hospedeiros. O gênero foi detectado em amostras de humanos, suínos domésticos, javalis, ovelhas, equinos, bovinos, porquinhos da Índia, tartarugas, primatas não humanos, répteis, pássaros, peixes e artrópodes. Sabe-se que a morfologia do trofozoíto ou o hospedeiro são insuficientes para classificar taxonomicamente os ciliados. Para confirmação da espécie, tem sido utilizadas ferramentas de biologia molecular, sendo o principal alvo de sequenciamento o RNA ribossomal e seus fragmentos. O objetivo do estudo foi caracterizar por meio de metodologia molecular isolados de *Balantidium* sp. de animais cativos de diferentes municípios do Rio de Janeiro. Entre 2014 a 2015 foram analisadas por meio de técnicas moleculares isolados de *Balantidium* sp. em cultivo, bem como os cistos presentes em material fecal. Amostras fecais com trofozoítos foram submetidas ao isolamento em meio Pavlova, sendo mantidas com sucesso um total de 40 isolados. Destes, 30 foram obtidos de suínos e 10 de *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*). Aliquotas destes isolados com trofozoítos, assim como mais 34 amostras fecais, sendo 8 de suínos, 8 de *Cynomolgus* e 18 de Rhesus (*Macaca mulatta*) contendo cistos do protozoário foram armazenadas em microtubos contendo álcool e encaminhadas a Universidade Complutense de Madrid para análise molecular. As amostras foram submetidas a extração do DNA e reação em polimerase em cadeia para amplificação do fragmento ITS1 – 5.8s rRNA – ITS2. Os produtos da PCR foram purificados e submetidos ao sequenciamento. Todas as sequências foram agrupadas dentro de um único cluster, junto com sequências de referência do Genbank, correspondendo à espécie *Balantidium coli*, sendo em sua maioria classificadas como variantes A0, assim como a sequência referência de humano. Apenas uma amostra de suíno apresentou variantes mistas. As sequências estudadas foram mais homogêneas entre si, pressupondo um favorecimento em território nacional desta variante. Mais estudos com amostras de humanos, de outros animais, principalmente símios neotropicais utilizando mais marcadores moleculares necessitam ser realizados para confirmar esta informação.

Palavras-chave: *Balantidium*; Análise molecular; Filogenia; Brasil

1. Resultados

As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no Genbank sob os números de acesso KT310270 – KT310343 (Tabela 1 – 2) e apresentaram em média 365 pb. A árvore filogenética foi produzida a partir do marcador ITS1 – 5.8s RNAr - ITS2 e estimada com as inferências Maximum likelihood (ML) e Neighbor - Joining (NJ). Grupos filogenéticos foram considerados válidos quando os valores de *bootstraps* foram maiores que 50% em ML e NJ. Para demarcar a raiz os fragmentos de nucleotídeos deste estudo foram alinhados com sequências de referência de outros ciliados, como *Isotricha protosma* e *Troglodytella abrassarti* (Figura 1 e 2).

Todas as sequências analisadas deste estudo foram agrupadas dentro de um único cluster, correspondendo à espécie *Balantidium coli*, tanto as obtidas de amostras de fecais como as de isolados em cultivo, concordando em média em 96% a 99% com fragmentos de referência que foram obtidos do Genbank, e que também foram obtidas a partir do mesmo fragmento gênico.

Dentro deste grande grupo de *B. coli*, também pode ser observada três pequenas subdivisões, na primeira são observadas sequências de fezes e cultivo tanto de Cynomolgus quanto de suínos (B3 – 5, B10 – 11, B63 e B66), sendo que este ramo obteve um *bootstrap* significativo somente na análise de NJ. Um segundo ramo composto por sequências de cultivo de *B. coli* de isolados de Cynomolgus e de fezes de Cynomolgus e Rhesus apresentou *bootstraps* significativo tanto no ML quanto em NJ (B51, B59, B69 e B65). A terceira subdivisão, também apresentou elevados *bootstraps*. Esta é formada por uma sequência obtida de fezes de suíno (B47 II), junto com duas sequências de referência, sendo uma também de suíno e outra de gorila.

Os fragmentos de nucleotídeos das amostras deste estudo foram classificados em sua maioria como sequências variantes tipo A0, sendo posicionadas no mesmo grupo filético das sequências referência de chimpanzé e humano. Apenas uma amostra fecal de suíno apresentou variantes mistas, tanto A (B47I - KT310317) quanto B (B47II - KT310317), sendo agrupada com outras sequências de referência do tipo B (Figura 1).

Como pode ser observado nas matrizes (Tabela 3 – 4) muitos isolados em cultivos apresentaram valores de distância igual a 0,00 quando comparados a sequências produzidas a partir da amplificação do DNA de *B. coli* obtido das fezes. Também pode ser observado elevado valores de distância, acima de 0,050, em fragmentos de isolados em cultivo e das fezes quando comparados com as sequências de referência do Genbank (Tabela 3 – 5).

A região ITS1 foi a que apresentou o maior número de nucleotídeos hipervariáveis, seguida pela região ITS2. A região 5.8s mostrou ser a mais conservada. Ambiguidades foram mais observadas na região ITS1, principalmente nos fragmentos obtidos de material fecal (Figura 2). As posições de nucleotídeos que apresentaram a maior frequência de alteração estão marcadas na sequência consenso produzida neste estudo (Figura 3).

Tabela 1. Identificação dos Isolados em cultivo de *Balantidium coli* estudados por ferramentas moleculares.

| Nº | Amostra | Local | Nº Sequências |
|----|---------|---|---------------|
| 1 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 3 | KT310270 |
| 2 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 5 | KT310271 |
| 3 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 3 | KT310272 |
| 4 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 1 | KT310273 |
| 5 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 4 | KT310274 |
| 6 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 4 | KT310275 |
| 7 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 2 | KT310276 |
| 8 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 1 | KT310277 |
| 9 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 1 | KT310278 |
| 10 | Cultivo | <i>Macaca fascicularis</i> Cecal/Fiocruz/Recinto 12 | KT310279 |
| 11 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Rio Bonito | KT310280 |
| 12 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Rio Bonito | KT310281 |
| 13 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Aruama | KT310282 |
| 14 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Saquarema | KT310283 |
| 15 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Saquarema | KT310284 |
| 16 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Saquarema | KT310285 |
| 17 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Saquarema | KT310286 |
| 18 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Maricá | KT310287 |
| 19 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Itaboraí | KT310288 |
| 20 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Casimiro de Abreu | KT310289 |
| 21 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Casimiro de Abreu | KT310290 |
| 22 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Casimiro de Abreu | KT310291 |
| 23 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Casimiro de Abreu | KT310292 |
| 24 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Casimiro de Abreu | KT310293 |
| 25 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Casimiro de Abreu | KT310294 |
| 26 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Silva Jardim | KT310295 |
| 27 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Silva Jardim | KT310296 |
| 28 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Silva Jardim | KT310297 |
| 29 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310298 |
| 30 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310299 |
| 31 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310300 |
| 32 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310301 |
| 33 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310302 |
| 34 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310303 |
| 35 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310304 |
| 36 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310305 |
| 37 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310306 |
| 38 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310307 |
| 39 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Itaperuna | KT310308 |
| 40 | Cultivo | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Itaperuna | KT310309 |

Tabela 2. Identificação de amostras de fezes positivas para *Balantidium coli* estudadas por ferramentas moleculares.

| Nº | Amostra | Local | Nº Sequências |
|-------|---------|---|---------------|
| 41 | Fezes | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Petrópolis | KT310310 |
| 42 | Fezes | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Itaperuna | KT310311 |
| 43 | Fezes | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Maricá | KT310312 |
| 44 | Fezes | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Saquarema | KT310313 |
| 45 | Fezes | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Rio Bonito | KT310314 |
| 46 | Fezes | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Casimiro de Abreu | KT310315 |
| 47 I | Fezes | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Itaboraí | KT310316 |
| 47 II | Fezes | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Itaboraí | KT310317 |
| 49 | Fezes | <i>Sus scrofa domesticus</i> /Silva Jardim | KT310318 |
| 50 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 3A | KT310319 |
| 51 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 3B | KT310320 |
| 52 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 4A | KT310321 |
| 53 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 4B | KT310322 |
| 54 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 6A | KT310323 |
| 55 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 6B | KT310324 |
| 56 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 7A | KT310325 |
| 57 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 7B | KT310326 |
| 58 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 9A | KT310327 |
| 59 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 9B | KT310328 |
| 60 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 10A | KT310329 |
| 61 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 10 B | KT310330 |
| 62 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 11 A | KT310331 |
| 63 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 11 B | KT310332 |
| 64 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 12 A | KT310333 |
| 65 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/ Recinto 12 B | KT310334 |
| 66 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 1 A | KT310335 |
| 67 | Fezes | <i>Macaca mulatta</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 1 B | KT310336 |
| 68 | Fezes | <i>Macaca fascicularis</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 1 | KT310337 |
| 69 | Fezes | <i>Macaca fascicularis</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 2 | KT310338 |
| 70 | Fezes | <i>Macaca fascicularis</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 3 | KT310339 |
| 71 | Fezes | <i>Macaca fascicularis</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 4 | KT310340 |
| 72 | Fezes | <i>Macaca fascicularis</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 5 | KT310341 |
| 73 | Fezes | <i>Macaca fascicularis</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 6 | KT310342 |
| 74 | Fezes | <i>Macaca fascicularis</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 7 | KT310343 |
| 75 | Fezes | <i>Macaca fascicularis</i> /Cecal/Fiocruz/Recinto 8 | KT310344 |

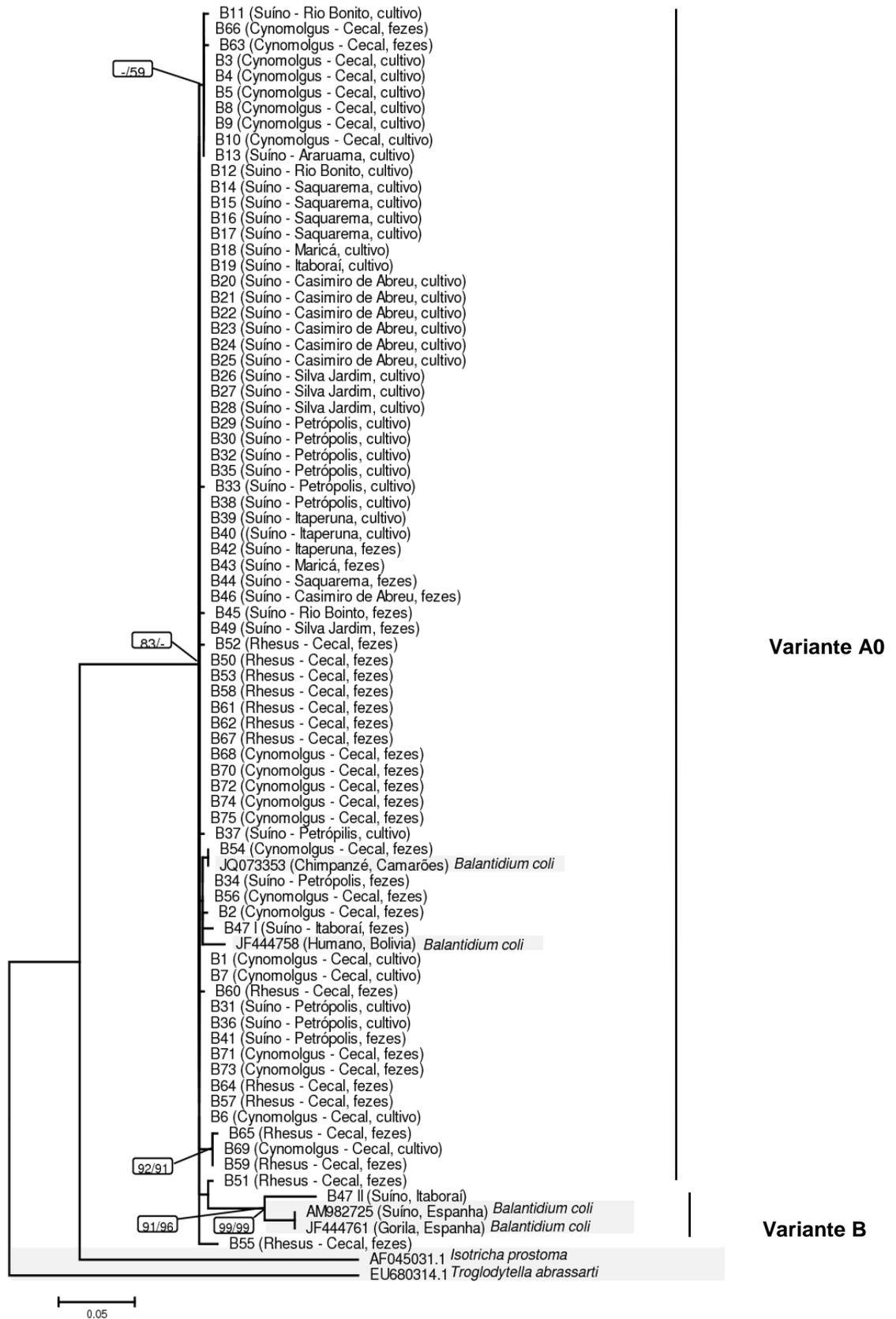


Figura 1. Relações genéticas entre isolados de *Balantidium coli* inferidas pelo algoritmo Maximum Likelihood (ML) utilizando o modelo Tamura 3-parametro com base nas seqüências do gene RNAr, fragmento ITS1 - 5.8s RNAr - ITS2. A árvore foi enraizada pelos ciliados *Isotricha prostoma* [Genbak: AF045031.1] e *Troglodytella abressarti* [EU 680314.1]. Os números associados aos ramos referem-se aos valores de *bootstraps* para 1000 replicações. *Bootstraps* acima de 50% estão mostrados. O primeiro valor foi realizado pelo algoritmo ML e o segundo pelo Neighbor- Joining (NJ).

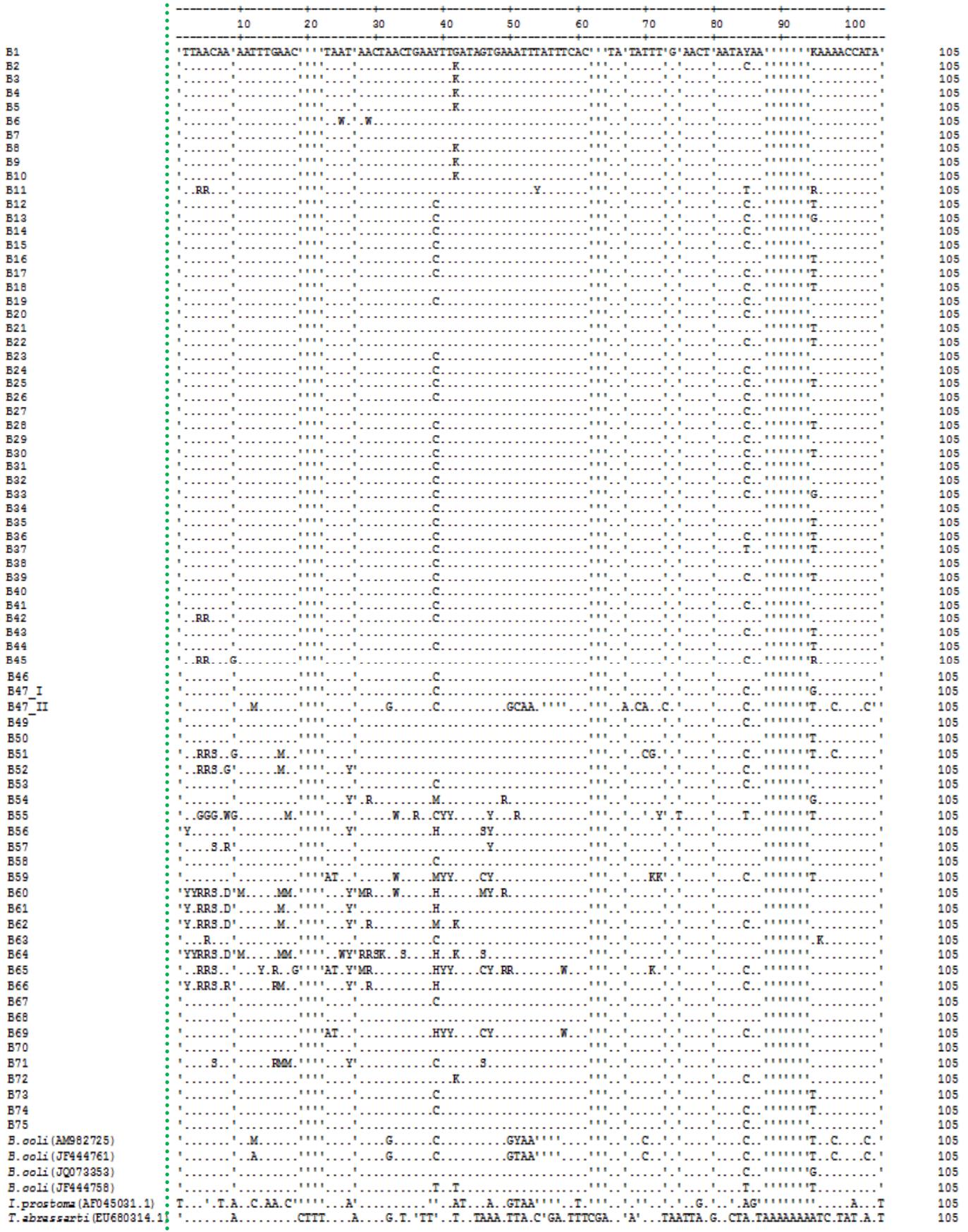


Figura 2. Alinhamento das seqüências do gene RNAr, fragmento ITS1 - 5.8s RNAr - ITS2 de *Balantidium coli* obtidas de cultivo xênicos e amostras de fezes de suínos e primatas não humanos comparados com seqüências depositadas no GenBank.

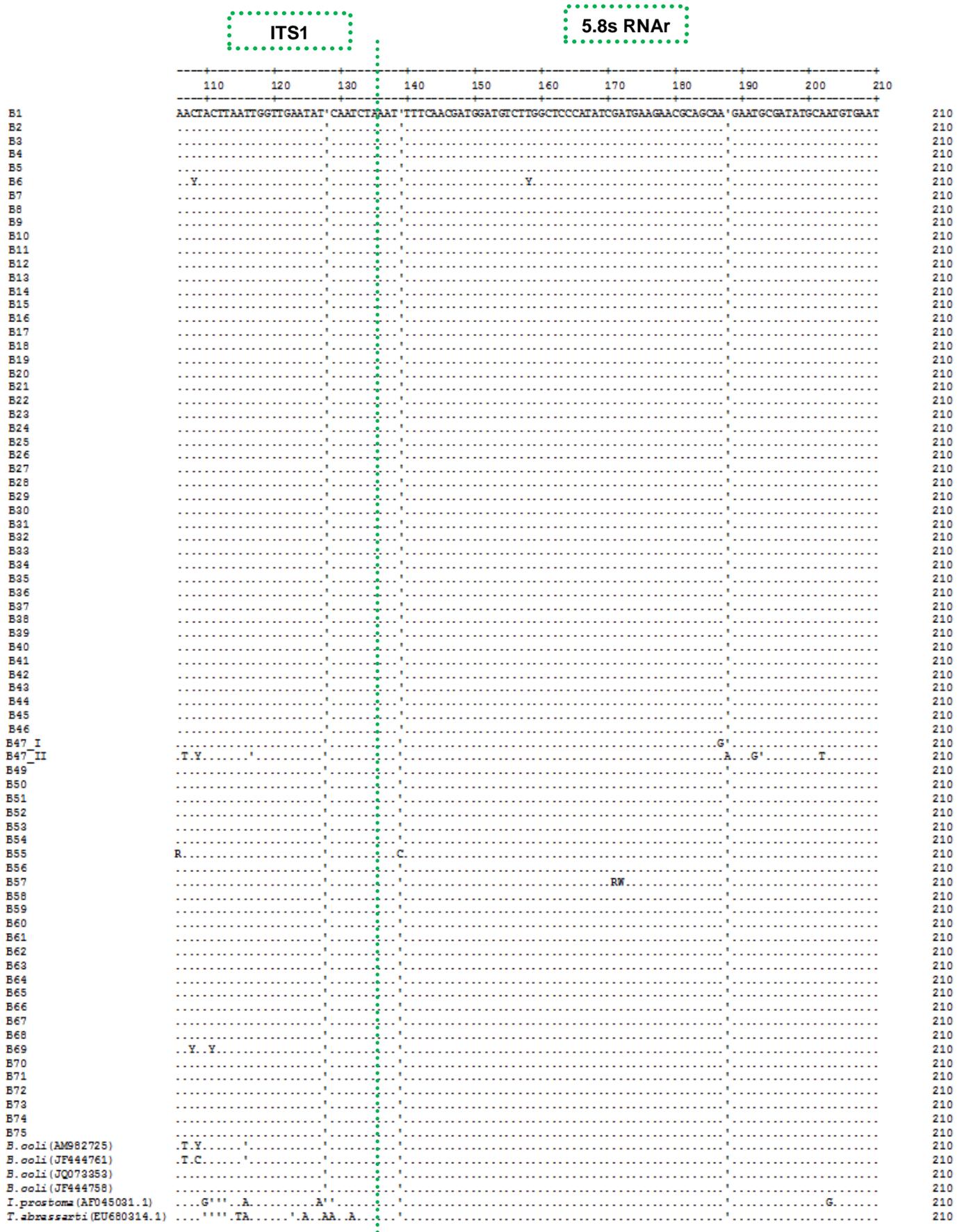


Figura 2. Continuação

ITS2

| | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|---|-----|---------|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|-----|----|---|-----|
| B1 | GRAAGAGATCATCTCTATTAAAT | AAATGCTCATTGTAGCAATCACAAATATTTTGTGAATTACA | TT | GAGACAA | TTTT | AATTT | | | | 404 | | | | | | | |
| B2 | .T. | | | | | | | | C | 404 | | | | | | | |
| B3 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B4 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B5 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B6 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B7 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B8 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B9 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B10 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B11 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B12 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B13 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B14 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B15 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B16 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B17 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B18 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B19 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B20 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B21 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B22 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B23 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B24 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B25 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B26 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B27 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B28 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B29 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B30 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B31 | .T. | | | | | | | | W | 404 | | | | | | | |
| B32 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B33 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B34 | .T. | S | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B35 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B36 | .T. | | | | | | | | W | 404 | | | | | | | |
| B37 | .T. | M | | | | | | Y | W | 404 | | | | | | | |
| B38 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B39 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B40 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B41 | .T. | | | | | | | | W | 404 | | | | | | | |
| B42 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B43 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B44 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B45 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B46 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B47_I | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B47_II | .T. | G | C | | | C | G | | G | C | 404 | | | | | | |
| B49 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B50 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B51 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B52 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B53 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B54 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B55 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B56 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B57 | .T. | | | | | Y | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B58 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B59 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B60 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B61 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B62 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B63 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B64 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B65 | .T. | | | | | | | S | | 404 | | | | | | | |
| B66 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B67 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B68 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B69 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B70 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B71 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B72 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B73 | .T. | | | | | | | Y | | 404 | | | | | | | |
| B74 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| B75 | .T. | | | | | | | | | 404 | | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (AM982725) | .T. | C | G | G | | C | | T | C | C | 404 | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JF444761) | .T. | C | G | G | | C | | T | C | C | 404 | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JQ073353) | .T. | | | | | | | | | | 404 | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JF444758) | .T. | | | | | | | T | T | | 404 | | | | | | |
| <i>I. prostomae</i> (AF045031.1) | .T | T | AGT | A | G | T | T | GAA | C | T | AG | G | T | 404 | | | |
| <i>T. brassarici</i> (EU680314.1) | .T | T | TTA | A | | | G | T | TA | A | C | A | A | T | AA | T | 404 |

Figura 2. Continuação

Tabela 3. Matriz de distância obtida a partir do alinhamento de sequências do fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 de *Balantidium coli* de isolados em cultivo e fezes de *Cynomolgus*.

| | B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | B6 | B7 | B8 | B9 | B10 | B68 | B69 | B70 | B71 | B72 | B73 | B74 | B75 | I | II | III | IV | V | VI | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|--|
| B1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B2 | 0,003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B3 | 0,000 | 0,003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B4 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B5 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B6 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B7 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B8 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B9 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B10 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B68 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| B69 | 0,009 | 0,011 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | | | | | | | | | | | | | | |
| B70 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | | | | | | | | | | | | | |
| B71 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | | | | | | | | | | | | |
| B72 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | |
| B73 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | |
| B74 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | |
| B75 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (AM982725) I | 0,049 | 0,052 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,050 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,060 | 0,049 | 0,050 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JF444761) II | 0,058 | 0,062 | 0,058 | 0,059 | 0,059 | 0,059 | 0,059 | 0,059 | 0,059 | 0,059 | 0,058 | 0,069 | 0,058 | 0,059 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,000 | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JQ073353) III | 0,003 | 0,006 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,006 | 0,003 | 0,055 | 0,065 | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JF444758) IV | 0,006 | 0,008 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,014 | 0,003 | 0,006 | 0,003 | 0,006 | 0,011 | 0,008 | 0,062 | 0,071 | 0,008 | | | | |
| <i>I. prostoma</i> (AF045031.1) V | 0,184 | 0,188 | 0,180 | 0,180 | 0,180 | 0,187 | 0,184 | 0,180 | 0,180 | 0,180 | 0,184 | 0,201 | 0,184 | 0,174 | 0,184 | 0,184 | 0,188 | 0,188 | 0,196 | 0,203 | 0,188 | 0,188 | | | |
| <i>T. abressarti</i> (EU680314.1) VI | 0,245 | 0,249 | 0,240 | 0,236 | 0,236 | 0,245 | 0,241 | 0,236 | 0,236 | 0,236 | 0,240 | 0,255 | 0,240 | 0,241 | 0,240 | 0,245 | 0,253 | 0,248 | 0,267 | 0,275 | 0,247 | 0,247 | 0,272 | | |

Tabela 4. Matriz de distância obtida a partir do alinhamento de sequências do fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 de *Balantidium coli* de isolados em cultivo e fezes de suínos.

| | B11 | B13 | B14 | B18 | B19 | B20 | B26 | B29 | B39 | B40 | B41 | B42 | B43 | B44 | B45 | B46 | B47_I | B47_II | B49 | I | II | III | IV | V | VI |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| B11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B13 | 0,003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B14 | 0,003 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B18 | 0,003 | 0,003 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B19 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B20 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B26 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B29 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B39 | 0,003 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B40 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B41 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| B42 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | |
| B43 | 0,003 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | |
| B44 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | |
| B45 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | |
| B46 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | |
| B47_I | 0,008 | 0,006 | 0,006 | 0,008 | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,008 | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,008 | 0,008 | 0,006 | 0,006 | | | | | | | | | |
| B47_II | 0,066 | 0,065 | 0,062 | 0,062 | 0,062 | 0,062 | 0,062 | 0,062 | 0,061 | 0,062 | 0,062 | 0,062 | 0,062 | 0,062 | 0,062 | 0,062 | 0,072 | | | | | | | | |
| B49 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,062 | | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (AM982725) I | 0,053 | 0,052 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,049 | 0,058 | 0,046 | 0,049 | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JF444761) II | 0,062 | 0,061 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,058 | 0,068 | 0,049 | 0,058 | 0,000 | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JQ073353) III | 0,006 | 0,003 | 0,003 | 0,006 | 0,003 | 0,003 | 0,000 | 0,003 | 0,006 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,006 | 0,006 | 0,003 | 0,000 | 0,008 | 0,068 | 0,000 | 0,055 | 0,065 | | | | |
| <i>B. coli</i> (JF444758) IV | 0,006 | 0,014 | 0,011 | 0,008 | 0,011 | 0,008 | 0,008 | 0,011 | 0,011 | 0,008 | 0,011 | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,006 | 0,020 | 0,075 | 0,006 | 0,062 | 0,071 | 0,008 | | | |
| <i>I. prostoma</i> (AF045031.1) V | 0,188 | 0,188 | 0,188 | 0,188 | 0,188 | 0,188 | 0,188 | 0,188 | 0,188 | 0,184 | 0,188 | 0,184 | 0,188 | 0,184 | 0,192 | 0,184 | 0,197 | 0,223 | 0,188 | 0,196 | 0,203 | 0,188 | 0,188 | | |
| <i>T. brassarti</i> (EU680314.1) VI | 0,246 | 0,252 | 0,248 | 0,253 | 0,248 | 0,248 | 0,244 | 0,248 | 0,253 | 0,244 | 0,249 | 0,246 | 0,253 | 0,248 | 0,254 | 0,240 | 0,257 | 0,324 | 0,244 | 0,267 | 0,275 | 0,247 | 0,247 | 0,272 | |

Tabela 5. Matriz de distância obtida a partir do alinhamento de sequências do fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 de *Balantidium coli* de fezes de Rhesus.

| | B50 | B51 | B52 | B53 | B54 | B55 | B56 | B57 | B58 | B59 | B60 | B61 | B62 | B63 | B64 | B65 | B66 | B67 | B68 | B69 | I | II | III | IV | V | VI |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| B50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B51 | 0,008 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B52 | 0,003 | 0,011 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B53 | 0,000 | 0,008 | 0,003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B54 | 0,003 | 0,011 | 0,003 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B55 | 0,009 | 0,009 | 0,003 | 0,012 | 0,012 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B56 | 0,000 | 0,009 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B57 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B58 | 0,000 | 0,008 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B59 | 0,009 | 0,014 | 0,012 | 0,009 | 0,012 | 0,020 | 0,003 | 0,009 | 0,009 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B60 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B61 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| B62 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | |
| B63 | 0,000 | 0,009 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | |
| B64 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | | | |
| B65 | 0,012 | 0,018 | 0,015 | 0,012 | 0,012 | 0,015 | 0,006 | 0,012 | 0,012 | 0,003 | 0,009 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,009 | | | | | | | | | | | |
| B66 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,012 | | | | | | | | | | |
| B67 | 0,000 | 0,008 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,012 | 0,000 | | | | | | | | | |
| B68 | 0,000 | 0,008 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,012 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | |
| B69 | 0,009 | 0,017 | 0,012 | 0,009 | 0,009 | 0,021 | 0,003 | 0,009 | 0,009 | 0,000 | 0,006 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,006 | 0,003 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (AM982725) I | 0,049 | 0,046 | 0,053 | 0,049 | 0,053 | 0,061 | 0,050 | 0,050 | 0,049 | 0,060 | 0,052 | 0,050 | 0,050 | 0,049 | 0,052 | 0,061 | 0,050 | 0,049 | 0,049 | 0,060 | | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JF444761) II | 0,058 | 0,055 | 0,062 | 0,058 | 0,062 | 0,067 | 0,059 | 0,060 | 0,058 | 0,069 | 0,062 | 0,060 | 0,060 | 0,058 | 0,062 | 0,071 | 0,060 | 0,058 | 0,058 | 0,069 | 0,000 | | | | | |
| <i>B. coli</i> (JQ073353) III | 0,006 | 0,011 | 0,006 | 0,003 | 0,000 | 0,015 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,011 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,012 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,055 | 0,065 | | | | |
| <i>B. coli</i> (JF444758) IV | 0,006 | 0,014 | 0,011 | 0,011 | 0,006 | 0,014 | 0,003 | 0,003 | 0,006 | 0,014 | 0,003 | 0,006 | 0,003 | 0,008 | 0,000 | 0,018 | 0,009 | 0,006 | 0,003 | 0,014 | 0,062 | 0,071 | 0,008 | | | |
| <i>I. prostoma</i> (AF045031.1) V | 0,184 | 0,203 | 0,190 | 0,188 | 0,181 | 0,194 | 0,178 | 0,184 | 0,184 | 0,201 | 0,180 | 0,183 | 0,184 | 0,184 | 0,181 | 0,193 | 0,184 | 0,184 | 0,184 | 0,201 | 0,196 | 0,203 | 0,188 | 0,188 | | |
| <i>T. brassarti</i> (EU680314.1) VI | 0,248 | 0,272 | 0,258 | 0,248 | 0,247 | 0,272 | 0,235 | 0,243 | 0,240 | 0,260 | 0,245 | 0,251 | 0,248 | 0,241 | 0,242 | 0,265 | 0,257 | 0,240 | 0,240 | 0,255 | 0,267 | 0,275 | 0,247 | 0,247 | 0,272 | |

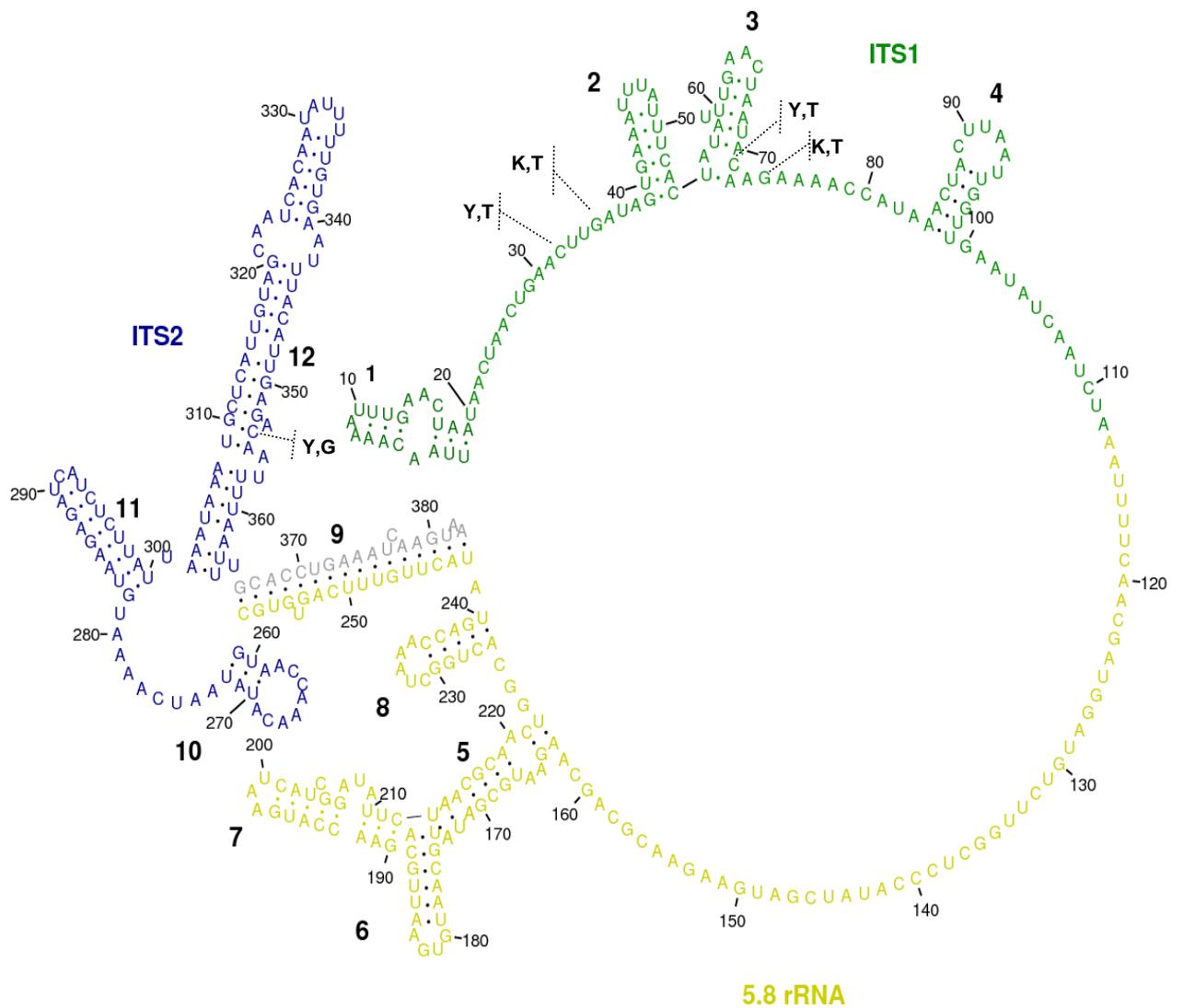


Figura 3. Estrutura secundária e suas ambiguidades da região ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 da sequência consenso de *Balantidium coli* deste estudo transcrita com RNAalifold Webserver e formatadas no RNAviz 2.0.

2. Discussão

Balantidium sp. é um parasito de ampla distribuição geográfica, já tendo sido descritas mais de 50 espécies com base em sua morfologia e hospedeiros (Areán e Koopisch, 1964; Zaman, 1964; Solaymani-Mohammadi e Petri Jr., 2006). O gênero já foi detectado em amostras de diversos animais incluindo o homem (Areán e Koopisch 1964, Zaman 1964). No passado várias outras espécies de *Balantidium* sp., como *B. cavie* descritas em cobaias (Neiva, 1914), *B. suis* em suínos (McDonald, 1922), *B. wenrichi*, *B. philippinensis*, *B. cunhamunizi* em primatas e *B. struthionis* em aves (Hegner, 1934) foram descritas principalmente por meio da morfologia dos trofozoítos e pela suas espécies de hospedeiros. Atualmente, sabe-se que a morfologia do trofozoíto é uma característica insuficiente para classificar taxonomicamente espécies de ciliados (Pomajbiková et al., 2013). Em cultivo *in vitro* já foi observado que o tamanho e o formato do trofozoíto tende a ser mutável, pois quando privados do amido de arroz, os trofozoítos mostraram-se mais alongados, porém, se esse nutriente for fornecido em abundância, eles distendem-se e assumem uma forma mais ovóide (Zaman, 1978).

Em mamíferos, geralmente quando as amostras fecais são positivas para *Balantidium* sp. por meio de exames com microscopia óptica, geralmente, se considera o diagnóstico como *B. coli*. Para confirmação da espécie do parasito, devem ser usadas ferramentas de biologia molecular. Na literatura ainda são poucos os estudos moleculares sobre este protozoário. Nesses estudos, o principal alvo de sequenciamento tem sido o RNA ribossomal ou seus fragmentos, onde se destacam as pesquisas de Ponce Gordo et al. (2008), Nilles-Bije e Rivera (2010), Ponce Gordo et al. (2011), Pomajbikova et al. (2013) e Hassel et al. (2013).

No presente estudo os isolados de *Balantidium* sp. em cultivo e as fezes contendo formas evolutivas do parasito foram obtidas a partir de amostras de suínos e primatas não humanos, como *Cynomolgus* e *Rhesus*. Nestas amostras foram confirmados para a espécie *B. coli*, após o sequenciamento da região ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2. Todas as sequências foram agrupadas dentro de um único ramo filogenético. A identidade molecular deste parasito foi confirmada, a partir de sequências de referência que estão depositados no Genbank e que também foram agrupadas dentro desse mesmo *cluster* gênico. As sequências de referência foram obtidos de fezes de suíno [AM982725] (Ponce Gordo et al., 2008), gorila [JF444761], humano [JF444758] (Ponce Gordo et al., 2011) e chimpanzé [JQ073353]

(Pomajbikova et al., 2013). Cabe ressaltar que Ponce Gordo et al. (2008) conseguiram demonstrar que as sequências de *Balantidium* sp. obtidas de fezes de avestruz e suínos, também se tratavam de uma única espécie com elevada homologia para *B. coli*. Fato que enfraqueceu a possível existência das espécies *B. suis* e *B. struthionis*, anteriormente descritas com base na morfologia e hospedeiro.

Para determinação da filogenia dos isolados foi utilizada a região ITS1 - 5.8s RNAr - ITS2, pois segundo Hillis e Dixon (1991) ITS1 e ITS2 são os fragmentos mais indicados dentro do *cluster* de RNA ribossomal para discriminar espécies relacionadas, ou até mesmo, variedades de uma mesma espécie, devido a presença de regiões variáveis que evoluem rapidamente. Além de serem relativamente curtas e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permitindo que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Em pesquisas moleculares sobre outros protozoários, este fragmento também tem sido utilizado como alvo molecular para análises filogenéticas, como em *Tritrichomas foetus*, *Trichomonas gallinae*, *Cystoisospora* sp. e *Eimeria* sp. (Lew et al., 2003; Fernandes et al., 2008; Samarasinghe et al., 2008; Ecco et al., 2012).

Com o fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 foi possível determinar o tipo de variante presente nas sequências estudadas. A maioria delas foi denominada como tipo A0. Porém, não foi possível classificar como subvariantes A0a ou A0b devido aos polimorfismos observados em alguns sítios. Em outros estudos sequências de *B. coli* obtidas de amostras fecais de gorilas também não puderam ser classificadas como subvariantes (Wright, 1999; Modrý et al.; 2009).

A variante A0 foi predominante, ocorrendo no grande *cluster* de *B. coli* descrito. Essas tenderam a se agrupar com as mais próximas homofileticamente. Porém, em uma amostra de fezes de suíno de Itaboraí foi evidenciado sequências mistas. Devido à impossibilidade da clonagem, que seria a metodologia indicada para estudar sequências mistas, estas foram separadas com auxílio do programa Midex Sequences Reader (<http://msr.cs.nthu.edu.tw/>). Após a separação as sequências foram classificadas em variantes A0/B.

A variante B estudada aproximou-se mais da subvariante do tipo B0b. Cabe ressaltar que, devido ao polimorfismo evidenciado na sequência do tipo B, não foi possível classificá-la em subvariante do tipo B0 ou B1. Os polimorfismos foram evidenciados nas posições do fragmento ITS1 (posições 10, 61, 73, 79, 84, 89) e em ITS2 (posições 272, 274, 276, 303, 308, 334, 349, 350, 356 e 363). A variante tipo B

apresentou similaridade em 91 a 96%, com sequências de referências contidas do Genbank, que também são tipo B, sendo uma extraída de amostras de fezes de suíno, AM982725 (Ponce Gordo et al., 2008) e outra de gorila, JF444761 (Ponce Gordo et al., 2011). Hassell et al. (2013) relataram pela primeira vez sequências mistas A0/B1 (HF545448/HF545449) de *B. coli* em amostra fecal de gorila da montanha (*Gorilla beringei beringei*) habitante do Parque Nacional Volcanoes em Rwanda.

Nos ciliados, geralmente, os genes estão presente em cópias únicas no genoma micronuclear (Prescott, 1994). Isto foi observado no gene RNA ribossomal do ciliado *Tetrahymena* (Yao et al., 1985). Por outro lado, Preer et al. (1999) relataram no mínimo quatro diferentes genes micronucleares em *Paramecium*. Já foi descrito que as unidades transcriptoras do gene são cortadas do cromossoma micronuclear, replicadas e rearranjadas em dímeros ou repetições sendo, então, amplificadas em grande número de cópias e, assim, estocadas no macronúcleo (Prescott, 1994; Preer et al., 1999). Para *B. coli*, ainda não foi possível determinar o número de genes do RNA ribossomal presente em seu micronúcleo. Contudo, a identificação de no mínimo dois genes distintos foi observada por Ponce Gordo et al. (2011). Esta observação foi possível, pois os autores estudaram cistos individualizados, onde foi determinada a presença de sequências mistas dentro da mesma célula.

As sequências obtidas dos isolados de suíno, Cynomolgus e Rhesus apresentaram alguns nucleotídeos diferenciados, principalmente na região ITS1. Ponce Gordo et al. (2011) demonstraram que para *B. coli*, esta região tem se mostrado como a mais hipervariável do fragmento ITS1 – 5.8s RNAr – ITS2 e por isso tem sido utilizada para a classificação das variantes. Esta variabilidade não tem sido observada em outros ciliados. Analisando oito isolados de *Isotricha prostoma*, identificados em conteúdo fecal de ruminantes, bovinos e ovinos, foi evidenciado 100% de homogeneidade entre as sequências obtidas da região ITS1- 5.8s RNAr – ITS2 (Wright, 1999). Essa similaridade também foi observada entre isolados de *Troglodytella abrassarti* em amostras fecais de chimpanzés (*Pan troglodytes*) e gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*) (Modrý et al., 2009).

Neste estudo os fragmentos de nucleotídeos obtidos diretamente da amostra fecal apresentaram muitas ambiguidades devido à formação de cromatogramas com maior número de ruídos. Este fato foi pouco observado nas amostras de cultivo

xênico, pois, geralmente em cultivo as células parasitárias tendem a estar mais concentradas, aumentando a quantidade de DNA. Em cultivo também há diminuição da quantidade de inibidores de reação que, geralmente, estão presentes em abundância na amostra fecal, e que dificultam, muitas vezes, a interpretação das sequências geradas. Poucos estudos moleculares de parasitos intestinais tem sido realizados a partir de cepas em cultivo. Em *B. coli* pôde ser recuperado somente o artigo de Nilles Bije e Rivera (2010) que realizaram estudos moleculares do parasito isolado do intestino de suíno. *B. coli* foi mantido por 14 dias em meio de cultivo xênico composto por solução de Ringer, soro de cavalo e amido de arroz. Comparações com este estudo ficaram comprometidas, pois os autores amplificaram a região conservada 18s RNAr.

Pode ser observado que nas amostras em cultivo o parasito apresentou a mesma classificação, tipo A0. Esta homogeneidade de variante pode ter ocorrido devido a fatores como: um processo de seleção natural que ocorreu no estabelecimento do isolamento e também na manutenção da cepa *in vitro*; escolha de amostras de fezes destinada para isolamento com riqueza parasitária; a possibilidade da variante tipo A0 apresentar a maior capacidade de sucesso de desenvolvimento *in vitro*; ou por esta variante ser a mais frequente em *B. coli* isolado nos animais cativos no Brasil, resultado também observado na maioria das amostras de fezes estudadas.

Apesar da quase totalidade de variante tipo A0, não se pode assumir que as células possuem somente este tipo gênico. As cópias dos macronúcleos dos diferentes genes são redistribuídos randomicamente em dois macronúcleos filhos, e então, no momento da divisão celular do parasito em duas células filhas, pode ocorrer à distribuição desigual do DNA, resultando em amplificação tendenciosa na reação de polimerase em cadeia (Prescott, 1994).

As únicas sequências de *B. coli* originárias de uma amostra fecal humana depositada no Genbank, também foram classificadas como variante do tipo A, sendo uma das sequências com o subtipo A0, a mesma evidenciada neste estudo. Apesar de ser observada similaridade da variante humana com as variantes das amostras do Brasil, entre 96% a 99%, uma amostra humana, ainda é muito pouco para identificar um perfil de transmissibilidade entre humanos e outros animais. Pomajbiková et al. (2013) ressaltaram que ainda não está claro o padrão da diversidade genética de *B. coli* em amostras humanas.

Para traçar um perfil de transmissão zoonótico mais rebuscado seria importante, além de aumentar o painel de amostras de diferentes hospedeiros incluindo humanos, também o desenho de mais sequências nucleotídicas alvos, como tem sido observado com o protozoário *Giardia duodenalis*. Para este flagelado, atualmente são utilizados de forma concomitante, três alvos gênicos, para melhor classificação dos genótipos, com o gene beta giardina, tpi (triose fosfato isomerase) e gdh (glutamato desidrogenase) (Durigan et al., 2014).

Isolamento, manutenção e axenização de *B. coli in vitro* devem ser incentivados, pois cultivos de células parasitárias puras permitem o mapeamento parcial ou completo do genoma, favorecendo o conhecimento de novas sequências alvo. Perfis genômicos já estão sendo realizados em alguns protozoários intestinais, como é o caso do projeto de sequenciamento total do genoma de *Giardia duodenalis* em 2009 (Franzén et al., 2009) e *Cryptosporidium parvum* em 2004 (Abrahamsen et al., 2004).

Apesar de ter sido escrito como espécie *B. coli*, recentemente Pomajbíková et al. (2013) propôs a troca taxonômica do nome do parasito para *Neobalantidium coli*. Ao analisar amostras fecais de mamíferos, dentre eles primatas não humanos, suínos, bovinos, e também uma amostra de lavado intestinal de anfíbio, rã, os autores observaram que as sequências de *B. coli* dos mamíferos agruparam-se de maneira pofilética, ou seja, um ramo totalmente distinto de *Balantidium entozoon*, espécie que parasita anfíbios. *B. entozoon* foi nomeado primeiro com o nome *Balantidium* por Claparède e Lachmann em 1858 e a espécie que tem sido chamada por *B. coli*, foi pela primeira vez descrita como *Paramecium coli* por Malmsten (1857), sendo chamada de *Balantidium coli* somente em 1863 por Stein.

De forma geral, as sequências estudadas tenderam a ser mais homogêneas entre si e mais distantes geneticamente com as sequências retiradas do Genbank. Isto pressupõe o favorecimento em território nacional desta variante, que pode estar mais adaptada ao clima tropical úmido do país, bem como aos hospedeiros que residem nessa região. Porém, essa informação ainda precisa ser melhor analisada, pois este é o primeiro estudo que caracteriza geneticamente isolados em cultivo e fezes de *B. coli* no Brasil. É importante ressaltar também que os símios estudados são animais do Velho Mundo e que não pertencem a fauna nacional, mas que são mantidos, aqui por muito tempo, para estudos científicos. Mais pesquisas necessitam ser feitas com espécies animais neotropicais, que ainda são pouco

estudadas e incriminadas como reservatório dessa parasitose. Cabe lembrar que o Brasil tem sido apontado como um dos locais com maior registro de balantidiose (Solyamani-Mohammadi e Petri Jr, 2006).

De acordo com Ponce Gordo et al. (2011) as diferenças observadas entre as variantes não devem ser utilizadas como ferramenta taxonômica. Contudo, como *B. coli* é considerado um parasito extremamente negligenciado, sendo ainda pouco estudado, o fragmento ITS1 – RNAr – ITS2, não deve ser encarado de forma negativa, mas sim como o início do estudo deste ciliado a nível molecular, que ainda apresenta muitas lacunas de informações, principalmente a respeito de sua transmissibilidade entre hospedeiros. Este estudo representa a primeira caracterização molecular de *B. coli* no Brasil, confirmando taxonomicamente a espécie e as sequências variantes do tipo A0 em cultivo e amostras de suínos e primatas não humanos. No entanto, estudos moleculares com outras espécies em destaque para símios neotropicais e humanos necessitam ser realizados para avaliar o perfil destas variantes e sua importância na epidemiologia molecular.

Referências

Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V. Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. Science. 2004; 304:441-445.

Areán VM, Koppisch E. Balantidiasis. A review and report of cases. Am J Pathol. 1956; 22 (6):1089 – 1115.

Durigan M, Abreu AG, Zucchi MI, Franco RMB, de Souza AP. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: multilocus genotyping reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of Brazil. Plos one. 2014; 23: 1-27.

Ecco R, Preis IS, Vilela DAR, Luppib MM, Malta MCC, Becksteadc RB, Raphaela Stimmelmayerd R, Gerholde RW. Molecular confirmation of *Trichomonas gallinae* and other parabasalids from Brazil using the 5.8S and ITS-1 rRNA regions. Vet Parasitol. 2012; 190:36-42.

Fernandes PR; da Silva AC; Gambarini ML; Linhares GFC. Construção de iniciadores e otimização de ensaios de PCR e de Nested-PCR para a detecção específica de *Tritrichomonas foetus*. Rev. Bras Parasitol Vet. 2008; 17(3):133-138.

Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Ellen Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D, Andersson JO, Andersson B, Svärd SG. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? Plos pathogens. 2009; 5(8): 1 – 14.

Hassell JM, Blake DP, Cranfield MR, Ramer J, Hogan JN, Noheli JB, Waters M, Hermosilla C. Occurrence and molecular analysis of *Balantidium coli* in mountain gorilla (*Gorilla beringei beringei*) in the volcanoes national Park, Rwanda. J Wildl Dis. 2013; 49 (4): 1063-1065.

Hegner R. Specificity in the genus *Balantidium* based on size and shape of body and micronucleus, with descriptions of six new species. Am J Hyg. 1934;19:38–67.

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol.1991; 66(4):411-453.

Lew AE, Anderson GR, Minchin CM, Jeston PJ, Jorgensen WK. Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. Vet Parasitol. 2003; 112:33–50.

Malmsten PH. Infusorien als Intestinal-Thiere beim Menschen. Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med. 1857; 12:302–309.

McDonald JD. On *Balantidium coli* and *B. suis* (sp. nov.). Univ Calif Publ Zool 1922; 20:243–246.

Modrý D, Petzelková KJ, Pomajbíková K, Tokiwa T, Krizek J, Imai S, Vallo P, Profousová I, Slapeta J. The occurrence and ape-to-ape transmission of the entodiniomorphid ciliate *Troglodytella abressarti* in captive gorillas. J Eukaryot Microbiol. 2009; 56:83–87.

Neiva A, Marques da Cunha A, Travassos L. Contribuições Parasitológicas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1914; 6:180–191.

Nilles-Bije ML, Rivera WL. Ultrastructural and molecular characterization of *Balantidium coli* isolated in the Philippines. Parasitol Res. 2010; 106:387 -394.

Preer LB, Rudman B, Pollack S, Preer Jr JR. Does ribosomal DNA get out of the micronuclear chromosome in *Paramecium tetraurelia* by means of a rolling circle? Mol Cell Biol. 1999;19:7792–7800.

- Pomajbíková K, Oboromik M, Horák, A, Petrzalková KJ, Grim JN, Levecke B, Todd A, Mulama M, Kiyang J, Modrý D. Novel Insights into the genetic diversity of *Balantidium* and *Balantidium*-like cyst – forming ciliates. *Plos Negl Trop Dis*. 2013; 7(3):1-10.
- Ponce-Gordo F, Jiménez-Ruiz E, Martínez-Díaz RA. Tentative identification of *Balantidium* from ostriches (*Struthio camelus*) as *Balantidium coli*-like by analysis of polymorphic DNA. *Vet Parasitol*. 2008; 157:41–49.
- Ponce Gordo F, Salamaca FF, Martínez D R. Genetic heterogeneity in Internal transcribed spacer genes of *Balantidium coli* (Litostomatea, Ciliophora). *Protist*. 2011;162:774-794.
- Prescott DM. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev*. 1994; 58:233–267.
- Samarasinghe B, Johnson J, Ryan U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. *Exp Parasitol*. 2008; 118:592–595.
- Solaymani-Mohammadi S, Petri WA Jr. Zoonotic implications of the swine Transmitted-protozoal infections. *Vet Parasitol*. 2006; 140:189-203.
- Stein F. Ueber *Paramecium* (?) *coli* Malmsten. *Amtl Berl Dtsch Chem Ges*. 1863, 37:165.
- Wright A-DG. Analysis of intraspecific sequence variation among eight isolates of the rumen symbiont, *Isotricha prostoma* (Ciliophora), from two continents. *J Eukaryot Microbiol*. 1999; 46:445–446.
- Yao MC, Zhu SG, Yao CH. Gene amplification in *Tetrahymena*: formation of the extrachromosomal palindromic rDNA. *Mol Cell Biol*. 1985; 5:1260–1267.
- Zaman V. Studies on the immobilization reaction in the genus *Balantidium*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1964; 58, 255-259.
- Zaman V. *Balantidium coli*. In: Kreier JP (Ed). *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, p. 633-653; 1978.

5.8 CAPÍTULO 8

Este capítulo pleitea o objetivo: Analisar a ultraestrutura dos isolados Balantidium sp.

Situação: Artigo em construção.

Contexto: Dois isolados de Balantidium sp. em cultivo foram avaliados por meio de análises microscópicas e ultraestruturais.

Aspectos ultraestruturais de *Balantidium coli* (Malmsten, 1857) isolado de suíno e primata não humano

Resumo

Balantidium coli é um protozoário ciliado que habita o intestino grosso de suínos, primatas não humanos e humanos. Com base na morfologia pela microscopia óptica foram descritas mais de 50 espécies no gênero, porém a validade taxonômica destas descrições ainda geram muitas dúvidas. Análises ultraestruturais são ferramentas importantes para o estudo da morfologia dos protozoários, identificando organelas e estruturas em alta resolução. O objetivo deste estudo foi analisar a morfologia de dois cultivos de trofozoitos de *Balantidium* sp., um isolado de suíno e outro do primata não humano *Cynomolgus*. Entre 2013 a 2015, trofozoítos móveis mantidos em meio Pavlova modificado, isolados de fezes, foram lavados por centrifugação e submetidos a análises morfológicas por imunofluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Pela imunofluorescência foi possível evidenciar microtúbulos com distribuição longitudinal ao eixo principal do parasito, também constituindo os cílios. Na MEV a porção anterior do parasito apresentou grande concentração de cílios no aparato oral e na região caudal e um citopígeo com poucos cílios. Em cortes ultrafinos da transmissão pôde-se observar a superfície da célula com os cílios originando-se a partir dos corpos basais. A membrana plasmática, que pertence à película do ciliado, apresentou estruturas associadas compondo o córtex da célula. Localizado, imediatamente abaixo da membrana foram observados vários mucocistos. O citoesqueleto de forma mais detalhada da região oral foi pela primeira vez revelado, sendo demonstrado uma organização composta por fileiras de microtúbulos na superfície e nematodesma. Organelas similares a hidrogenossomos na superfície cortical e também peroxissomos foram viasulaizadas. Com a microscopia de fluorescência para material nuclear não foi possível evidenciar micronúcleo, sugerindo a ocorrência de cepas amiconucleadas. A análise ultraestrutural confirma semelhança com *Balantidium coli*, identificando novas estruturas celulares do parasito. Este foi o primeiro estudo que revelou por meio de ultraestrutura *B. coli* de

animais cativos no Brasil e também o primeiro a estudar uma cepa oriunda de primata não humano.

Palavras chave: Ciliados; Fluorescência; Microscopia eletrônica; Brasil.

1. Resultados

Os achados ultraestruturais mostraram um padrão de organização celular compatível com *Balantidium coli*, tanto no isolado de suíno quanto do símio *Cynomolgus*. A microscopia óptica de contraste de interferência diferencial (DIC) revelou o formato do parasito, arredondado na porção posterior e afunilado na porção anterior. A parte anterior, também conhecida como aparato oral está localizada na posição anteroventral do corpo celular, onde podem ser observados os cílios orais e ainda, os cílios revestindo toda a superfície do ciliado (Figuras 1A, 2A). A microscopia de fluorescência revelou pela incubação com marcador DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, dihydrochloride) que é um intercalante de DNA, sobreposta com a microscopia de DIC, o formato tipo salsicha ou reiniforme do macronúcleo e sua localização anteromedial. Nenhuma estrutura similar a micronúcleo foi evidenciada nos trofozoítos estudados (Figura 1B – 2B). Microtúbulos foram visualizados com o anticorpo anti- β -tubulina-FITC (isotiocianato) com distribuição longitudinal ao eixo principal do corpo do parasito (Figura 1C- 2C) e nos cílios que revestem todo o seu corpo, sendo pouco observado na região posterior do parasito (Figura 2C).

Por meio da microscopia eletrônica de varredura foi possível determinar características da superfície do parasito. O corpo do trofozoíto apresentou-se recoberto por cílios somáticos (Figura 3A e B). O aparato oral encontra-se circundado por cílios orais, recobrindo esta região tanto externa quanto internamente, na qual se localiza a "boca", também conhecida como citóstoma (Figuras 3C, 4A-C). A ciliatura somática que recobre a maior parte da superfície do corpo do parasito tende a se organizar em distribuição elipsoidal ao eixo central do parasito, como pode ser bem visualizado na figura 3C. Na superfície da célula foram observadas também estruturas espessas dispostas diagonalmente, cobrindo todo o corpo do parasito, as cristas intercinetais (Figura 3D e E). Em vista ampliada, foi observado que os cílios inserem-se adjacentes as cristas intercinetais (Figura 3F). No pólo posterior do parasito evidenciou-se uma abertura, com a borda e o interior ausentes de cílios, denominada citopígeo (Figura 4D).

A microscopia de transmissão revelou na região cortical alternância de cristas intercinetais e sulcos revestidos por dupla membrana plasmática (Figura 5A). Nos sulcos foram encontrados os corpos basais denominados também como cinetossomos, estruturas de onde emergem os cílios. Localizado logo abaixo da membrana, observa-se também o espaço alveolar e os mucocistos (Figura 5A e B).

Na estrutura ciliar, o corpo basal mostrou-se adjacente ao axonema, sendo separado deste por um septo e uma estrutura eletrondensa denominada axosoma (Figura 5C). Em seções transversais os cílios apresentaram a representação de nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais, padrão 9 + 2 (Figura 6A - B). Assim como a região cortical, os cílios também são revestidos pela membrana plasmática (Figura 6B). Redes microtubulares de nematodesma, em corte transversal, são observadas com aspecto hexagonal próximos à região oral (Figura 6A e C). Essas redes também podem ser observadas em cortes longitudinais (Figura 7A). Na periferia da região oral observou-se fileiras de microtúbulos também conhecidas como "arquivos" de microtúbulos (Figura 7B e 7C).

Na imagem de *B. coli* de suíno, abaixo das cristas intercinetais, foram visualizadas organelas ligeiramente esféricas, circundadas por membrana e com uma matriz granular, correspondentes a hidrogenossomos (Figura 5D, 8A - B). Retículo endoplasmático rugoso também foram vistos em continuidade aos hidrogenossomos (Figura 8A e B). Estruturas similares a peroxissomas foram observadas na região cortical próximo a essas organelas (Figura 8B, 9C). Vacúolos alimentares contendo bactérias e amido, bem como grânulos de amido estocados puderam ser vistos em todo citoplasma do parasito (Figura 8B, 9A - C). Seção do macronúcleo pode ser observada na figura 9A.

2. Discussão

Investigações ultraestruturais tem ampliado substancialmente as informações morfológicas e adequada classificação taxonômica dos protozoários. *B. coli* de suíno e *Cynomolgus* apresentaram características morfológicas similares às descrições prévias de isolado de suíno, por meio de estudos de microscopia eletrônica realizado nas Filipinas (Nilles Bije e Rivera, 2010) e de isolados de *B. coli* de suínos da Polônia analisados por estudos citoquímicos e pela microscopia eletrônica por Skotarckak (1997a), Skotarckzak (1999a) e (1999b). Esta confirmação taxonômica descarta a presença de espécies de *Balantidium* sp. específicas de suínos como

Balantidium suis, proposta por McDonald (1922) e das espécies de primatas não humanos descritas por Hegner (1934) como *Balantidium wenrichi*, *Balantidium philippinensis* e *Balantidium cunhamunizi*. Além da confirmação do parasitismo por *B. coli*, sua caracterização permitiu a identificação de estruturas e organelas ainda não relatadas na literatura para esse protozoário.

Os trofozoítos de *B. coli* evidenciados pela microscopia de DIC e MEV apresentaram morfologia típica desse parasito, arredondada na porção posterior e afunilada na porção anterior, onde pôde ser observada ventralmente uma abertura oral que conduz ao citóstoma, também denominada de boca. Na microscopia de varredura observou-se o aparato oral intensamente recoberto por uma ciliatura densa, os cílios orais. Auerbach (1953) ao estudar a morfologia de exemplares de *B. coli* de suíno e de humano a fresco e por técnicas de coloração permanente, como a hematoxilina de Heidenhain e tricômico de Gomori, observou que os cílios orais apresentaram a tendência de serem maiores e mais robustos do que os cílios somáticos. O autor afirmou também que os cílios orais cobrem toda o aparato oral, podendo ser observado no citóstoma e na citofaringe, no qual são fusionados a membrana plasmática. Li et al. (2007) ao estudarem *Balantidium ctenopharyngodoni* isolados de peixes na China também observaram por meio de exemplares corados com hematoxilina de Heidenhain ou de Erlich e por microscopia eletrônica de varredura, um vestibulo elíptico situado anteroventralmente, simétrico, com corpos basais dentro do vestibulo, apresentando um "pacote" de cílios densos. Segundo Zaman (1978), o batimento intenso dos cílios orais de *B. coli* é fundamental, pois realizam a condução do alimento para seu interior. O conjunto de resultados gerados no presente estudo corroboram esses achados e os aspectos funcionais dos cílios propostos por esse autor.

Preconiza-se que os ciliados possuem a arquitetura superficial mais elaborada dentre os protozoários (Huttenlauch et al., 1998). Essas características fornecem as principais informações filogenéticas e taxonômicas que auxiliam na melhor classificação do filo Ciliophora (Lynn, 2008). Krascheninnikow e Wenrich (1958) ao utilizarem coloração de azul de opalina pela técnica de Breslau e impregnação pelo nitrato de prata de Klein descreveram sucintamente as linhas longitudinais em *B. coli* isolados de suínos e em *Balantidium caviae* de cobaias. Nos exemplares estudados, a análise ultraestrutural permitiu visualizar com detalhes a superfície dos trofozoítos que se caracteriza pela ciliatura somática recobrindo todo o

corpo do parasito. Os cílios emergem adjacentes as cristas intercinetais que correspondem às linhas longitudinais descritas em 1958, que numa observação mais acurada mostram um padrão de organização quase radial ao eixo principal da célula.

As seções ultrafinas em microscopia de transmissão permitiram evidenciar o padrão de organização da região cortical do parasito, onde se visualizou a alternância de cristas e sulcos. A inserção dos cílios nos corpos basais, ou cinetossomos, ocorre nos sulcos e as cristas intercinetais observadas na superfície pela transmissão também são visualizadas como linhas longitudinais na microscopia de varredura. Ciliados apresentam um complexo citoesqueleto, formado principalmente por arranjos de tubulinas, que estão envolvidas na locomoção da célula, manutenção e organização da forma celular e na divisão do parasito (King et al., 1961; Frasson et al., 2010). Utilizando uma sonda fluorescente com o anticorpo anti- β -tubulina, e também com a análise da microscopia eletrônica de transmissão foi possível revelar estruturas tubulares do citoesqueleto do parasito, que foram principalmente evidenciadas em sua superfície e na região cortical. A fluorescência revelou tubulinas nos cílios e nas linhas longitudinais. Comparações com outros artigos da disposição de β -tubulinas em trofozoítos de *B. coli* não foram possíveis, visto que essa abordagem por imunofluorescência ainda não havia sido explorada com esse ciliado.

Os cílios de *B. coli* apresentaram rearranjo tubular padrão dos protistas ciliados com nove pares de microtúbulos periféricos arranjados de forma circular e um par de microtúbulo central. Nestes cílios, os filamentos de microtúbulos centrais terminam em um único grânulo esferoidal, que é marcado por um septo. Segundo King et al. (1961) os filamentos periféricos que constituem os cílios continuam para dentro da célula, onde formam o corpo basal ou cinetossoma. Na extremidade interior do cinetossoma foi observado também um disco de material denso perpendicular ao seu eixo longitudinal denominado de axosoma. Organização similar da ciliatura foi demonstrada em *B. coli* isolado de suíno (Nilles-Bije e Rivera, 2010). Segundo Silveira (2010) cada um destes pares de microtúbulos ciliar interagem como o par vizinho realizando um mecanismo de deslizamento, de modo a gerar curvas em toda estrutura ciliar. Essas interações tubulares permitem que os cílios executem um ciclo de batimento repetitivo, distinto e muito eficiente para gerar a rápida motilidade do corpo celular de *B. coli*. A eficiência da motilidade ciliar permite a natação constante do parasito no conteúdo do intestino grosso, minimizando

assim, sua eliminação para o ambiente, já que até o presente momento não foi demonstrado nenhuma estrutura de adesão em sua superfície.

Na superfície da região oral de *B. coli* foi relatado pela primeira vez microtúbulos organizados em formato de fileira ou “arquivo” e com aspecto hexagonal, denominados nematodesmas. Microtúbulos organizados em formato de arquivo e nematodesma também foram observados recentemente por Ming et al. (2014) ao estudarem a região vestibular de *B. ctenopharyngodoni* de peixes na China. Padrão de organização de nematodesma já havia sido descrito em *Balantidium entozoon* de rãs por Grim e Buonanno (2009). Acredita-se que os microtúbulos da região oral, observados em *B. coli*, pode fornecer sustentação ao complexo citóstoma-citofaringe, contribuindo para conformação da região oral, compondo assim o citoesqueleto.

A região posterior do parasito apresentou-se probermente corada, o que pôde ser notado pela fluorescência de β -tubulina do isolado de suíno. Citopígeo, também denominado de poro anal é uma abertura utilizada para eliminação de catabólitos (Auerbach, 1953). Pela microscopia de varredura foi possível visualizar a pequena quantidade de cílios revestindo a região posterior, o que denota o pouco gasto energético necessário para eliminação desses catabólitos.

Mucocistos com conteúdo granular foram observados logo abaixo da membrana plasmática dos ciliados estudados. O formato, tamanho e a localização dos mucocistos evidenciados neste estudo foram similares aos observados em isolados de fezes de suínos por Skotarczak (1999a) e Nilles-Bije e Rivera (2010). Skotarczak (1999a) revelou essas estruturas em isolados de *B. coli* de suínos com e sem sintomatologia clínica de balantidiose, porém mucocistos sem conteúdo foram descritos principalmente em suínos assintomáticos. Sabe-se que mucocistos são extrusomos, vacúolos secretores especializados, determinados morfologicamente como estruturas poliédricas de diferentes formatos, esféricos, ovais ou alongados, contendo uma única membrana. Essa denominação deve-se ao fato de que os extrusomos descarregam imediatamente e explosivamente seus conteúdos mucóides (proteínas) quando submetidos a estímulos. A atividade secretória desses mucocistos tem sido implicada na invasão do ciliado *Ichtyophthirus multifilis*, na pele e brânquias de peixes e que altas concentrações de cálcio favorecem sua atividade (Ewing et al., 1985). Skotarczak (1999a) observou, por meio de ensaios citoenzimáticos, que alguns mucocistos de *B. coli* apresentam atividade beta-

glucuronidase, enzima que catalisa a hidrólise de mucopolissacarídeos, facilitando então a penetração do ciliado na mucosa intestinal do hospedeiro.

Corpos com matriz granular, limitados por dupla membrana e circundados por perfis de retículo endoplasmático rugoso foram observados com frequência na microscopia de transmissão no citoplasma da célula dos parasitos, principalmente na região cortical, logo abaixo do corpo basal. Estas estruturas apresentaram grandes similaridades morfológicas à hidrogenossomos. Pressupõe-se que essas organelas evoluíram de mitocôndrias, sendo encontrados em microrganismos anaeróbios ou microaerófilos. Em protistas flagelados, ciliados e em alguns fungos os hidrogenossomos são esféricos ou ligeiramente alongados e seu tamanho pode variar de 200 nm a 2 µm. No caso de *B. coli*, além da alta concentração dos hidrogenossomos no seu citoplasma, pôde-se notar que o formato desta organela tende a esférico e seu tamanho, geralmente, é bastante volumoso em relação ao restante das organelas presentes no seu citoplasma. O hidrogenossomo é crucial para o parasito, pois produz hidrogênio molecular e ATP mas, ao contrário das mitocôndrias, não produzem oxigênio (Benchimol, 2009).

Por meio de estudos de microscopia de transmissão, hidrogenossomos também tem sido apontados como possíveis organelas em ciliados de anfíbios como *B. entozoon* por Grim e Buonanno (2009) e em *Balantidium duodeni* por Chistyakova et al. (2014). Em ensaios ultraestruturais associados a estudos citoquímicos, hidrogenossomos já foram confirmados em ciliados ruminais de ovino como *Dasytricha ruminatum*, *Isotricha prostoma* e *Isotricha intestinalis* (Yarlett et al., 1981; Yarlett et al., 1983) e também em ciliados em vida livre, *Metopus contortus*, utilizando ultraestrutura e citometria de fluxo (Biagini et al., 1997).

Geralmente, hidrogenossomos não possuem ácidos nucleicos, com algumas exceções. Em *Nyctotherus ovalis*, ciliado isolado de baratas, foi possível evidenciar hidrogenase e DNA de cadeia dupla por meio de métodos citoquímicos e moleculares. Após o sequenciamento e alinhamento do fragmento SSU RNAr observou-se que a sequência gerada do hidrogenossomo permanecia no mesmo *cluster* gênico das mitocôndrias, não sendo portanto, possível diferenciá-las filogeneticamente. Tais organelas parecem ter evoluído de mitocôndrias, provavelmente na jornada evolutiva de adaptação dos ciliados a diferentes ambientes (Van Hoek et al., 2000).

Algumas organelas evidenciadas nos trofozoítos estudados demonstraram um padrão morfológico semelhante ao de mitocôndrias. Estes achados geraram muitas discussões no momento do estudo. Além disso, em análises anteriores, Nilles Bije e Rivera (2010) também destacaram uma organela similar a mitocôndrias em *B. coli* de suínos, por meio da microscopia de transmissão. Apesar de ter sido evidenciado estruturas similares a hidrogenossomos, a presença de mitocôndrias não deve ser descartada. Estudos citoquímicos em *B. coli* necessitam ser realizados para confirmação de tais organelas.

Estruturas circulares ou ovais contendo material eletrodense no seu interior, similares a peroxissomos, foram visualizadas nestes trofozoítos, na região cortical próximo aos hidrogenossomos. Estas organelas já haviam sido evidenciadas em ensaios de microscopia de transmissão e citoquímica em *B. coli* de suínos por Skotarczak (1997a). Peroxissomos são estruturas ricas em enzimas catalíticas que conduzem a quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, protegendo a membrana da célula parasitária de possíveis danos (Novikoff, 1969).

Macronúcleo foi observado por meio da microscopia de fluorescência, localizado na porção anterior até o meio do corpo do parasito, porém não foi evidenciado o micronúcleo. Apesar de existir na literatura descrição morfológica quanto à presença frequente do micronúcleo próximo ao macronúcleo neste parasito, poucos estudos tem realmente demonstrado sua presença por microscopia. Zaman (1978) afirmou que formas evolutivas de *B. coli* amiconucleadas podem ser observadas, porém não se sabe a sua frequência. Auerbach (1953) estudando morfológicamente cepa de *B. coli* humana e de suíno, também não conseguiu observar micronúcleo no isolado de humano, que estava sendo mantido, há mais de dois anos, em meio de cultivo na Universidade de Nova Iorque. O autor sugeriu que a ausência do micronúcleo pode ser influenciada pelo local geográfico de isolamento da cepa. Em exemplares de outros ciliados, estudados diretamente do material fecal, pode ser observada também ausência de micronúcleo, como *Paracichliodotherus tuvali* detectado em peixes marinhos (Grim et al., 2002). Porém, em diferentes espécies do ciliado em salamandras na China, *B. andianusis* e *B. sinensis*, o micronúcleo pôde ser observado com muita facilidade, próximo à concavidade do macronúcleo em fotomicrografias de exemplares corados com hematoxilina de Ehrlich (Li et al., 2008). Cabe ressaltar, que assim como a cepa humana, os isolados de *B. coli* de suíno e primata não humano estudados também estavam sendo

mantidos *in vitro* por quase 34 meses. O longo tempo de cultivo deve ser analisado em estudos posteriores como um dos fatores que podem contribuir para amicronucleação.

A microscopia de DIC, associada à fluorescência e eletrônica foram capazes de confirmar morfológicamente os isolados de *B. coli*. Além disso, a metodologia utilizada permitiu revelar a organização ultraestrutural, inclusive organelas que ainda não haviam sido descritas, como o padrão microtubular e o material nuclear revelado pelos conjugados de fluoróforos, estruturas do citoesqueleto e organelas como hidrogenossomos demonstradas pela microscopia eletrônica. Apesar desta descrição, ainda são poucas as informações sobre este ciliado, sendo necessária a observação de outras organelas por meio de estudos exploratórios de ultraestrutura e também a realização de ensaios citoquímicos para confirmação de estruturas importantes na rota metabólica do parasito como os hidrogenossomos/mitocôndrias.

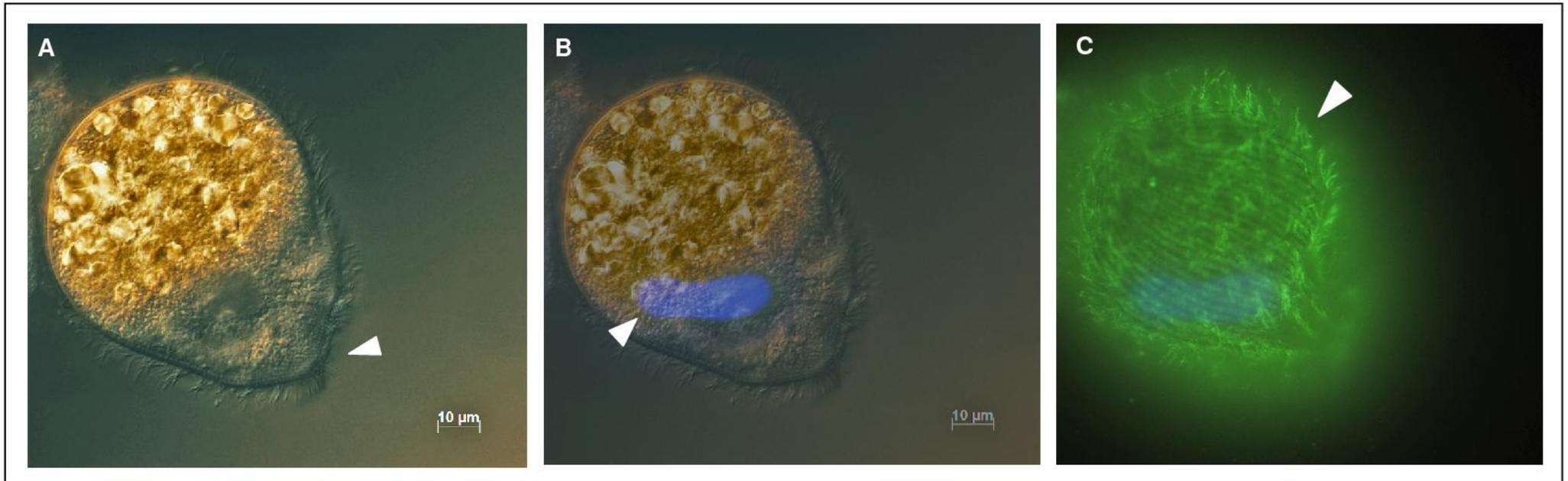


Figura 1. Microscopia óptica de contraste de interferência diferencial (DIC) e de fluorescência de isolados de *B. coli* de *Cynomolgus*. **A.** Microscopia de DIC observa-se cílios revestindo todo o corpo do parasito e também o aparato oral (seta). **B.** Microscopia de DIC e fluorescência sobrepostas, mostrando o corpo do ciliado e o macronúcleo em azul. **C.** Microscopia de fluorescência, em verde evidenciando-se os microtúbulos ao longo do corpo do ciliado e nos cílios (seta), em azul o macronúcleo.

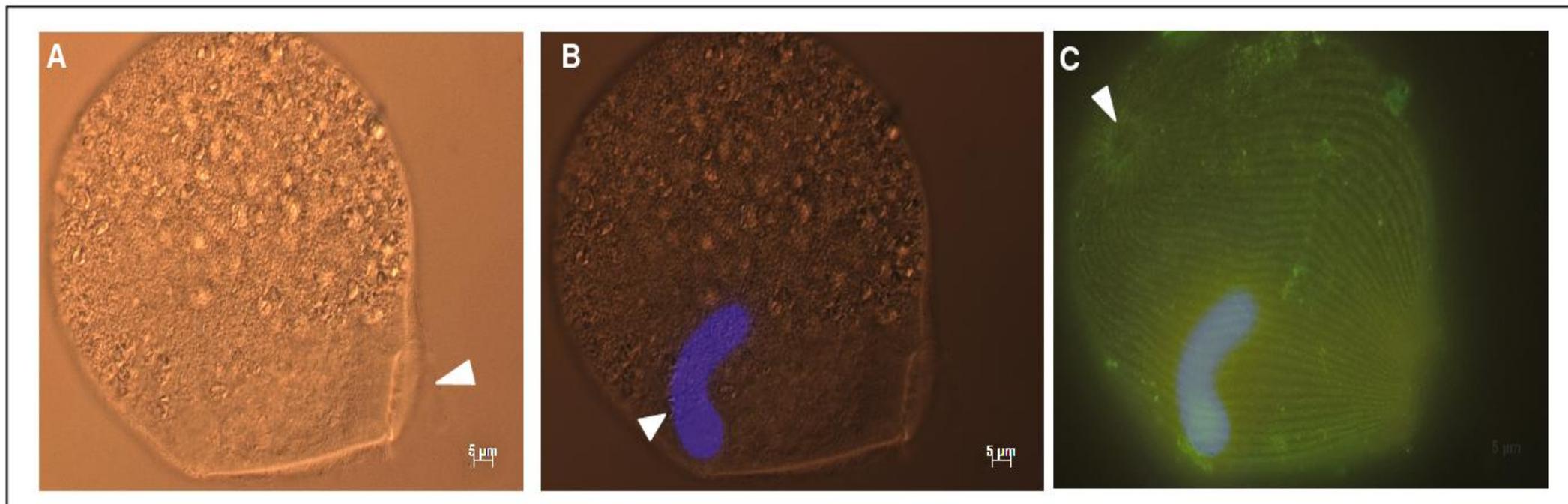


Figura 2. Microscopia óptica de contraste de interferência diferencial (DIC) e fluorescência de isolados de *B. coli* de suíno. **A.** Microscopia de DIC mostrando os cílios revestindo o corpo do parasito e o aparato oral (seta). **B.** Microscopia de DIC e fluorescência sobrepostas, mostrando o corpo do ciliado e o macronúcleo em azul (seta). **C.** Microscopia de fluorescência: em verde evidenciando-se os microtúbulos ao longo do corpo do ciliado, sendo pouco observado na região posterior (seta) e em azul o macronúcleo.

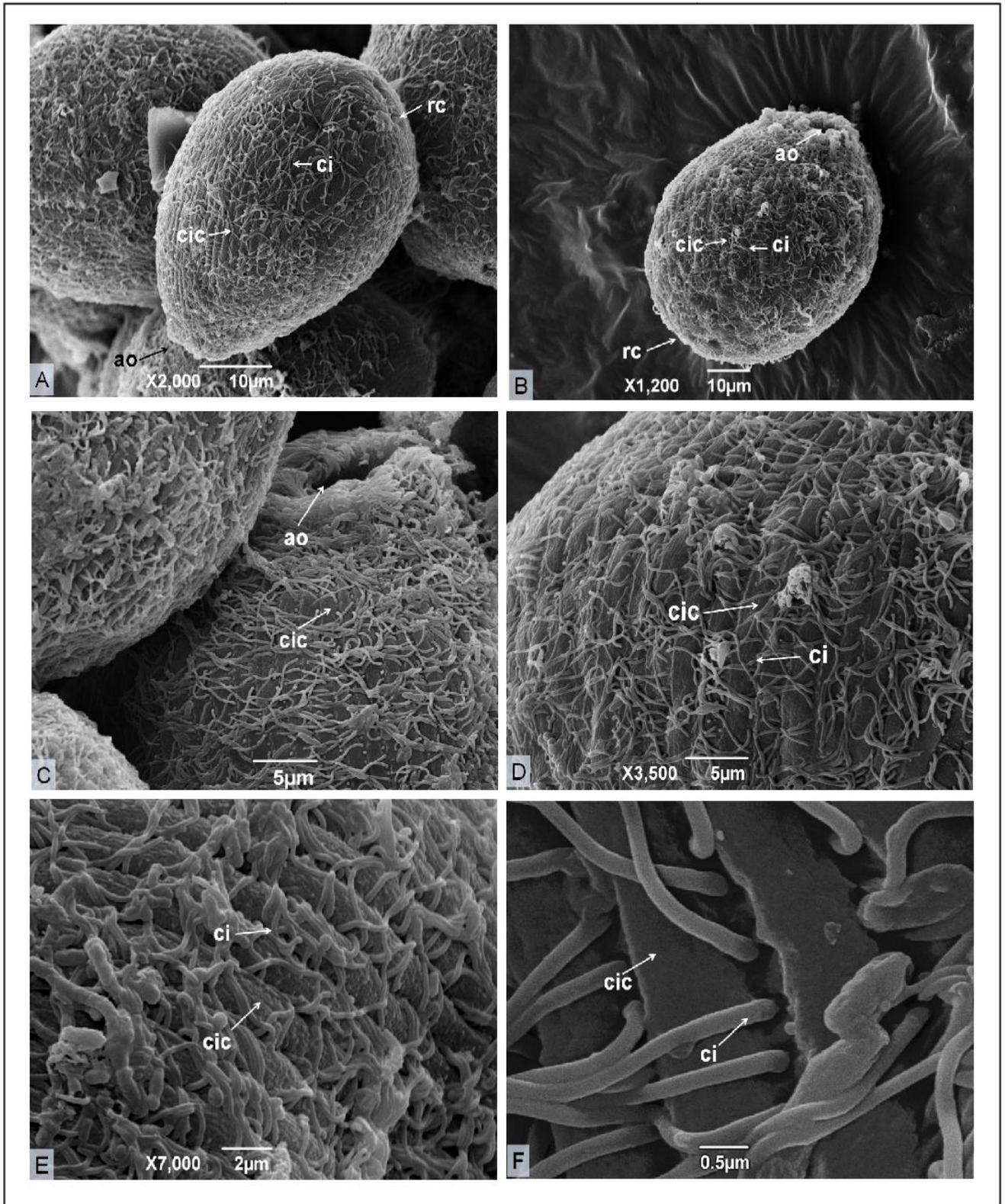


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos de *B. coli*. **A - B.** Visão geral do isolado de *B. coli* de *Cynomolgus* e suínos, respectivamente mostrando o aparato oral (ao) e região caudal (rc), cristas intercinetais (cic) e cílios (ci). **C.** Em *B. coli* de suíno observa-se aparato oral (ao) e cristas intercinetais. **D - E.** Visão ampliada do cílio somático (ci) e cristas intercinetais (cic) em *B. coli* de *Cynomolgus*. **F.** Detalhamento das cristas intercinetais (cic) e inserção dos cílios (ci) somáticos, em *B. coli* de suíno.

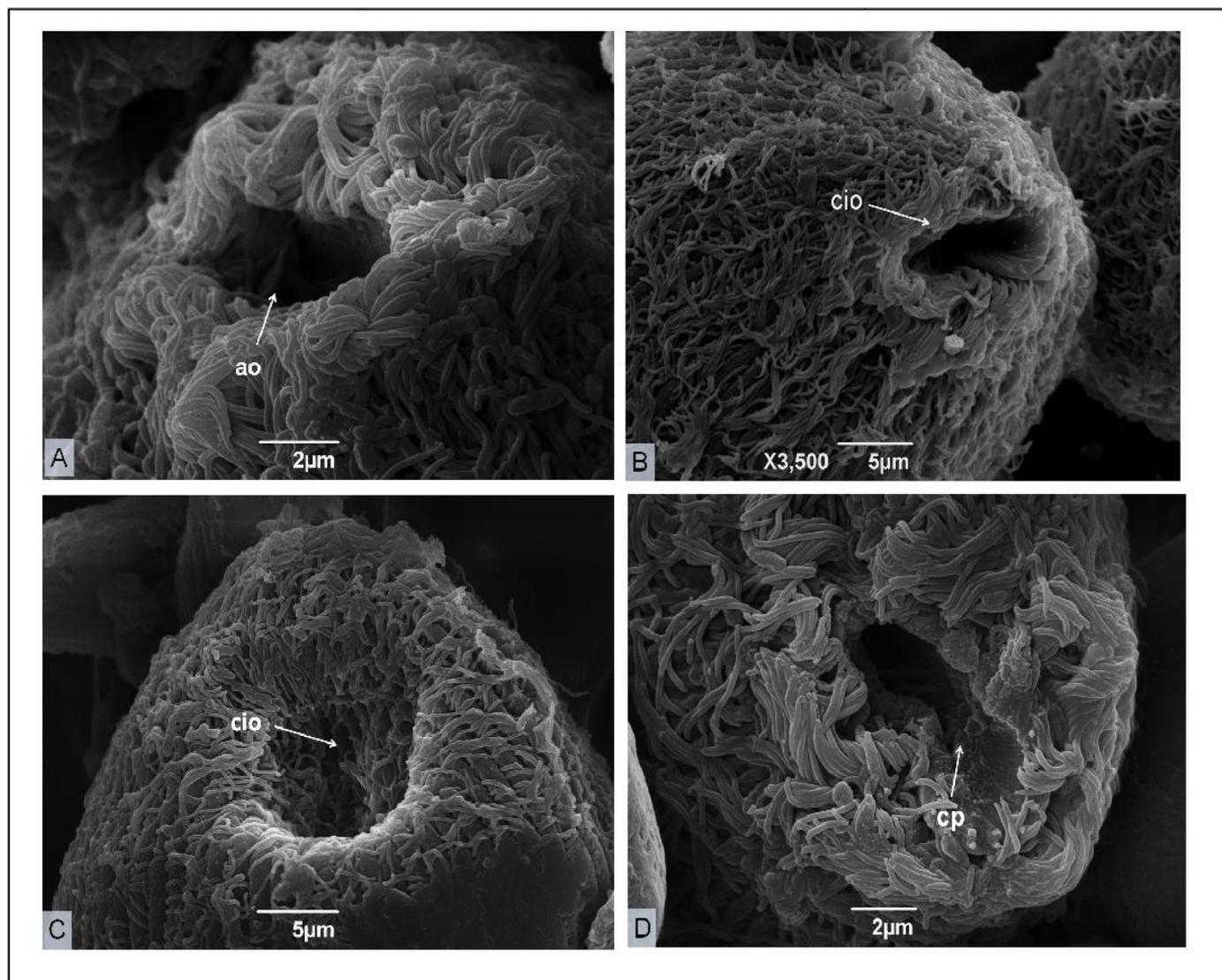


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos de *B. coli*. **A.** Visão ampliada do aparato oral (ao) de *B. coli* de suíno. **B - C.** Cílios orais (cio) em isolado de *B. coli* de *Cynomolgus*. **D.** Visão ampliada do citopígeo (cp) de *B. coli* de suíno.

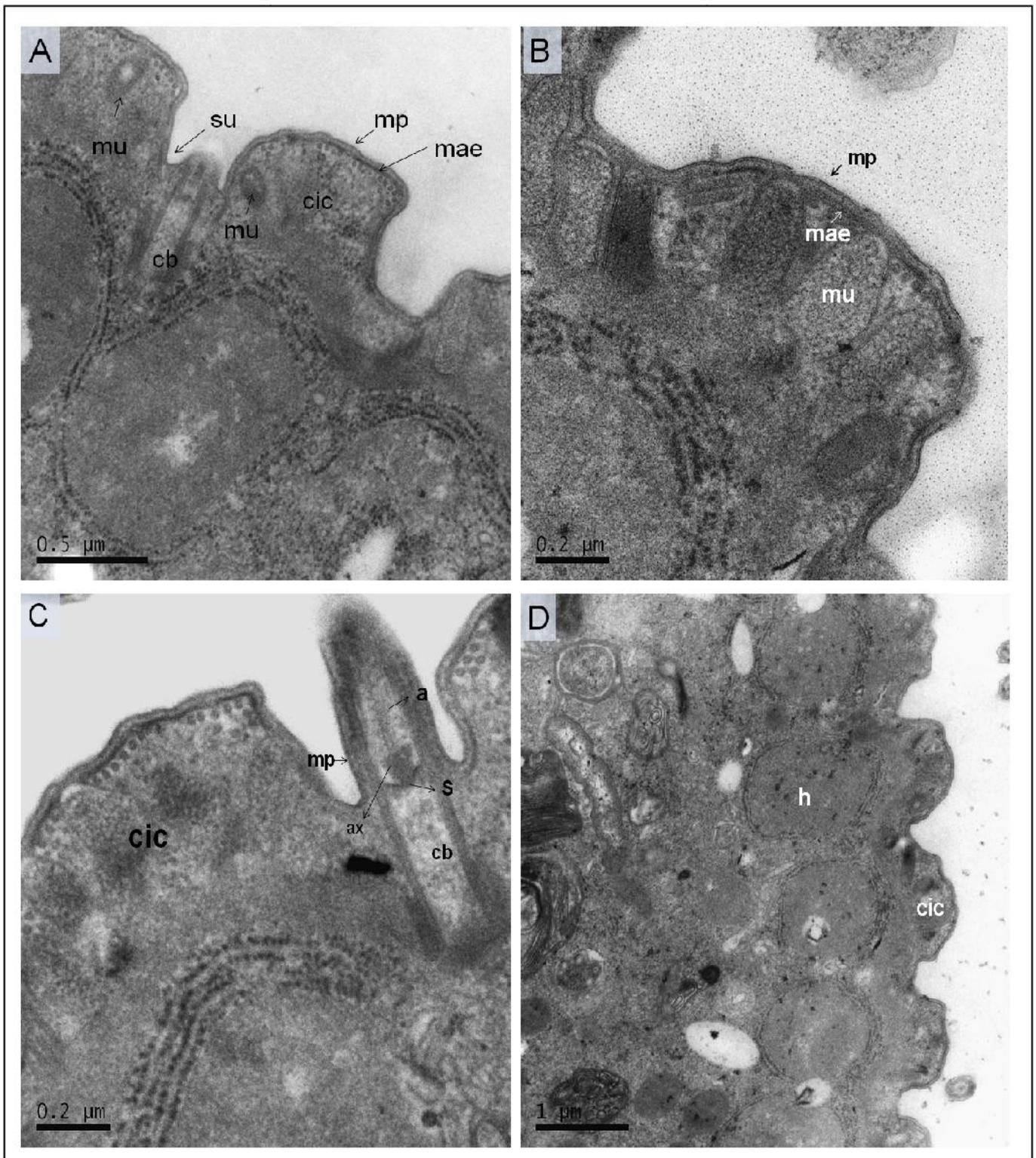


Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli* do símio *Cynomolgus* e de suíno. **A - B.** Vista das estruturas internas da superfície somática do parasito do símio. Cortes ultrafinos onde são observadas cristas intercinetais (*cic*) e sulcos (*su*). Os corpos basais (*cb*) emergem desses sulcos. Membrana que envolve o plasma (*mp*) e a membrana alveolar externa (*mae*). Mucocistos (*mu*) são observados abaixo da membrana alveolar. **C.** Detalhes das estruturas ciliares de isolado de *Cynomolgus*, onde são observados corpo basal (*cb*), septo (*S*), axosoma (*ax*) e axonema (*a*). Membrana plasmática (*mp*) que envolve a crista também envolve o cílios. **D.** Micrografia geral da superfície mostrando cristas intercinetais e organelas similares a hidrogenossomos (*h*) de *B. coli* isolado de suíno.

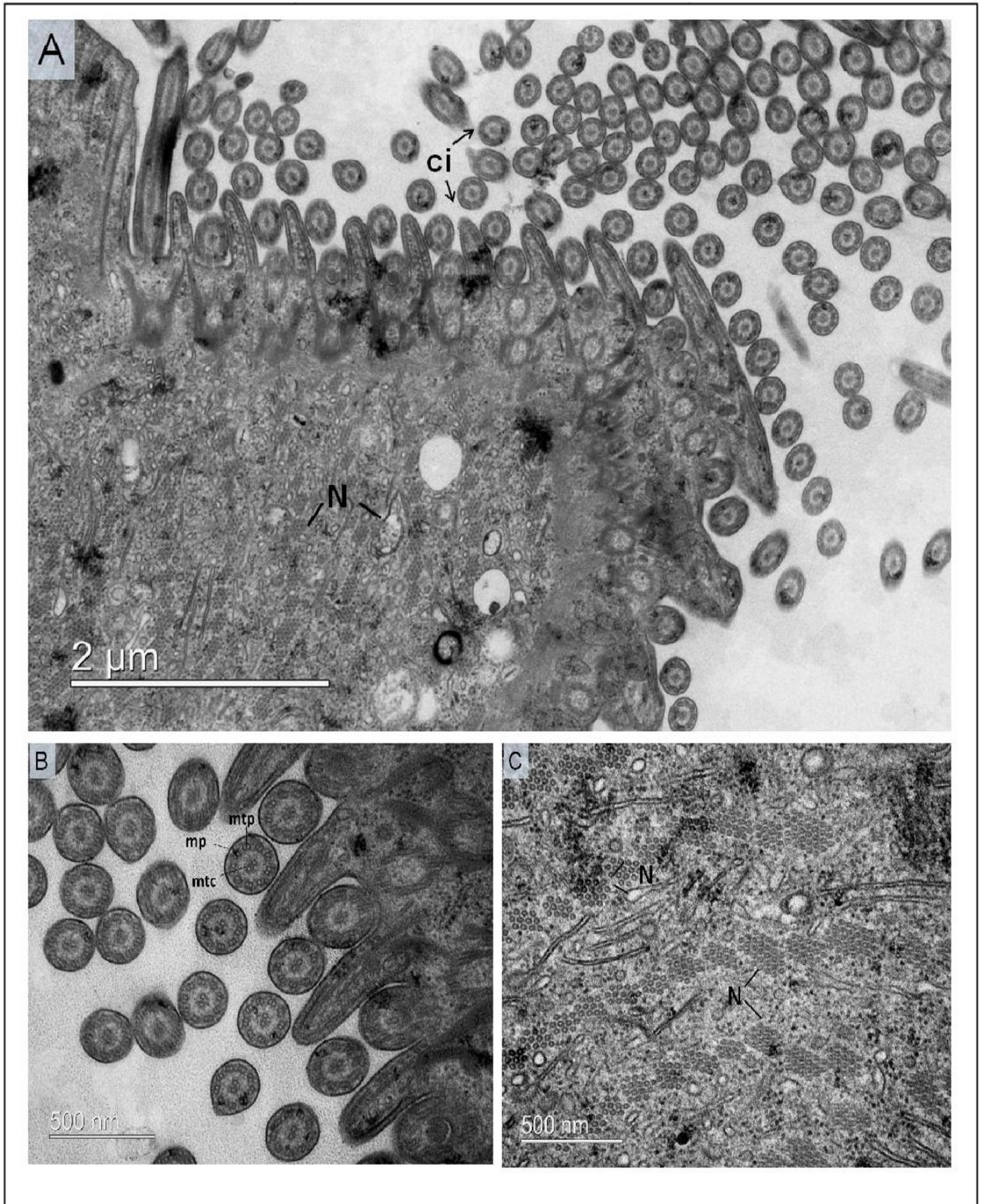


Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli*. **A.** Visão geral das estruturas internas da superfície somática do parasito. Cortes ultrafinos onde são observados cílios (*ci*) e redes de nematodesma (*N*). **B.** Vista ampliada dos cortes transversais onde observa-se membrana plasmática (*pm*), microtúbulos periféricos (*mtp*) e microtúbulos centrais (*mtc*). **C.** Redes de Nematodesma (*N*) no córtex celular.

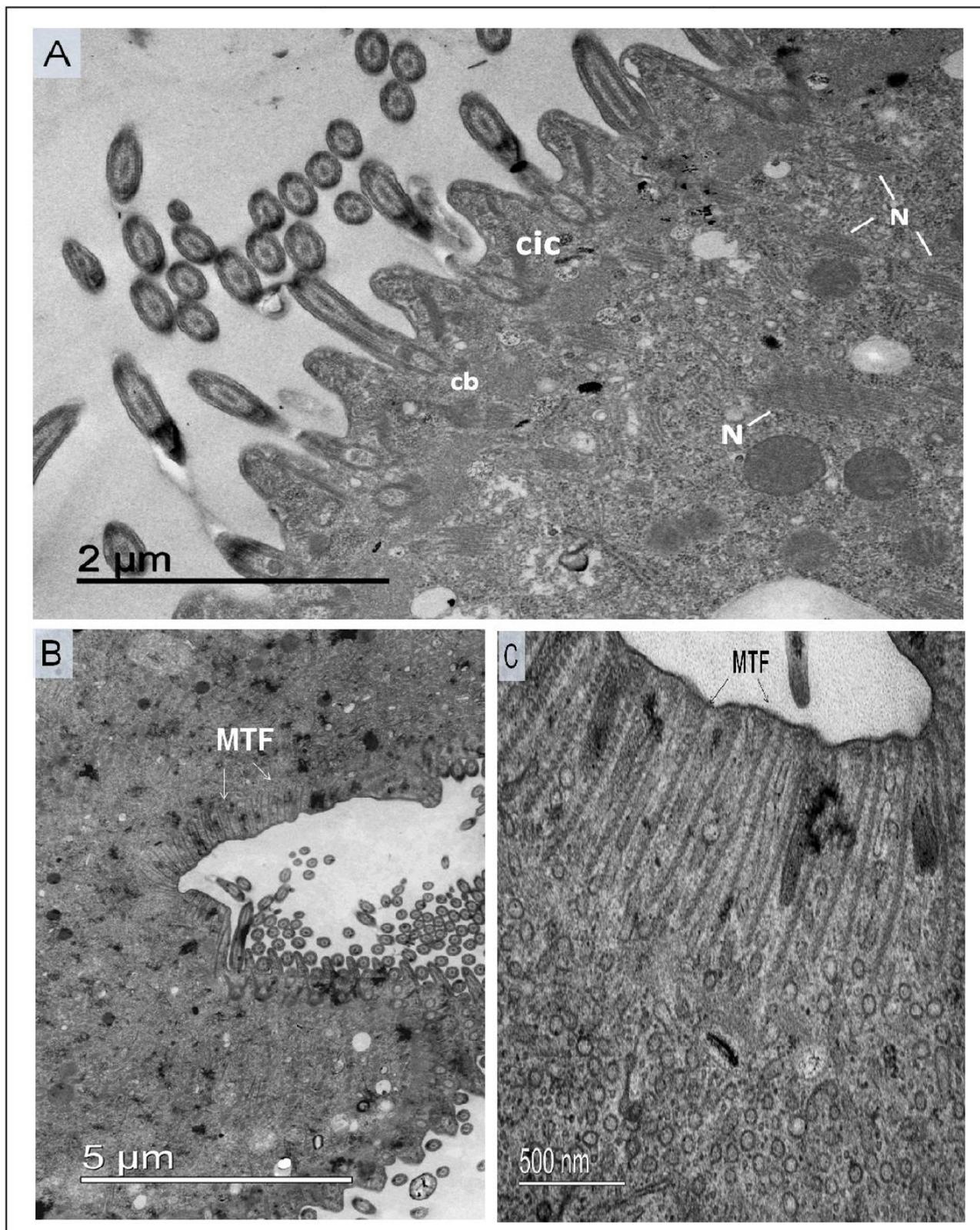


Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli*. **A.** Superfície cortical onde pode ser observado microtúbulos Nematodesma (*N*) em padrão longitudinal. **B.** Visão geral das estruturas internas da superfície vestibular do parasito. Cortes transversais ultrafinos onde são observados microtúbulos organizados em fileiras (*MTF*) **C.** Vista ampliada dos microtúbulos (*MTF*).

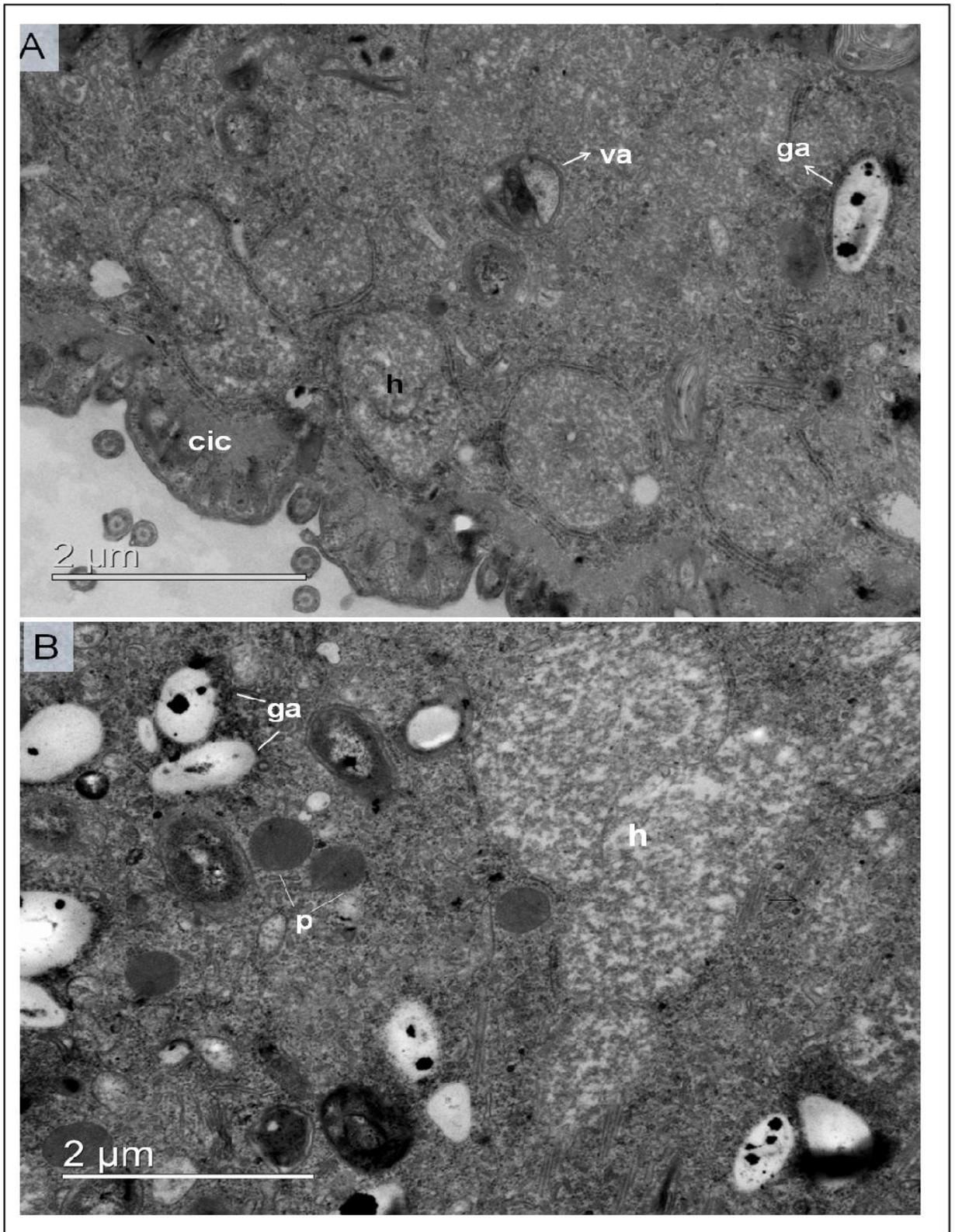


Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli*. **A.** Hidrogenossomos (*h*), vacúolo alimentar (*va*) e grânulo de amido (*ga*) podem ser observado em corte ultrafino do parasito isolado de suíno. **B.** Visão ampliada dos hidrogenossomos (*h*), peroxissomos (*p*) e grânulos de amido (*ga*) do trofozoíta isolado de *Cynomolgus*.

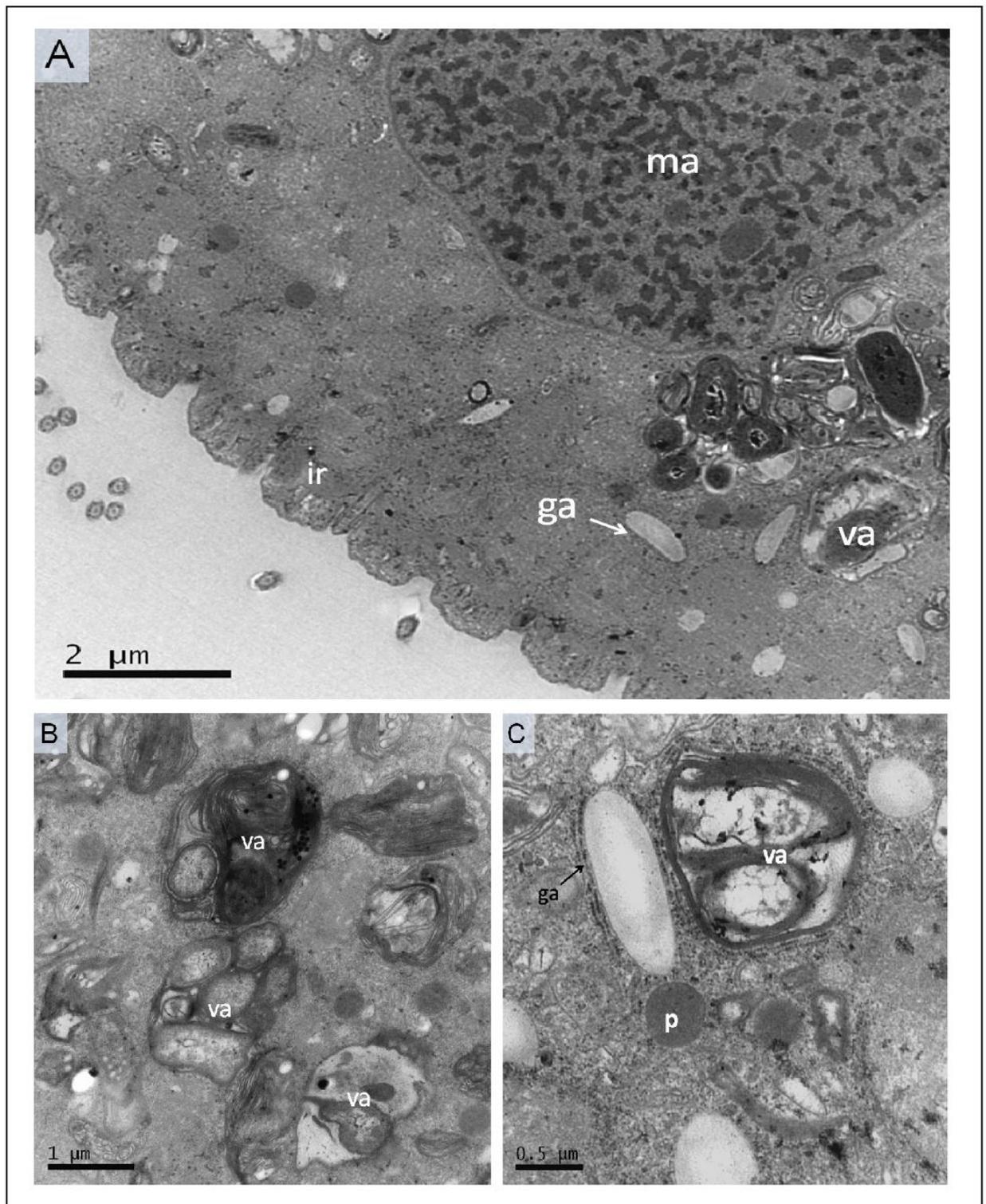


Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *B. coli*. **A.** Visão geral das estruturas internas evidencia-se macronúcleo (*ma*), vacúolo alimentar (*va*), grânulos de amido (*ga*) e crista intercinetal (*cic*) de trofozoíto isolado de símio. **B – C.** Vista ampliada de vacúolo alimentar de *B. coli* isolado de suíno. **C.** Vacúolo alimentar (*va*), grânulo de amido (*ga*) e peroxissomos (*p*).

Referências

- Auerbach E. The study of *Balantidium coli* (Stein, 1863) in relation to cytology and behavior in culture. J Morphol. 1953; 93:405- 445.
- Benchimol M. Hydrogenosomes under microscopy. T Cell. 2009; 41:151-168.
- Biagini GA, Hayves AJ, Suller MTE, Winters C, Finlay BJ, Lloyd D. Hydrogenosomes of *Metopus contortus* physiologically resemble mitochondria. Microbiol. 1997; 143:1623 – 1629.
- Chistyakova LV, Kostygov AY, Kornillova AO, Yurchenko V. Reisolation and redescription of *Balantidium duodeni* Stein, 1867 (Litostomatea, Trichostomatia). Parasitol Res. 2014; 113(11):4207-15.
- Ewing MS, Kocan KM, Ewing SA. *Ichthyophthirius multifis* invasion of gill epithelium. J Protozool. 1985; 32:305-310.
- Frasson AP, Vieira PB, De Carli GA, Tasca T. Giardia lamblia: Distribuição de microtúbulos no citoesqueleto de trofozoítos e cistos utilizando taxóide fluorescente. Rev Patol Trop. 2010; 39 (1): 21 – 32.
- Grim JN, Kendall D Clements, Byfield T. New species of *Balantidium* and *Paracichlidotherus* (Ciliophora) inhabiting the intestines of four surgeonfish species form the Tuvalu islands, Pacific ocean. J Eukaryot Microbiol. 2002; 49 (2): 146 – 153.
- Grim JN, Buonanno F. A re-description of the ciliate genus and type species *Balantidium entozoon*. Eur J Protistol. 2009; 45:174-182.
- Hegner R. Specificity in the genus *Balantidium* based on size and shape of body and macronucleus, with descriptions of six new species. Am J Hyg. 1934;19:38–67.
- Huttenlauch I, Peck RK, Stick R. Articulins and epiplasmins:two distinct classes of cytoskeletal proteins of the membrane skeleton in protists. J Cell Sci. 1998; 111:3367 – 3378.
- King RL, Beams HW, Tahmisian TN, Devine RL. The ciliature and infraciliature of *Nyctotherus ovalis* Leidy. J Protozool. 1961;8(1):98 - 111.
- Krascheninnikow S, Wenrich DH. Some observations on the morphology and Division of *Balantidium coli* and *Balantidium caviae*. J Protozool. 1958; 5 (3):196 – 202.

Li M, Li D, Wang J, Zhang J, Gu Z, Gong X. Light and scanning electron microscopic study of *Balantidium ctenopharyngodoni* Chen, 1955 (Class: Litostomatea) from China. Parasitol Res. 2007; 101:185–192.

Li M, Wang J, Zhang J, Gu Z, Ling F, Ke X, Gong X. First report of two *Balantidium* species from the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*: *Balantidium sinensis* Nie 1935 and *Balantidium andianusis* sp. Parasitol Res. 2008; 102:605-611.

Lynn DH. The Ciliated protozoa. Characterization Classification and Guide to the Literature Third Ed. Springer, New York. 638pp; 2008.

McDonald JD. On *Balantidium coli* and *B. suis* (sp. nov.). Univ Calif Publ Zool 1922; 20:243–246.

Ming L, Chong W, Grim JN, Jianguo W, Xiaoning G. Ultrastructural study of *Balantidium ctenopharyngodoni* Chen, 1955 (Class: Litostomatea) from China with an emphasis on its vestibulum. Acta Parasitol. 2014; 59 (3):413 – 419.

Nilles-Bije ML, Rivera WL. Ultrastructural and molecular characterization of *Balantidium coli* isolated in the Philippines. Parasitol Res. 2010; 106:387 -394.

Novikoff AB. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. J Histochem Cytochem. 1969; 17:675 – 680.

Skotarczak B (a). Ultrastructural and Cytochemical identification of peroxisomes in *Balantidium coli*, Ciliophora. Folia biol (Kraków). 1997; 45(3-4): 117 – 120.

Skotarczak B (a). Cytochemical identification of mucocysts in *Balantidium coli* trophozoites. Folia biol (Kraków). 1999; 47 (1-2): 61 – 65.

Skotarczak B (b). The formation of primary and secondary lysosomes in *Balantidium coli*, Ciliata. Folia Histochem Cyto. 1999; 37 (4):261-265.

Silveira M. Scanning microscopy of ciliary organelles. Micros: Sci, Tech, Appl, Edu. 2010; 1: 156-161.

Van Hoek AHAM, Akhmanova AS, Huynen MA, Hackstein HP. A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. Mol Biol Evol. 2000; 17 (1) 202-206.

Yarlet N, Hann AC, Lloyd D Williams A. Hydrogenosomes in the rumen protozoon *Dasytricha ruminatum* Schuberg. Biochem J. 1981; 200: 365-372.

Yarlet N, Hann AC, Lloyd D. Hydrogenosomes in a mixed isolate of *Isotricha prostoma* and *Isotricha intestinalis* from ovine rumen contents. *Comp Biochem Physiol.* 1983; 74B(2): 357 – 364.

Zaman V. *Balantidium coli*. In: Kreier JP (Ed). *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, p. 633-653; 1978.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Balantidium coli é um protozoário intestinal extremamente negligenciado na medicina humana, e ainda pouquíssimo estudado, tanto nos humanos quanto nos outros animais, mesmo nos suídeos e primatas não humanos os quais têm sido considerados por muitos autores como os principais reservatórios da parasitose. No Brasil, o diagnóstico desse protozoário restringe-se a casos clínicos isolados ou a estudos de inquéritos coproparasitológicos. A balantidiose geralmente é detectada em países em desenvolvimento e em locais que apresentam clima tropical ou subtropical, variáveis que são encontradas no estado do Rio de Janeiro.

A casuística desta parasitose tem sido mais pesquisada na suinocultura, tanto em território nacional quanto internacional. Vários estudos tem mostrado elevada prevalência do protozoário nestes hospedeiros, como relatado nas granjas na China por Lai et al. (2011) e Weng et al. (2005) e no Brasil, em São Paulo e Minas Geras por Nishi et al. (2000) e no Distrito Federal por Aguiar (2009). Nas granjas de suínos analisadas nos diferentes municípios da região fluminense, *B. coli* foi o parasito mais frequente independente do sistema de manejo adotado, sendo evidenciado nas amostras fecais dos animais das granjas familiares e nas amostras dos animais das granjas com sistema de produção do tipo industrial.

Elevada frequência de *B. coli* também foi encontrada nas amostras de fezes dos primatas do Velho Mundo do gênero *Macaca* sp. habitantes do Cecal/Fiocruz. Apesar de também terem sido analisadas amostras fecais de espécies de símios neotropicais, habitantes do Cecal e do Centro de Primatologia do estado do Rio de Janeiro (CPRJ), pôde-se observar claramente elevada positividade do parasito nas fezes dos símios *Cynomolgus* (*M. fascicularis*) e de Rhesus (*M. mulatta*). A alta frequência de *B. coli* em primatas não humanos cativos já foi relatada em estudos realizados em outros países, sendo sua ocorrência sempre maior nos animais cativos do Velho Mundo e nos Grandes Primatas, do que nas espécies do Novo Mundo, como pôde ser observado nos zoológicos da Bélgica (Levecke et al., 2007) e Malásia (Lim et al., 2008). Este resultado pode sugerir uma maior suscetibilidade das espécies do Velho Mundo ao parasitismo por *B. coli*, associado ao fato de serem animais menos arborícolas do que os neotropicais, o que facilita o contato com o bolo fecal e com o ambiente contaminado. Apesar desse resultado, cabe ressaltar a

necessidade de mais estudos epidemiológicos que envolvam diferentes espécies neotropicais, pois já foi relatado elevada frequência de *B. coli* em Muriquis em Minas Gerais e no Espírito Santo (Santos et al., 2004 ; Angonesi et al., 2009).

Sabe-se que os humanos adoececem da parasitose apresentando principalmente sintomatologia gastrintestinais, como diarreia e disenteria, ou até mesmo casos extraintestinais (Schuster e Ramirez - Ávila, 2008). A patogenia e a sintomatologia da balantidiose para suínos e primatas não humanos ainda permanece obscura, sendo relatada em casos clínicos, de forma esporádica, na medicina veterinária. Esse fato fortalece a sugestão de que haveria um elevado grau de adaptação parasitária entre *B. coli* e esses hospedeiros, o que determinaria esporádicos episódios de agressão.

Neste estudo, todas as amostras fecais analisadas das pessoas manipuladoras dos animais foram negativas para formas evolutivas de *B. coli*, embora tenha sido detectado elevada frequência do parasito no material fecal dos animais. De forma geral, a prevalência da balantidiose na população humana apresenta valores muito baixos, sendo a parasitose considerada, em muitos casos, rara (Solaymani-Mohammadi et al, 2006). Walzer et al. (1973) ressaltam a possibilidade dessa baixa frequência parasitária estar associada a possível resistência humana. Porém, é importante destacar uma condição higiênico – sanitário aparente adequada individual dos manipuladores, mesmo vivendo em diferentes condições sócio – econômicas.

A baixa prevalência da balantidiose relatada em muitos estudos pode estar ocorrendo também devido a utilização de técnicas coproparasitológicas de baixa eficiência. Apesar de *B. coli* ser um protozoário intestinal, o cisto do parasito tem dimensões compatíveis com muitos ovos de helmintos, podendo determinar equívocos na escolha do método de diagnóstico. Para esclarecer estas dúvidas e assim, aumentar a eficiência do diagnóstico desta parasitose, este estudo também comparou a eficiência das principais técnicas parasitológicas utilizadas na rotina de diagnóstico, como o exame direto, a sedimentação espontânea (Lutz, 1919), a centrífugo sedimentação em acetato de etila (Ritchie modificada por Young et al. (1979), a centrífugo flutuação com sulfato de zinco (Faut et al. 1938) e também com sacarose (Sheather modificada por Huber et al. 2003). As técnicas laboratoriais mais simples foram as mais eficientes para o diagnóstico da balantidiose, como o exame direto e a sedimentação espontânea. O exame direto contribuiu na frequência de

diagnóstico da parasitose, pois recuperou os trofozoítos, que muitas vezes, foram às únicas formas evolutivas evidenciadas do parasito na amostra fecal. Além disso, foi também a técnica que mais recuperou os cistos nas amostras fecais de suínos. Já Lutz, com o tempo de sedimentação de 24 horas foi à técnica mais eficiente na recuperação dos cistos nas amostras de primatas não humanos. As flutuações de Faust et al. e Sheather modificada, não apresentaram desempenho adequado na recuperação das formas císticas de *B. coli*, demonstrado ser essa uma estrutura parasitária pesada que dificilmente flutua, diferentemente do que ocorre com os cistos e oocistos dos outros enteroprotzoários. Além disso, observou-se deformação dos cistos nessas técnicas.

Mesmo utilizando o diagnóstico parasitológico tradicional no qual se evidencia por meio das lâminas por microscopia os cistos e trofozoítos, este estudo também realizou o isolamento do protozoário *in vitro*. O cultivo *in vitro* tem valor inquestionável, pois permite estudos aprofundados da biologia do parasito, fisiologia, ultraestrutura, triagem de fármacos e biologia molecular. Para realização do cultivo, antes de tudo foi necessário a padronização do isolamento, uma vez que poucos estudos o realizam, e quando o fazem, geralmente apresentam poucas explicações nas metodologias. Para essa etapa foi realizada a padronização do isolamento no meio de cultivo xênico Pavlova modificado, um meio simples, que tem sido utilizado para cultivo de *Entamoeba histolytica* há muitos anos. Com esse meio foi possível isolar e manter por mais 34 meses cepas de *B. coli*. Esse período foi, até o momento, o mais longo de manutenção descrito na literatura. Tempo prolongado de manutenção, porém menor do que o desse estudo foi descrito por Klass (1974) e Zaman (1978) que conseguiram manter por 30 meses cepas de *B. coli* isoladas de suínos também em meios xênicos.

Após o isolamento com sucesso das cepas, foi necessário estudos de avaliação do comportamento cinético em diferentes meios de cultura xênicos para identificar um protocolo ideal de manutenção. Com esse estudo foi possível conhecer a curva de crescimento quantitativo do parasito, permitindo otimizar a rotina laboratorial e assim tornar as passagens menos trabalhosas para o manipulador, já que rotinas de cultivo *in vitro*, geralmente, são muito exaustivas (Clark e Diamond, 2002). O comportamento das cepas foi analisado em três meios xênicos, o próprio Pavlova modificado, onde as cepas foram isoladas e os meios xênicos LES e TYSGM-9, que também tem sido utilizado para isolamento e

manutenção de amebídeos. O desenvolvimento das cepas foram avaliadas nos tempos de incubação em estufa de 24, 48, 72 e 96 horas. Apesar do resultado satisfatório em TYSGM-9, Pavlova modificado foi considerado o meio ideal para manutenção das cepas de *B. coli*, por garantir viabilidade do parasito em intervalos de subcultivos mais longos, de 48 a 72 horas, determinando, assim, maior segurança para manutenção do protozoário, além de ser o meio de cultivo estudado de menor custo e de fácil preparo, podendo ser utilizado por qualquer laboratório de pesquisa.

Todas as cepas em cultivo, assim como a maioria das amostras fecais analisadas pela biologia molecular apresentaram a confirmação do parasitismo para *B. coli*, descartando a possibilidade de ocorrência de outras espécies como *B. suis* como proposto por McDonald em 1922. As variantes foram classificadas como tipo A0, o mesmo tipo presente em cepa humana que consta no Genbank e que foi analisada por Ponce Gordo et al. (2011). Apesar desse resultado, o estudo molecular para *Balantidium* sp. ainda é muito recente se comparado aos outros microrganismos, sendo poucos as pesquisas que realizaram análises moleculares desse protozoário. Os alvos moleculares existentes ainda geram poucas informações taxonômicas, o que torna evidente a necessidade do desenho e avaliação de mais marcadores que definam melhor o perfil epidemiológico da parasitose. O predomínio da variante A0 que ocorreu nas amostras desse estudo pode ser um evento esporádico ou até mesmo, um predomínio desta em território fluminense. Esse resultado deve ser confirmado com mais estudos moleculares, de preferência que utilizem mais amostras de humanos e também de outros hospedeiros, como os primatas neotropicais.

Duas cepas mantidas por longo período em cultivo, uma isolada de suíno e outra de *Cynomolgus*, também foram submetidas a estudos morfológicos e ultraestruturais. Estes estudos permitiram, também, a confirmação taxonômica de tal espécie a nível morfológico e ultraestrutural. Esta confirmação foi possível por meio de comparações com descrições prévias contidas na literatura de *B. coli* isolados de suínos e humano (Auerbach, 1953; Skotarckak, 1997a e Skotarckzak, 1999a; Skotarckzak, 1999b; Nilles Bije e Rivera, 2010). Além da descrição taxonômica, essas análises revelaram estruturas e organelas extremamente importantes para organização e metabolismo do ciliado, que ainda não haviam sido descritas. A

identificação destas estruturas podem no futuro contribuir para estudos mais avançados a nível molecular, fisiológico e farmacêutico.

A similaridade das cepas estudadas com *B. coli*, parasito de humano, foram evidenciadas a nível molecular, onde foi possível observar o mesmo padrão de variante. Porém, similaridades com a cepa humana também foram vistas a nível microscópico, pois assim como descrito por Auerbach em 1953 ao estudar a morfologia de uma cepa de *B. coli* de origem humana, nas cepas de suíno e *Cynomolgus* desse estudo, também não foi observado micronúcleo. Tal característica chama a atenção, pois apesar do relato frequente do micronúcleo em livros didáticos de Parasitologia, raros são os estudos que realmente mostram tal organela em *B. coli*, não sendo possível, portanto avaliar a sua real frequência. Da literatura pesquisada, somente Zaman em 1978 demonstrou com clareza o micronúcleo em uma fotomicrografia de transmissão de *B. coli* de origem desconhecida.

Esta pesquisa comprovou que suínos e primatas não humanos, principalmente os do Velho Mundo podem hospedar em seu intestino grosso *Balantidium coli* com perfis moleculares similares, embora suínos domésticos e símios apresentem grandes distâncias filogenéticas e habitacionais. O padrão de transmissibilidade para outros animais e seu perfil patogênico ainda permanece sem resposta, principalmente quanto ao seu potencial de transmissão zoonótico, onde tais animais seriam então, realmente reservatório da parasitose para os humanos. Este estudo continuará, em uma linha de pesquisa agora aberta, para poder fomentar e tentar esclarecer dúvidas quanto a este ciliado, que apesar de ser chamado de raro, ainda leva ao óbito humano e outros animais.

7 CONCLUSÕES

- *Balantidium coli* foi o parasito mais detectado em amostras fecais de suínos tanto em granjas familiares quanto em produções do tipo industrial;
- *Balantidium coli* foi o parasito mais frequente nos primatas não humanos do Cecal, destacando *Macaca* sp.. A frequência deste protozoário foi baixa nos primatas não humanos neotropicais, tendo sido exclusivamente detectado em *Cebus* sp. e *Leontopithecus* sp.;
- Não foram evidenciadas formas evolutivas de *Balantidium coli* nas amostras fecais dos manipuladores de suínos e primatas não humanos;
- O exame direto foi a técnica que mais detectou cistos de *Balantidium coli* seguido pela sedimentação de Lutz e de Ritchie modificada por Young et al.;
- As técnicas de flutuação, Faust et al. e Sheather modificada por Huber et al. apresentaram baixo desempenho na detecção dos cistos desse protozoário;
- Foi padronizado o isolamento e manutenção de *Balantidium coli* em meio Pavlova modificado por Jones em amostras fecais de suínos e primatas não humanos do Velho Mundo;
- TYSGM-9 demonstrou ser o meio mais adequado para estudos que necessitam de massa parasitária rápida de *Balantidium coli*;
- O meio Pavlova modificado demonstrou ser mais adequado para manutenção *in vitro* de *Balantidium coli* por garantir a manutenção das cepas em tempo adequado para subcultivos e também devido a seu baixo custo;
- Os isolados analisados dos suínos e primatas não humanos cativos no município do Rio de Janeiro foram confirmadas por meio de estudos moleculares como *Balantidium coli*;

- Todos os isolados em cultivo e as amostras fecais analisadas produziram fragmentos gênicos do tipo A0, o mesmo tipo de variante da cepa humana que consta no Genbank;
- Morfologia e ultraestrutura típica de *Balantidium coli* foi observada tanto nas cepas de isoladas de suíno, quanto de *Cynomolgus*;
- Organelas e estruturas pela primeira vez descritas, como hidrogenossomos e padrão microtubular foram descritas pela primeira vez em trofozoítos de *Balantidium coli* pela microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica.q'

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar aspectos epidemiológicos de *Balantidium coli* em hospedeiros não humanos, destacando suídeos e primatas neotropicais cativos em diferentes centros de criação e também em vida livre;
- Estudar aspectos epidemiológicos de *Balantidium coli* em escolares de zonas rurais, destacando aqueles que tem maior contato físico com animais reservatórios do ciliado;
- Aperfeiçoar protocolos de isolamento e manutenção de *Balantidium coli* que permitam a viabilidade do protozoário com tempos de repasses mais prolongados;
- Desenhar e viabilizar protocolos de axenização e criopreservação de cepas do protozoário;
- Aprofundar pesquisas morfológicas e ultraestruturais associadas a citoquímica, que auxiliem a identificação e a confirmação de organelas;
- Realizar estudos morfotintoriais, para avaliar as características de impregnação de corantes utilizados rotineiramente em baterias de coloração permanente de protozoários;
- Pesquisar novos marcadores para alvos moleculares que permitam melhor caracterização taxonômica do parasito;
- Realizar estudos clínicos nos animais parasitados com *Balantidium coli*, principalmente nos suínos e primatas não humanos, visando correlacionar manifestações clínicas compatíveis com a presença do ciliado;
- Desenhar protocolos de infecção experimental, objetivando ampliar o conhecimento quanto a patogenia, manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento;

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Anderson RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lewis CE, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Møestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA; Shearer CA; Smirnov AV; Spiegel FW, Taylor MFJR. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005; 52(5):399–451.

Aguiar PC. Aspectos epidemiológicos das parasitoses gastrintestinais de suínos naturalizados de criações familiares do Distrito Federal. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Universidade Federal de Brasília, Brasília, DF. 100p. 2009.

Amin OM. Pathogenic micro-organisms and helminths in sewage products, Arabian Gulf, country of Bahrain. *Am J Public Health.* 1988; 78:314-315.

Anargyrou K, Petrikos GL, Suller TEM, Skiada A, Siakantaris MR, Osuntoyinbo RT, Pangalis G, Vaiopoulos G. Pulmonary *Balantidium coli* infection in leukemic patient. *Am J Hematol.* 2003; 73:314-315.

Angonesi OS, Almeida-Silva B, Mendes SL, Pyrrho AS. Endoparasitos em Muriquis do Norte, *Brachytelles hypoxanthus*, isolados em pequeno fragmento de mata Atlântica. *Neotrop Primates.* 2009; 16:15–8.

Antunes RC, Carraza LG, Sant´ana DS, Oliveira MT, Carraza TG. Prevalência de parasitos gastrintestinais em leitões de terminação relacionada com densidade de alojamento e sexo. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia (PUBVET).* 2001; 5(5):1020, 2011.

Areán VM, Koppisch E. Balantidiasis. A review and report of cases. *Am J Pathol.* 1956; 22 (6):1089 – 1115.

Auerbach E. The study of *Balantidium coli* (Stein, 1863) in relation to cytology and behavior in culture. *J Morphol.* 1953; 93:405- 445.

Awakian A. Studies on the intestinal protozoa of rats. II. Rats as carriers of *Balantidium*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1937; 31:93-98.

Barrett HP, Yarbrough N. A method for the cultivation of *Balantidium coli*. *Am J Trop Med.* 1921; 1:161-165.

Baskerville L, Ahmed Y, Ramchand S. *Balantidium colitis*. Diges Dis.1970; 15(8):727 – 731.

Basset D, Gaumerais H, Basset-Pougnet A. Parasitoses intestinales infantiles dans une collectivité indienne de l'Altiplano Bolivien. Bull Soc Pathol Exot.1986; 79: 237–246.

Beasley JW, Walzer PD. Ineffectiveness of metronidazole in treatment of *Balantidium coli* infections. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1972; 66: 519.

Bellanger A-P, Scherer E, Cazorla A, Grenouillet F. Dysenteric syndrome due to *Balantidium coli*: a case report. New Microbiol. 2013; 36:203-205.

Bernhart SH, Hofacker IL, Will S, Gruber AR, Stadler PF. RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. BMC Bioinformatics. 2008;9:474.

Bilal CQ, Khan MS, Avais M, Ijaz M, Khan JA. Prevalence and chemotherapy of *Balantidium coli* in cattle in the River Ravi region, Lahore (Pakistan). Vet Parasitol. 2009; 163:15 – 17.

Boeck WC, Drbohlav J. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am J Hyg 1925;5:371:407.

Bonett LP, Monticelli CJ. Suínos: o produtor pergunta, a Embrapa responde; 2ª Ed. Brasília: Embrapa-SPI, 1998.

Borchardt KA., Smith RF. An evaluation of an InPouch TV culture method for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. Genitourin. Med. 1991; 67:149–152.

Borda CE, Rea MJF, Rosa RJ, Maidana C. Intestinal parasitism in San Cayetano, Corrientes, Argentina. Bulletin of PHAO. 1996;30 (3): 227 – 232.

Bornay-Linares FJ, Navarro – Martínez L, García – Orenes F, Araez H, Pérez – Murcia MD, Moral R. Detection of intestinal parasites in pig slurry: A preliminary study from five farms in Spain. Livest Sci. 2006; 102:237-242.

Brito GG, Santos TB, Melo CM, Jeraldo VLS. Ocorrência de enteroparasitas em amostras fecais de suínos do município de Simão Dias – SE. Cadernos de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde. 2012;1(15);11-18.

Cancrini G, Bartoloni A, Paradisi F, Nuñez LE. Parasitological observations on three Bolivian localities including rural communities, cities and institutions. Ann Trop Med Parasitol 1989; 83: 591–594.

Carneri I. Isolation of *Balantidium coli* in culture and study of the speed of action of metronidazole and nitrimidazine. Rev Inst Med Trop São Paulo 1972; 14:321-325.

Carlos SM, Hilda MC. Balantidiasis presentación de um caso clínico. Revista Médica de la Universidad de Costa Rica. 2011; 5 (1):58-62

Castillo KES. Identificación de *Balantidium coli* en personas dedicadas a la porcicultura en el cantón balsas durante septiembre 2012 a febrero 2013 [Monografía]. Ecuador. Universidad Nacional de Loja; 2013.

Cermeño JR, Hernández CI, Uzcátegui O, Páez J, Rivera M, Baliachi N. *Balantidium coli* in an HIV-infected patient with chronic diarrhoea. AIDS. 2003; 17: 941-942.

Cerqueira FL. Coprotest: Metodologia confiável para exame parasitológico de fezes. Laes. 1988; 51: 5-12

Cheng-Ng R, Mindiola R, Villarroel F, Dorfman S, Días-Suarez O, Atencio R. Balantidiasis en una niña indígena de la Sierra de Perijá-Venezuela. Reporte de un caso. Kasmera. 2006; 34 (2):127-132.

Cho HS, Shin SS, Park NY. Balantidiasis in the gastric lymph nodes of Barbary sheep (*Ammostragus lervia*): an incidental finding. J Vet Sci. 2006;7(2):207-209.

Clark GC, Diamond SL. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. Clin Microbiol Rev. 2002; 15, 329-341.

Clyti E, Aznar C, Couppie P, Guedj M El, Carme B, Pradinaud R. Un cãs de co-infection para *Balantidium coli* et VIH em Guyane Française. Bull Soc Path Ex. 1998; 91(4):309-311.

Coimbra Jr CEA, Santos RV. Parasitismo intestinal entre o grupo indígena Zoró, Estado do Mato Grosso, Brasil. Cad Saúde Pública. 1991; 7 (1): 100-103.

Córdon GP, Prados AH, Romero D, Moreno MS, Pontes A, Osuna A, Rosales MJ. Intestinal parasitism in the animals of the zoological garden "Pena Escrita" (Almuñecar, Spain). Vet Parasitol. 2008; 156:302–9.

Coutinho GGPL, Cimerman S, Bertelli ECP, Lima RCL, Lima MIB, Lobato SML. Balantidiose em lactente. Rev Bras Med. 2004; 49:115 – 118.

Cox FEG. The cultivation of *Balantidium coli* throughout its viable temperature range. Ann Trop Med Parasitol. 1961; 55, 305-308.

Cunha AM, Muniz J. Conjugation and Endomixis in ciliates of the genus *Balantidium*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1937; 32, 75-93.

Da Silva AS, Zanette RA, Monteiro SG. Parasitismo por *Balantidium coli* em nutria (*Myocastor coypus*) no município de Santa Maria, RS – Brasil. Estud Biol. 2007; 29 (68/69):341 – 343.

De Rijk P, Wuyts J, De Wachter R. RnaViz2: an improved representation of RNA secondary structure. Bioinformatics. 2003; 19:299–300.

Dhawan S, Deepali J, Mehta VS. *Balantidium coli*: na unrecognized cause vertebral osteomyelitis and myelopathy. J Neurosurg Spine. 2013; 18:310-313.

Diamond LS. A comparative study of 28 culture media for *Trichomonas gallinae*. Experiment Parasitol. 1953; 3(3):251–258.

Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae. J Parasitol. 1968; 54:1047– 1056.

Diamond LS. A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen dwelling protozoa. J Parasitol. 1982; 958 – 959.

Dobell C, O'Connor FW. The intestinal Protozoa of man., William Wood and CO. New York,1921.

Dobell C, Laidlaw PP. On the cultivation of *Entamoeba histolytica*. and some other entozoic amebae. Parasitol. 1926; 18:283-318.

Dolkart RE, Halpern B. A new monophasic medium for the cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg. 1958; 7:595-596.

Dorfman S, Rangel O, Bravo LG. Balantidiasis: report of a fatal case with appendicular and pulmonary involvement. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1984; 78: 833 – 834.

Dougherty EC. Introduction to axenic cultivation of invertebrate metazoa: a goal. Ann N Y Acad Sci. 1959; 77:27–54.

Dzbenksi TH. Immuno-fluorescent studies on *Balantidium coli*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1966; 60:387-389.

Ederli NB, Oliveira FCR. *Balantidium* sp. in Ostriches (*Struthio camelus* L., 1758) in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2008; 17(1):327-330.

- Elliot GB, Hotson RT. Balantidial dysentery. *Canad MAJ*. 1953; 69: 317 – 318.
- Esteban JG, Aguirre C, Angles R, Ash LR, Mas-Coma S. Balantidiasis in Aymara children from northern Bolivian altiplano. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59:922-927.
- Faust EC, D'antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie JE, Walker JH. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *Am J Trop Med*. 1938; 18:169-183.
- Ferry T, Bouhour D, De Monbrison F, Laurent F, Domouchel-Champagne H, Picot S, Piens MA, Granier P. Severe peritonitis due to *Balantidium coli* acquired in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23:393-395.
- Figueiredo SM, Filippis T, Santos UMP, Caixeta SS, Rocha JFS, Guimarães MMM. Report on a Balantidiasis case in a person living with HIV/AIDS (PLWHA). *Patol Trop*. 2012; 41(4):505-509.
- Freitas MFL, Oliveira JB, Cavalcanti MDB, Leite AS, Magalhães VS, Oliveira RA, Sobrino AE. Parasitos gastrointestinales de aves silvestres en cautiverio en el estado de Pernambuco, Brasil. *Parasitol Latinoam*. 2002; 57:50 – 54.
- Garcia - Laverde A, Bonilla L. Clinical Trials with metronidazole in human Balantidiasis. *Am J Trop Med Hyg*. 24 (5): 781 – 783, 1975.
- Geddes, McC. A. Balantidiasis in South Persia. *Br. Med. J*. 1952, 1:629-631.
- Giacometti A, Cirioni O, Balducci M, Drenaggi D, Quarta M, De Federicis M, Ruggeri P, Colapinto D, Ripani G, Scalize G. Epidemiologic features of intestinal parasitic infections in Italian mental institutions. *Eur J Epidemiol*. 1997; 13:825-830.
- Gomes AIJG. Contribuição para a caracterização do parasitismo gastrintestinal e pulmonar em suínos de raça alentejana do Distrito de Évora. Dissertação – Mestrado em Medicina Veterinária, UTL, p. 123, 2009.
- Ghosh, E (a). On a new ciliate, *Balantidium ovatum* sp. nov., an intestinal parasite in the common cockroach (*Blatta americana*). *Parasitol*. 1922; 14:371.
- Ghosh, E (b). On a new ciliate, *Balantidium blattarum* sp. nov., an intestinal parasite in the common cockroach (*Blatta americana*). *Parasitol*. 1922; 14:15-16.
- Grim JN, Buonanno F. A re-description of the ciliate genus and type species *Balantidium entozoon*. *Eur J Protistol*. 2009; 45:174-182.

Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. The Vienna RNA Website. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(2):W70–W74.

Gurski DR, Lee JJ, Pierce S. Isolation of *Balantidium* sp. from the Blue tongued skink (*Tiliqua nigrolutea*) in axenic culture. *J Protozool.* 1962; (8): 11p.

Guzmán CR, Nessi AP, Gonzáles OH, Hernández MO, Galindo M. *Balantidium* spp. en cerdos y sus criadores: Prevalencia em comunidades de dos Estados de Venezuela. *VITAE.* 2013; 54: 1-10.

Hassell JM, Blake DP, Cranfield MR, Ramer J, Hogan JN, Noheli JB, Waters M, Hermosilla C. Occurrence and molecular analysis of *Balantidium coli* in mountain gorilla (*Gorilla beringei beringei*) in the Volcanoes national Park, Rwanda. *J Wildl Dis.* 2013; 49 (4):1063-1065.

Headley SA, Kummala E, Sukura A. *Balantidium coli* - infection on a Finnish horse. *Vet Parasitol.* 2008; 158:129-132.

Hegner R. Specificity in the genus *Balantidium* based on size and shape of body and macronucleus, with descriptions of six new species. *Am J Hyg.* 1934;19:38–67.

Hernández F, Rivera P. Balantidiasis: Recopilacion de Conceptos. *Rev. Costarric Cienc Med.* 1991;12(3/4):67 – 75.

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol.*1991; 66(4):411-453.

Hinde K. Milk composition varies in relation to the presence and abundance of *Balantidium coli* in the mother in captive Rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am J Primatol* 2007; 69:625-634.

Huber F, Bomfim TC, Gomes RS. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-eter e da técnica de centrifugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2003; 12(2):135-137.

Ismail HAHA, Jeon H, Yu Y, Do C, Lee Y. Intestinal parasite infections in pigs and beef cattle in rural areas of Chungcheongnam-do, Korea. *Korean J Parasitol.* 2010; 48 (4)347 – 349.

Jameson AP. The behavior of *Balantidium coli* Malm. in cultures. *Parasitol.* 1927;19:411-419.

Jha A, Chalise MK, Shrestha RM, Karki K. Intestinal parasitic investigation in temple Rhesus Monkeys of Kathmandu. The initiation. 2011;4: 1–7.

Johnson-Delaney CA. Parasites of captive nonhuman primates. *Vet Clin Exot Anim.* 2009; 12:563–81.

Jones WR. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; Method for Evaluating with the anti-amoebic properties of new compounds. *Ann Trop Med Parasitol.* 1946; 40: 130-140.

Karanis P, Kourenti C Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J water and health.* 2007; 05 (1): 1 - 38.

Kassai T. Nomenclature for parasitic diseases: cohabitation with inconsistency for how long and try?. *Vet Parasitol.* 2006; 138:169 – 170.

Kaur R, Rawat D, Kakkar M, Uppal B, Sharma VK. Intestinal parasites in children with diarrhea in Delhi, India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2002, 33 (4):725 – 729.

Khan A, Khan MS, Avais M, Ijaz M, Ali MM, Abbas T. Prevalence, hematology and treatment of balantidiasis among donkeys in and round Lahore, Pakistan. *Vet Parasitol.* 2013; 196: 203 – 205.

Kheisin EM. The dependence of the rate of pulsation of contractile vacuoles of parasitic ciliates on the living conditions of the host. *Zool Zh.* 1952; 31:72-79.

Kim JCS, Abee CR, Wolf RH. Balantidiosis in a chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Lab Anim.* 1978; 12: 231-233.

Klaas J. Two new gastric mucin cultivation media and a chemically defined maintenance medium for *Balantidium coli*. *J Parasitol.* 1974; 60; 907-910.

Knowles R, Das Gupta BM. Some observations on *Balantidium coli* and *Entamoeba histolytica* of macaques. *Indian M. Gaz.* 1934, 69: 390 – 392.

Koopowitz A, Smith P, Van Rensburg N, Rudman A. *Balantidium coli* – induced pulmonary haemorrhage with iron deficiency. *S Afr Med J.* 2010; 100,(8): 534-36.

Krascheninnikow S, Wenrich DH. Some observations on the morphology and Division of *Balantidium coli* and *Balantidium caviae*. *J Protozool.* 1958; 5 (3):196 – 202.

Krascheninnikow S. Variability in number of kineties in *Balantidium coli*. *J Parasitol.* 1962; 48:492.

Ladas SD, Savva S, Frydas A, Kaloviduris A, Hatzioannou J, Raptis S. Invasive Balantidiasis Presented as Chronic Colitis and lung involvement. Dig Dis Sci. 1989; 34 (10): 1621 – 1623.

Lai M, Zhou RQ, Huang HC, Hu SJ. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasites in pigs in Chongqing, China. Res Vet Sci. 2011; 91:121-124.

Lankester F, Mätz-Rensing K, Kiyang J, Jensen SA, Weiss S, Leendertz FH. Fatal ulcerative colitis in a western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). J Med Primatol. 2008; 37: 297-302.

Lee RV, Prowten AW, Anthone S, Satchidanand SK, Fisher JE, Anthone R. Typhitis due to *Balantidium coli* in captive lowland gorillas. Rev Infect Dis. 1990; 12(6):1052-1059.

Lerman RH, Hall WT, Barret Jr. ON. *Balantidium coli* infection in a Vietnam returnee. Calif Med. 1970; 112(6):17-18.

Levecke B, Dorny P, Geurden T, Vercammen F, Vercruyse J. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. Vet Parasitol. 2007; 148:236–46.

Levine ND. Changes in the dimensions of *Balantidium* from swine upon cultivation. Am J Hyg. 1940; 32, 1-7.

Li M, Wang J, Zhang J, Gu Z, Ling F, Ke X, Gong X. First report of two *Balantidium* species from the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*: *Balantidium sinensis* Nie 1935 and *Balantidium andianensis* sp. Parasitol Res. 2008; 102:605-611.

Lim YAL, Nigui R, Shukri J, Rohela M, Mat Naim HR. Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. Vet Parasitol. 2008; 57:154–9.

Lima LM, Hirschfeld MMP. Cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 from fecal samples. Rev Bras Análises Clínicas. 1996; 28: 179-181.

Limoneu ME, Kilimeioğlu AA, Kurt Ö, Östan I, Özkütük N, Özbilgin A. Two novel serum-free media for the culture of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol Res. 2007; 100:599-602.

Little JL. A case of *Balantidium* dysentery in Canada. Can Med Assoc J. 1931; 25 (6):653 – 657.

Lutz AO. *Schistosomum mansoni* and Schistomatose according to observations made in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1919; 11 (1):121-55.

Lynn DH. Intramacronucleata: Litostomatea – Simple Ciliates but highly derived. In: The Ciliated Protozoa. Springer, New York, p. 187 – 208, 2010.

Machado O, Pinho AL, Silva S. Aspectos parasitológicos na balantidiose humana. O Hospital. 1969; 75: 1969-76.

Maino A, Garigali G, Garnde R, Messa P, Fogazzi GB. Urinary balantidiasis: diagnosis at a glance by urine sediment examination. J Nephrol. 2010; 23: 732 – 737.

Malats N, Calafell F. Basic glossary on genetic epidemiology. J Epidemiol Commun Health. 2003; 57:480–482.

Malan FS, Horak IG, Vos V, Van Wik JA: Wildlife parasites: lessons for parasites control in livestock. Vet Parasitol 1997; 71:137–53.

Malmsten PH. Infusorien als Intestinal-Thiere beim Menschen. Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med. 1857; 12:302–309.

Marti OG, Hale OM. Parasite transmission in confined hogs. Vet Parasitol. 1986; 19:301- 314.

Martínez-Díaz RA, Martella MB, Navarro JL, Ponce-Gordo F. Gastrointestinal parasites in greater rheas (*Rhea americana*) and lesser rheas (*Rhea pennata*) from Argentina. Vet Parasitol. 2013; 194:75-78.

McDonald JD. On *Balantidium coli* and *B. suis* (sp. nov.). Univ Calif Publ Zool 1922; 20:243–246.

Modrý D, Petzelková KJ, Pomajbíková K, Tokiwa T, Krizek J, Imai S, Vallo P, Profousová I, Slapeta J. The occurrence and ape-to-ape transmission of the entodiniomorphid ciliate *Troglodytella abrassarti* in captive gorillas. J Eukaryot Microbiol. 2009; 56:83–87.

Mul IF, Paembonan W, Singleton I, Wich AS, Van Bolhuis HG. Intestinal parasites of free-ranging, semicaptive and captive *Pongo abelii* in Sumatra, Indonesia. Int J Primatol. 2007; 28:407 – 420.

Mundim MJS, Mundim AV, Santos ALQ, Cabral DD, Faria ESM, Moraes FM. Helmintos e protozoários em fezes de javalis (*Sus scrofa scrofa*) criados em cativeiro. Arq Bras Med Vet Zootec. 2004; 56 (6): 792- 795.

Morris RG, Jordan HE, Luce WG, Coburn TC, Maxwell CV. Prevalence of gastrointestinal parasitism in Oklahoma swine. *Am J Vet Res.* 1984; 45:2421–2423.

Munene E, Otsyula M, Mbaabu D, Mutahi WT, Muriuki SMK. Helminth and protozoan gastrointestinal (GIT) parasites in captive and wild-trapped African non human primates. *Vet Parasitol.* 1998; 78:1995–2201.

Nakauchi K. The prevalence of *Balantidium coli* infections in fifty-six mammalian species. *J Vet Med Sci.* 1999; 61: 63-65.

Náquira F, Náquira C, Córdova E, Mori Alberto, Rondón C, Paredes D. Acción in vitro de la paromocina sobre *Balantidium coli*. *Boletín Chileno de Parasitología.* 166; 21:134 – 135.

Nelson EC. An intestinal content cultivation medium: I. Methods of preparation and use and data obtained in the cultivation of *Balantidium coli* from the pig. *Am J Trop Med Hyg.* 1940; 20:731-745.

Nelson EC. Alcoholic extract medium for the diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med.* 1947; 27:545-552.

Neiva A, Marques da Cunha A, Travassos L. Contribuições Parasitológicas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1914; 6:180–191.

Nicolaiewsky S, Wentz I, Costa OAD, Sobestiansky J. Sistema de Produção de Suínos. In: Sobestiansky J, Wentz I, Silveira PRS, Sesti LAC. *Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho.* Brasília: Embrapa-SPI, p. 11-26, 1998.

Nilles-Bije ML, Rivera WL. Ultraestructural and molecular characterization of *Balantidium coli* isolated in the Philippines. *Parasitol Res.* 2010; 106:387 -394.

Nishi AM, Gennari SM, Lisboa MNTS, Silvestrim A, Caproni Jr L, Umehara O. Parasitas intestinais em suínos confinados nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Arq Inst Biol.* 2000; 67:199-203.

Oberhuber G, Karpitschka G, Stolte M. *Balantidium coli*: a rare cause of colonic ulcer. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1993; 5:755-757.

Owen IL. Parasitic zoonoses in Papua New Guinea. *J Helminthol.* 2005; 79:1-14.

Palomino H, Donckaster R. Estudio clínico y epidemiológico de un caso de balantidiasis humana. *Bol Chil Parasitol.* 1971; 26(1):44–45.

Pamo O, Figueiroa M, Ruiz J. Balantidiasis: reporte de cuatro casos y revisión de la casuística de los hospitales de Lima. *Rev Méd Hered.* 1991; 2(4):195 – 197.

Pavlova E.A. Sur les Méthodes de la culture d'*Entamoeba histolytica*. Parazitol Med. 1938; 7: 224-227. (French).

Pinheiro MC, Lima MA. Caso fatal de balantidiase intestinal. Rev Soc Bras Med Trop. 1991; 24:173-176.

Pomajbíková K, Oboromik M, Horák, A. Petrzalková KJ, Grim JN, Levecke B, Todd A, Mulama M, Kiyang J, Modrý D. Novel Insights into the genetic diversity of *Balantidium* and *Balantidium*-like cyst – forming ciliates. Plos Negl Trop Dis. 2013; 7(3):1-10.

Ponce-Gordo F, Jiménez-Ruiz E, Martínez-Díaz RA. Tentative identification of *Balantidium* from ostriches (*Struthio camelus*) as *Balantidium coli*-like by analysis of polymorphic DNA. Vet Parasitol. 2008; 157:41–49.

Ponce Gordo F, Salamaca FF, Martínez D R. Genetic heterogeneity in Internal transcribed spacer genes of *Balantidium coli* (Litostomatea, Ciliophora). Protist. 2011;162:774-794.

Prescott DM. The DNA of ciliated protozoa. Microbiol Rev. 1994; 58:233–267.

Rees CW. Balantidia from pigs and guinea-pigs: Their viability, cyst production and cultivation. Science. 1927; 61:89-91.

Rezende JM. Os sufixos íase e ose nas doenças infecciosas e parasitárias. Rev Patol Trop. 2002;31 (1):138-140.

Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull U S Arm Med Dep. 1948; 8:326.

Rosales DMC, Flores JM, Soto JN. Balantidiasis em niños: Reporte de um caso fatal. Diagnóstico (Perú). 2000; 39 (4): 221-224.

Saborío P, Baizán E, Fatjó L, Willis S. Balantidiasis cronica infantil. Rev Costarric Cienc Méd. 1993; 14 (3/4): 63 – 68.

Santos SM, Nogueira CP, Carvalho AR, Strier KB: Levantamento coproparasitológico em muriqui (*Brachyteles arachnoides hipoxanthus*) da estação biológica de Caratinga, Minas Gerais. A Primatologia no Brasil. 2004; j8:327-32.

Sarcinelli MF, Venturini KS, da Silva, L. C. Produção de suínos – tipo carne. Boletim Técnico. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 11 p., 2007.

Sargeant PG. A divisional form of *Balantidium coli*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1972; 66, 12.

Schumaker E. Relation of *Balantidium coli* infection to diet and intestinal flora of the domestic pig. Am J Hyg. 1930; 13:576.

Schovancová K, Pomajbíková K, Procházka P, Modrý D, Bolechová P, Petrzalová KJ. Preliminary insights into the impact of dietary starch on the ciliate, *Neobalantidium coli*, in captive chimpanzees. Plos one. 2013; 8 (11):1-5.

Schuster FL, Ramirez – Ávila L. Current World Status of *Balantidium coli*. Clin Microbiol Rev. 2008; 21, 626-638.

Seibel PN, Müller T, Dandekar T, Wolf M. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. BMC Res Notes. 2008;1:91.

Sharma S, Harding G. Necrotizing lung infection caused by the protozoan *Balantidium coli*. Can J Infect Dis. 2003; 14:163-166.

Sheather LA. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. J Comp Pathol Ther. 1923;36:266-75.

Silva EF. *Entamoeba histolytica*: isolamento, axenização e caracterização de diferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade “in vivo” e “in vitro”. PhD thesis. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 73 pp. 1997.

Skotarczak B. Deshydrogenase activity in *Balantidium coli*. III. Folia Biol (Kraków). 1984; 32 (1-2):47-50.

Skotarczak B (a). Ultrastructural and Cytochemical identification of peroxisomes in *Balantidium coli*, Ciliophora. Folia biol (Kraków). 1997; 45(3-4): 117 – 120.

Skotarczak B (b). Bacterial flora in acute and symptom-free balantidiosis. Acta Parasitol. 1997; 42 (4): 230 – 233.

Skotarczak B, Zielinski R. A comparison of nucleic acid content in *Balantidium coli* trophozoites form different isolates. Fol Biol (Kraków). 1997; 45 (3-4):121-124.

Skotarczak B (a). Cytochemical identification of mucocysts in *Balantidium coli* trophozoites. Folia biol (Kraków). 1999; 47 (1-2): 61 – 65.

Skotarczak B (b). The formation of primary and secondary lysosomes in *Balantidium coli*, Ciliata. *Folia Histochem Cyto*. 1999; 37 (4):261-265.

Sobestiansky J, Wentz I, Silveira PRS, Sesti LCA, Barcellos DESN, Lopez AC. Limpeza e desinfecção. In: Sobestiansky J, Wentz I, Silveira PRS, Sesti LAC. Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho. Brasília: Embrapa-SPI, p. 111-134, 1998.

Sobestiansky J, Barcellos D, Moraes N, Carvalho LF, Oliveira S. Clínica e Patologia Suína; 2ª Ed. Goiânia: Gráfica Art3, 1999.

Solaymani - Mohammadi S, Rezaian M, Hooshyar H, Mowlavi GR, Babaei Z, Anwar MA. Intestinal Protozoa in wild boars (*Sus scrofa*) in western Iran. *J Wildl Dis*. 2004; 40 (4): 801-803.

Solaymani-Mohammadi S, Rezaian M, Anwar MA. Human balantidiasis in Iran: an unresolved enigma ? *Trends in Parasitol*. 2005; 21(4):160-161.

Solaymani - Mohammadi S, Petri Jr WA. Zoonotic implications of the swine Transmitted-protozoal infections. *Vet Parasitol*. 2006; 140:189-203.

Steffen RPB, Soares KD, Colvero LP, Garcia RG, Sangioni LA. Prevalência de *Balantidium coli* nas fezes de suínos na fase de terminação em abatedouro. *Revista Agrarian*. 2010; 3(10): 301-304, 2010.

Svensson R. On the resistance to heating and cooling of *Balantidium coli* in culture and some observations regarding conjugation. *Exp. Parasitol*. 1955; 4:502-525.

Sumukhi U. *Balantidium coli* on urine microscopy. *Natl Med J*. 2007;20(5) 270.

Tatfeng YM, Usuanlele MU, Orukpe A, Digban AK, Okodua M, Oviasogie F, Turau AA. Mechanical transmission of pathogenic organisms: the role of cockroaches. *J Vector Borne Dis*. 2005; 42:129-134.

Tajik J, Fard SRN, Paidar A, Anousheh S, Dehghani E. Balantidiasis in a dromedarian camel. *Asian Pac J Trop Dis*. 2013; 3(5):409-412.

Tayib OA, Abdoun KA. *Balantidium coli* infection in Hamadryas Baboon in Saudi Arabia: a Case Report. *J Anim Plant Sci*. 2013; 23:940–3.

Toft JD. The pathoparasitology of the alimentary tract and pancreas of nonhuman primates: a review. *Vet Pathol*. 1982;9: 44-85.

Tempelis CH, Lysenko MG. The production of hyaluroidase by *Balantidium coli*. Exp. Parasitol. 1957;6, 31-36.

Uysal HK, Boral O, Metiner K, Ilgaz A. Investigation of intestinal parasites in pigs feces that are also human pathogens. Turkey Parasitol. 2009; 33 (2):218 -221.

Van Hoek AHAM, Akhmanova AS, Huynen MA, Hackstein HP. A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. Mol Biol Evol. 2000; 17 (1) 202-206.

Vasconcelos JC. Bactérias enteropatogênicas de diarreia infantil aguda em Tucuruí, Pará. Acta Amaz. 1981; 11(3): 527 – 535.

Vasilakopoulou A, Dimarongona K, Samakovli A, Papadimitris K, Avlami A. *Balantidium coli* pneumonia in an immunocompromised patient. Sacnd J Infect Dis. 2003; 5(2): 144 – 146.

Vásquez W, Vidal J. Colitis balantidiasica: a proposito de un caso fatal en el departamento de Huancavelica. An Fac Med. 1999; 60:119-123.

Walker EJ. Experimental balantidiasis. Philippine J Sc. 1913; s. B, 8, 333 – 349.

Walzer PD, Judson FN, Murphy KB, Healy GR, English DK, Schultz MG. Balantidiasis outbreak in Truk. Am J Trop Med Hyg. 1973; 22:33-41.

Wenger F. Absceso hepático producido por el *Balantidium coli*. Kasmera. 1967; 2: 433–441.

Weng YB, Hu YJ, Li Y, Li BS, Lin RQ, Xie DH, Gasser RB, Zhu XQ. Survey of intestinal parasites in pigs from intensive farms in Guangdong Province, People's Republic of China. Vet Parasitol. 2005; 127:333-336.

Woody NC, Woody HB. Balantidiasis in infancy: Review of the literature and report of a case. J Pediatrics. 1960; 56(4):485-489.

Wright A-DG. Analysis of intraspecific sequence variation among eight isolates of the rumen symbiont, *Isotricha prostoma* (Ciliophora), from two continents. J Eukaryot Microbiol. 1999; 46:445–446.

Yang Y, Zeng Li, Mingkun Li, Zhou J. Diarrhoea in piglets and monkey experimentally infected with *Balantidium coli* isolated from human faeces. J Trop Med Hyg. 1995; 98: 69 – 72.

Yazar S, Altuntas F, Sahin I, Atambay M. Dysentery caused by *Balantidium coli* in a patient with non-Hodgkin's lymphoma from Turkey. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(3):458:459.

Young MD. Attempts to transmit human *Balantidium coli*. *Am J Trop Med*. 1950; 30:71 – 72.

Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol*. 1979; 10(6):852-3.

Yu M, Kin TH. A good culture medium for *Endamoeba*, *Balantidium* and *Trichomonas*. *Sing Med J*. 1970; 11(1):55-56.

Zaman V. Studies on the immobilization reaction in the genus *Balantidium*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1964; 58, 255-259.

Zaman V. Activity of contractile vacuole in the parasite ciliate, *Balantidium coli*. *Experientia*. 1970; 26 (7):806- 807.

Zaman V. *Balantidium coli*. In: Kreier JP (Ed). *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, p. 633-653; 1978.

ANEXOS

ANEXO 1.

PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – Fiocruz/IOC AO PROJETO



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS-CEP FIOCRUZ-IOC

Rio de Janeiro, 18 de junho de 2012.

PARECER APROVADO

Título do Projeto: “**Estudo de *Balantidium sp.* isolados de suínos (*Suis scrofa*), primatas não humanos cativos e humanos do estado do Rio de Janeiro, Brasil**”.

Registro do Projeto no CEP Fiocruz-IOC: **648/12**

Pesquisador (a) Responsável: Maria Regina Amendoeira.

Instituição: IOC/ Laboratório de Toxoplasmose.

ANEXO 2.

PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA FIOCRUZ AO PROJETO

| | | |
|---|---|---|
|  <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência</p> |  <p>Octavio A. F. Presgrave Coordenador CEUA/FIOCRUZ SIAPE 04626550</p> |  <p>CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais</p> |
| LICENÇA | | LW-57/12 |
| <p>Certificamos que o protocolo (P-79/11-2), intitulado "Estudo de <i>Balantidium</i> sp. Isolados em suínos (<i>Suis scrofa</i>) e primatas não humanos cativos no Estado Rio de Janeiro, Brasil", sob a responsabilidade de MARIA REGINA REIS AMENDOEIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p> | | |

ANEXO 3.

PARECER DE APROVAÇÃO DO IBAMA (SISBIO) NO USO DE ANIMAIS DA FAUNA BRASILEIRA

| | |
|---|---|
|  | Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO |
| Autorização para atividades com finalidade científica | |
| Número: 31900-1 | Data da Emissão: 19/12/2011 18:41 |
| Dados do titular | |
| Nome: Alynne da Silva Barbosa | CPF: 095.101.537-02 |
| Título do Projeto: Estudo de Balantidium sp. isolados em suínos (Suis scrofa) e primatas não humanos cativos no Estado Rio de Janeiro, Brasil | |
| Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ | CNPJ: 33.781.055/0001-35 |

ANEXO 4. Principais características de manejo das granjas familiares e tecnificada estudadas do Estado do Rio de Janeiro.

| Características das granjas | Rio Bonito | Araruama | Saquarema | Maricá | Itaboraí | Casimiro de Abreu | Silva Jardim | Petrópolis | Itaperuna |
|---|---|---|---|--------------------------------------|---|---|---|--|--|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
| Tipo de produtor | Familiar | Familiar | Familiar | Familiar | Familiar | Familiar | Familiar | Industrial | Industrial |
| Sistema de produção | Semi-intensivo | Extensivo | Semi-intensivo | Semi-intensivo | Semi-intensivo | Semi-intensivo | Semi-intensivo | Intensivo | Intensivo |
| Instalações | Baias coletivas com parede de cimento e cobertura | Amarrados individualmente na árvore ao ar livre | Baias coletivas com parede de cimento e cobertura | Piquetes com cerca de madeira | Baias coletivas com parede de cimento e cobertura | Baias coletivas com parede de cimento e cobertura | Baias coletivas com parede de cimento e cobertura | Salas divididas categorias | Salas divididas categorias |
| Tipo de piso | Cimentado | Solo desnudo | Cimentado | Solo desnudo | Cimentado | Cimentado | Cimentado | Cimentado | Cimentado |
| Lâmina d'água | Não | Não | Não | Não | Não | Sim | Não | Sim: terminação | Sim: terminação |
| Alimentação | Restos de alimentos de restaurantes | Restos de alimentos de feiras livres | Milho picado e verduras e legumes | Restos de alimentos de feiras livres | Restos de alimentos de feiras livres, frutas como cajá. | Milho, ração e restos de verduras e legumes | Milho e restos de verduras e legumes | Ração feita dentro da própria propriedade | Ração feita dentro da própria propriedade |
| Vermifugação | Esporádica somente quando há animais doentes | Não realiza | Não realiza | Não realiza | Não realiza | Não realiza | Não realiza | Rotineira Gestante - Ivermectina injetável a 1% Terminação - oxibendazole misturado na ração | Rotineira Gestante - Ivermectina injetável a 1% Terminação - oxibendazole misturado na ração |
| Raça/Linhagem | Mestiço de Landrace | Mestiço de Piau | Mestiço de Landrace | Mestiço de Landrace | Mestiço de Landrace | Mestiço de Landrace e Large white | Mestiço de Landrace | Linhagem TOPIG Brasil | Linhagem Agrocerec |
| Retirada de excretas | Manual | Cobre com terra no local | Manual | Cobre com terra no local | Manual | Manual | Manual | Caneletas para escoamento das fezes e manual | Caneletas para escoamento das fezes e manual |
| Higiene das instalações | Insatisfatória | Insatisfatória | Satisfatória | Insatisfatória | Insatisfatória | Satisfatória | Insatisfatória | Satisfatória | Satisfatória |
| Origem da água | Poço | Poço | Poço | Poço e água da rede pública | Poço | Poço e água da rede pública | Poço | Água da rede pública | Água da rede pública |
| Presença de outros animais nas instalações | Cães, gatos, galinhas, cabra e patos | Cães, bovinos, cabras, pato e ganso. | Não | Não | Não | Não | Não | Gatos | Não |
| Quarentena | Não | Não | Não | Não | Não | Não | Não | Sim | Sim |

ANEXO 5.

Artigo aceito pela revista Pesquisa Veterinária Brasileira

01/09/2015

Gmail - RES: Trabalho 4090 LD

Prezada Dra. Alynne S. Barbosa,

Informo que o [Trabalho 4090 LD](#) intitulado de “**Gastrointestinal parasites of swine raised in different management systems in the State of Rio de Janeiro, Brazil**”, de autoria sua e de Otilio M.P. Bastos, Laís V. Dib, Mayara P. de Siqueira, Matheus L. Cardozo, Luiz Claudio Ferreira, William T. Chaves, Ana Beatriz M. Fonseca, Claudia M.A. Uchôa e Maria Regina R. Amendoeira, submetido para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira, foi aceito para publicação.

Atenciosamente,

Jürgen Döbereiner

Editor Pesq. Vet. Bras.

ORIGINAL ARTICLE

***Balantidium coli* and other gastrointestinal parasites in captives non-human primates of the Rio de Janeiro, Brazil**

Alynnne da Silva Barbosa¹, Alcides Pissinatti², Laís Verdan Dib³, Mayara Perlingeiro de Siqueira³, Matheus Lessa Cardozo³, Ana Beatriz Monteiro Fonseca⁴, Anderson de Barros Oliveira⁵, Fábio Alves da Silva⁵, Claudia M. Antunes Uchôa³, Otilio Machado Pereira Bastos³ & Maria Regina Reis Amendoeira¹

1 Toxoplasmosis Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, Rio de Janeiro), Oswaldo Cruz Institute, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

2 Primate Center of Rio de Janeiro – CPRJ/INEA, RJ, Paraíso, Guapimirim, Rio de Janeiro, Brazil

3 Department of Microbiology and Parasitology, Subject of Parasitology, Biomedical Institute, Federal Fluminense University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

4 Laboratory of Statistics, Department of Statistics, Federal Fluminense University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

5 Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, Rio de Janeiro), Building Service Non-human primates (CECAL), Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

Keywords

helminths – new world primates – old world primates – parasitological diagnosis – protozoans

Correspondence

Alynnne da Silva Barbosa, Toxoplasmosis Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, Rio de Janeiro), Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Building 108, sala 32/34, Brazil Avenue, 4365, Manguinhos, RJ, 21045900, Brazil.
Tel.: 55 (21) 2562-1844;
fax: 55 (21) 2629-2426;
e-mails: alynnne.barbosa@ioc.fiocruz.br; alynnedsb@gmail.com

Accepted July 30, 2014.

Abstract

Background Parasites are agents of diarrhea in captive non-human primates (NHP). To broaden information about those etiological agents in captive animals in Brazil, gastrointestinal parasites in captive NHP were researched in nurturing Centers of Rio de Janeiro State.

Methods Fecal samples were collected from primates, of which 960 came from the Research Center (Cecal/Fiocruz) and 155 from the Primate Center (CPRJ/Inea). The study involved species of the New World (NW) primates and of the Old World (OW).

Results The estimated prevalence was 56.7%, of which 91.3% presented protozoans and 7.4% presented helminths. Statistical difference between the nurturing centers occurred in the overall value of parasitosis and in the isolated frequency of *Balantidium coli* and *Entamoeba* sp., especially in the samples of OW primates living in Cecal.

Conclusions These results demonstrated the need for implements of sanitation programs in the sites for captive primates nurturing.

Introduction

Several species of non-human primates can be raised in captivity, such as the ones of the New World (NW) and Old World (OW). Such animals can be found in breeding centers focused on biomedical research, zoos, nurturing centers for conservation of species, and residences kept as pets [9].

Apes in captivity can present several health issues such as infections by protozoans and helminths [39]. Generally, when these animals are kept captive for a long time, their parasitological fauna can be altered, presenting evolutionary forms that can also be found in the human being [9, 18]. Due to the phylogenetic

proximity, macaques and humans are susceptible to infections by many parasites of the same species, determining zoonotic transmission cycles [18, 24]. Among the parasites with this transmission potential, diagnosed in non-human primates, the high prevalence of *Balantidium coli* stands out; this has been evidenced in many species of macaques [22]. These animals are pointed as reservoirs for the protozoan [29].

Under natural conditions, high parasite load infections are unusual, while animals in captivity are subjected to stress that may weaken their immune system, becoming more susceptible to parasitosis [15]. Overpopulation, low hygiene standards, and malnutrition are important factors that can contribute to the development

of parasites in primates in captivity [15, 20, 27]. For animals living in these conditions, symptomatic parasitic infections of the gastrointestinal tract usually determine a clinical picture of watery diarrhea, hemorrhage, and dysentery; extraintestinal pathologies, such as kidney abscess; and even death [11]. The importance of parasitological diagnosis of captive primates, to enable sanitation monitoring of the clusters and decrease the risk of transmission of the parasites to the handlers of those animals [2].

Although there are various studies about gastrointestinal parasitosis in simians, there are few reports about it in captive primates and neotropical species [11, 18, 39]. Most studies are directed to great apes [10, 20, 26], to the catarrhini [8, 16, 23], to neotropical species living in the wild [1, 3, 28, 32], and to animals confined in zoological gardens [4, 11, 13]. In this context, this study aimed to evaluate the estimated prevalence of gastrointestinal parasites of captive non-human primates of two breeding centers, one for public health research and the other for species conservation, both located in Rio de Janeiro State, correlating the positivity of parasitosis, as well as the frequency of *Balantidium coli* trophozoites, among the various species of those animals.

Materials and methods

Ethical considerations

This study has received assent by the Ethics Committee on Animal (CEUA-Fiocruz), license number LW57/12, protocol number P 79/11-2 and maintains its annual license updated at SISBIO – IBAMA, under the protocol number 31900-2.

Study site

This study was conducted at two non-human primates breeding centers in Rio de Janeiro, Brazil. One is the Laboratory Animals Breeding Center (Cecal) located in Manguinhos, in the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz). At this site, animals are kept in captivity for researching diseases that can affect public health, such as malaria and others. The other site was the Primate Center in Rio de Janeiro (CPRJ/INEA), located in the town of Guapimirim, geographically located between parallels 22° 27' 22" S and the meridians 42° 50' and 42° 56' W. The main purpose of this institution is to develop research on the biology of neotropical non-human primates and their habitat to promote conservation efforts, as all of the apes in CPRJ are somehow endangered.

The Cecal has four species of non-human primates, two of them of the OW of the *Macaca* genus and two of

the NW that belong to the *Saimiri* genus. The CPRJ houses several species of primates of the NW of the genera *Cebuella*, *Callithrix*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callimico*, *Aotus*, *Callicebus*, *Saimiri*, *Cebus*, *Pithecia*, *Chryroptes*, *Cacajao*, *Alouatta*, *Ateles*, and *Brachyteles* (Table 1). At both institutions, the macaques are housed in a family-like environment, and in CPRJ, some species remain in individual enclosures. The Cecal breeding center has three large facilities located in different places. In general, the enclosures have indoor areas and outdoor areas, cemented floor and tree trunks for environmental enrichment. The CPRJ is located near the Atlantic Rainforest; its enclosures are arranged in a natural environment, surrounded by the forest. It has four rooms divided into sectors. The enclosures are provided with tree trunks and the ground covered with dried leaves. In both institutions, public visitation is not allowed, there is a cleaning routine, food is placed in containers daily, and the macaques are routinely subjected to antiparasitic treatment at least once a year.

Fecal samples

From August 2012 to January 2014, 1115 fecal samples were collected from non-human primates, of which 960 from Cecal and 155 from CPRJ. The fecal samples were picked up from the ground to prevent animals from the consequent stress of handling. The samples were standardized according to each study site. At Cecal, there are a great number of animals but small variety of species. In this place, one sample was collected from each animal. The number of samples was equal to the number of animals in each enclosure.

Yet, in CPRJ, there is a great variety of species but fewer animals than in Cecal. Most macaques belong to the genera *Mico*, *Saguinus*, *Callithrix*, and *Leontopithecus*, which are small primates that defecate small volumes of feces. To obtain a bigger sample size, and thus ensure good quality of performances of the laboratorial techniques, the material of each enclosure was collected in triplicates (three consecutive days). The triplicates were considered a single sample (pool sample). At the end, at least one pool sample was collected from each enclosure.

For all sample collections, it was given preference to fresh fecal material, which was placed in plastic containers of 80 ml each, without chemical preservatives and thereafter packed in isothermal containers.

Laboratorial techniques

A portion of the material was immediately processed by direct examination with buffered saline solution to identify the presence of *Balantidium coli* trophozoites.

Table 1 Non-human primates species, number of enclosures, and total number of fecal samples collected from captive animals of two nurturing centers of Rio de Janeiro, Brazil

| Non-human primates | | Number of enclosures | Total number of animals | Number of samples collected |
|---|--|----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Scientific name | Common name | | | |
| Cecal | | | | |
| <i>Saimiri sciureus</i> | Common Squirrel Monkey | 22 | 285 | 285 |
| <i>Saimiri ustus</i> | Bare-eared squirrel monkey | 2 | 11 | 11 |
| <i>Macaca fascicularis</i> | Cynomolgus macaque | 8 | 85 | 85 |
| <i>Macaca mulatta</i> | Rhesus macaque | 19 | 579 | 579 |
| CPRJ* | | | | |
| <i>Cebuella pygmaea</i> | Pygmy marmoset | 1 | 3 | 1 |
| <i>Callithrix aurita</i> | Buffy-tufted marmoset | 2 | 4 | 2 |
| <i>Callithrix jacchus</i> | White-tufted-ear Marmoset | 2 | 4 | 2 |
| <i>Callithrix penicillata</i> | Black-tufted marmoset | 2 | 3 | 4 |
| <i>Callithrix geoffroyi</i> | White-headed marmoset | 2 | 3 | 2 |
| <i>Callithrix Híbrido</i> | - | 7 | 12 | 9 |
| <i>Calibella humilis</i> | Black-crowned Dwarf Marmoset | 1 | 1 | 1 |
| <i>Mico chrysoleucus</i> | Gold-and-white marmoset | 1 | 1 | 2 |
| <i>Mico humeralifer</i> | Santarem marmoset | 2 | 7 | 2 |
| <i>Mico melanurus</i> | Black-tailed marmoset | 1 | 2 | 1 |
| <i>Mico saterei</i> | Sateré Marmoset | 1 | 1 | 1 |
| <i>Saguinus bicolor</i> | Pied tamarin | 4 | 11 | 5 |
| <i>Saguinus midas</i> | Red-handed tamarin | 3 | 11 | 3 |
| <i>Saguinus niger</i> | Black-handed Tamarin | 4 | 8 | 4 |
| <i>Saguinus ochraceus</i> | Ochraceous Bare-face Tamarin | 1 | 1 | 1 |
| <i>Saguinus martinsi</i> | Martin's Tamarin | 2 | 2 | 2 |
| <i>Saguinus Híbrido</i> | - | 2 | 1 | 2 |
| <i>Leontopithecus chrysomelas</i> | Golden-headed lion tamarin | 37 | 73 | 39 |
| <i>Leontopithecus chrysopygus</i> | Black lion tamarin | 9 | 19 | 9 |
| <i>Leontopithecus rosalia</i> | Golden lion tamarin | 2 | 8 | 2 |
| <i>Leontopithecus Híbrido</i> | - | 3 | 5 | 3 |
| <i>Callimico goeldii</i> | Goeldi's marmoset | 1 | 1 | 1 |
| <i>Aotus nigriceps + Aotus trivigartus</i> | Black-headed night monkey/ Three-striped night monkey | 1 | 2 | 1 |
| <i>Callicebus melanochir + Callicebus personatus</i> | Coastal black-handed titi/Atlantic titi | 1 | 2 | 2 |
| <i>Callicebus moloch donacophilus + C. personatus</i> | White-eared titi/Atlantic titi | 1 | 3 | 3 |
| <i>Saimiri sciureus</i> | Common Squirrel Monkey | 1 | 1 | 1 |
| <i>Cebus sp.</i> | - | 3 | 5 | 4 |
| <i>Cebus/Sapajus robustus</i> | Crested capuchin | 2 | 7 | 7 |
| <i>Cebus/Sapajus xanthosternos</i> | Yellow-breasted capuchin | 3 | 14 | 18 |
| <i>Cebus paella</i> | Tufted capuchin | 1 | 1 | 1 |
| <i>Pithecia monachus</i> | Monk saki | 3 | 1 | 3 |
| <i>Chiropotes satanas</i> | Black bearded saki | 1 | 1 | 1 |
| <i>Cacajao melanocephalus</i> | Golden-backed uakari | 1 | 3 | 4 |
| <i>Alouatta guariba clamitans+ Alouatta caraya</i> | Southern brown howler/Black howler | 1 | 2 | 1 |
| <i>Ateles paniscus</i> | Red-faced spider monkey | 2 | 2 | 3 |
| <i>Brachyteles arachnoides</i> | Southern muriqui/Woolly monkey | 1 | 6 | 8 |

*Triplicate samples (three consecutive days).

Another portion of the sample was homogenized, and the resulting filtrate was placed in 15 ml conical-bottom centrifuge tubes and was submitted to the centrifugal-sedimentation technique with ethyl acetate [25] modified

[40], centrifugal floatation with zinc sulfate [5], centrifugal floatation with sucrose [30] modified [7]. A fraction of the filtrate was submitted to the spontaneous sedimentation technique [14].

To analyze the microscope slides from each technique, an optical microscope Olympus® BX 41 was used, initially at 100× magnification, and when necessary at 400× magnification for verification. For morphometry of evolutionary forms of parasites, an Olympus® CH30 optical microscope at 400× magnification and an ocular micrometer were used.

Data analysis

Fecal samples were considered positive when at least one evolutionary form of parasites (trophozoite, egg, larvae, cyst, or oocyst) was detected. The prevalence was obtained by dividing the number of positive samples by the total number of samples collected from each group of animals studied. The χ^2 test was performed using SPSS® (version 11.7, SPSS® Inc., Chicago, IL, USA) with a significance level of 5% to analyze the frequency of samples presenting evolutionary forms of parasites among the different sites and species studied.

Results

Of the 1115 fecal samples collected, 633 (56.7%) were positive for one or more evolutionary forms of gastrointestinal parasites, of which 578 (91.3%) of those presented protozoans and 47 (7.4%) helminths. In 62.3% of the 960 samples collected at Cecal and in 22.5% of the 115 samples collected at CPRJ, protozoans and/or helminths were found, with statistically significant difference ($P < 0.05$; Table 2).

At Cecal, the highest parasitic frequency found was for *Balantidium coli* (47.6%), followed by *Entamoeba* sp. (38.3%). These results were mostly obtained in samples from animals of *Macaca* genus (Table 3). At CPRJ, *B. coli* was detected in samples of *Cebus* sp. (13.3%) and *Leontopithecus* sp. (3.7%) and *Entamoeba* sp. cysts in samples from *Callicebus* sp. (60%), *Pithecia* sp. (33.3%), and *Cebus* sp. (3.3%) (Tables 4 and 5).

In general, at Cecal, those protozoans were proportionally more frequent than in CPRJ, showing significant statistical difference ($P < 0.05$). In addition, *Giardia duodenalis* (1.7%) cysts were found only in feces of *Saimiri sciureus* at Cecal (Table 3).

Eggs of *Trichuris trichiura* were detected only in fecal samples of Rhesus macaques (18.9%). The samples collected at Cecal in enclosures housing *Saimiri* of both species were diagnosed with eggs of the Superfamily Rhabditoidea, which were also detected in feces of *Callicebus* sp. at CPRJ. Eggs of the cestode *Hymenolepis* sp. were detected in both Institutions in fecal samples of *Saimiri sciureus*, *Aotus* sp. at Cecal, and in samples of *Cacajao* sp. at CPRJ (Tables 3–5).

Table 2 Evolutionary forms of gastrointestinal parasite detected in fecal samples from captive non-human primates of two breeding centers located in Rio de Janeiro State, Brazil

| | Cecal | CPRJ | P-value |
|--|-------------|------------|---------|
| Samples with evolutionary forms of parasites | 598 (62.3%) | 35 (22.5%) | 0.000* |
| Protozoa | | | |
| <i>Balantidium coli</i> | 457 (47.6%) | 6 (3.87%) | 0.000* |
| <i>Giardia duodenalis</i> | 5 (0.5%) | 0 | 0.604 |
| <i>Entamoeba</i> sp. | 368 (38.3%) | 5 (3.2%) | 0.000* |
| Coccidia oocyst | 2 (0.2%) | 0 | 0.364 |
| Nematoda | | | |
| <i>Trichuris trichiura</i> | 110 (11.4%) | 0 | 0.000* |
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | 0 | 1 (0.6%) | 0.14 |
| Eggs of the Superfamily Rhabditoidea | 3 (0.3%) | 7 (4.5%) | 0.002* |
| Nematode Larvae | 9 (0.9%) | 20 (12.9%) | 0.000* |
| Oxyuridae Family | 0 | 2 (1.2%) | 0.003* |
| Cestoda | | | |
| <i>Hymenolepis</i> sp. | 9 (0.9%) | 10 (6.4%) | 0.012* |
| Acanthocephalidae Family | 0 | 1 (0.6%) | 0.14 |

Nonparametric test χ^2 .

*Statistically significance difference ($P < 0.05$) between Cecal and CPRJ.

Larvae of nematodes were found in both institutions, notably at CPRJ, where it was the most frequent evolutionary form. At Cecal, such structures were detected only in samples from *Saimiri sciureus* (Tables 3–5). Eggs of the Families Oxyuridae (3.7%) and Acanthocephalidae (1.6%) were found only in fecal samples of *Leontopithecus* sp. (Table 5). Eggs of *Ascaris lumbricoides* were detected only in samples from *Cebus* sp. (3.3%).

Polyparasitism was evidenced at Cecal, 453 of 598 (75.7%) and at CPRJ, 12 of 35 (34.3%). The most frequent association occurred at Cecal, between *B. coli* and *Entamoeba* sp. (30.83%). The main associations at CPRJ occurred between larvae of nematodes and eggs of the Superfamily Rhabditoidea (2.6%) (Date not shown in the tables).

In Table 6, it is observed the NHP species that presented positivity for evolutionary forms of *B. coli* and *M. fascicularis* with the highest frequency, without significant statistical difference for trophozoite detection with *M. mullata* ($P > 0.05$).

Discussion

It is known that *B. coli* can parasitize many animals, including swine, ostriches, human, and non-human primates, presenting zoonotic transmission nature [29]. As presented in this study, this parasite has been reported in several groups of animals worldwide, both in captive and wild living animals [36]. Monitoring of

Table 3 Frequency of positive samples for evolutionary forms of gastrointestinal parasites detected in four different species of captive non-human primates at Cecal, Rio de Janeiro, Brazil

| Cecal | <i>Saimiri sciureus</i> | <i>Saimiri ustus</i> | <i>Macaca fascicularis</i> | <i>Macaca mulatta</i> | Total |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|--------------|
| Group size | 285 | 11 | 85 | 579 | 960 |
| Number of samples | 285 | 11 | 85 | 579 | 960 |
| Samples with evolutionary forms of parasites | 26 (9.1%) | 1 (9%) | 78 (91.7%) | 493 (85.1%) | 598 (62.2%) |
| Protozoa | | | | | |
| <i>Balantidium coli</i> | 5 (1.7%) | 0 | 72 (84.7%) | 380 (65.6%) | 457 (47.6%) |
| <i>Giardia duodenalis</i> | 5 (1.7%) | 0 | 0 | 0 | 5 (0.5%) |
| <i>Entamoeba</i> sp. | 0 | 0 | 51 (60%) | 317 (54.7%) | 368 (38.3%) |
| Coccidia Oocyst | 0 | 0 | 0 | 2 (0.3%) | 2 (0.2%) |
| Nematoda | | | | | |
| <i>Trichuris trichiura</i> | 0 | 0 | 0 | 110 (18.9%) | 110 (11.45%) |
| Eggs of the Superfamily Rhabditoidea | 2 (0.7%) | 1 (1%) | 0 | 0 | 3 (0.3%) |
| Nematode Larvae | 9 (3.1%) | 0 | 0 | 0 | 9 (0.9%) |
| Cestoda | | | | | |
| <i>Hymenolepis</i> sp. | 9 (3.1%) | 0 | 0 | 0 | 9 (0.9%) |

Table 4 Frequency of positive samples for evolutionary forms of gastrointestinal parasite detected in different genera of captive non-human primates of the Callitrichidae Family at CPRJ, Rio de Janeiro, Brazil

| CPRJ | <i>Callithrix</i> sp. | <i>Cebuella pygmaea</i> | <i>Calibella humilis</i> | <i>Mico</i> sp. | <i>Saguinus</i> sp. | <i>Leontopithecus</i> sp. | <i>Callimico goeldii</i> | Total |
|--|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|----------|
| Group size | 26 | 3 | 1 | 11 | 34 | 105 | 1 | 181 |
| Number of samples | 19 | 1 | 1 | 6 | 15 | 53 | 1 | 98 |
| Samples with evolutionary forms of parasites | 0 | 0 | 0 | 1 (16.6%) | 0 | 6 (11.3%) | 0 | 7 (7.1%) |
| Protozoa | | | | | | | | |
| <i>Balantidium coli</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (3.7%) | 0 | 2 (2%) |
| Nematode | | | | | | | | |
| Nematode Larvae | 0 | 0 | 0 | 1 (16.6%) | 0 | 2 (3.7%) | 0 | 0 |
| Oxyuridae Family | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (3.7%) | 0 | 0 |
| Acanthocephalidae Family | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (1.8%) | 0 | 1 (1%) |

the protozoan in captive primates is relevant, as it is reported in immunocompetent baboons (*Papio hamadryas*) determining clinical picture of diarrhea with blood loss [35]. Moreover, *B. coli* has been pointed as one of the main parasites capable of reducing the fat of the milk of *M. mulatta*, hindering the development of lactating animals [6].

The study of gastrointestinal parasitosis in fecal samples of captive NHP in two nurturing centers showed the prevalence of evolutionary forms of protozoan, mostly *Balantidium coli* followed by *Entamoeba* sp., but low frequency of helminths. However, there was a large variation in the proportion of positive samples between the two study sites and among the different primates' species, with the *Cynomolgus* and *Rhesus* macaques, at Cecal, presenting the highest parasite positivity. This high frequency can explain the significant statistical

differences between the two institutions for the overall value of parasites and protozoans.

A high frequency of protozoan was also observed in captive primates (prosimians, NW, OW, and great apes) of four zoological gardens in Belgium [11], in *Papio hamadryas* (baboons) in zoological gardens in Spain [4] and in captive Cebidae, Cercopithecidae, Hominidae, and Hylobatidae, in Malaysia [13].

The occurrence of this protozoans in these captive animals can be associated with the simplicity of their life cycle, because they need no intermediate host due to the cysts' capability of surviving in the environment and the infectivity of the cystic structure when excreted [34, 37]. In addition, the protozoans present low sensitivity to the anti-helminthes that are often used in sanitation procedures of captive animals and possibly for a greater sensitivity of Catarrhini simians to infection by *B. coli*

Table 5 Frequency of positive samples of evolutionary forms of gastrointestinal parasites detected in different genera of non-human primates such as *Aotus*, *Callicebus*, *Saimiri*, *Cebus*, *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao*, *Alouatta*, *Ateles*, and *Brachyteles* at CPRJ, Rio de Janeiro, Brazil

| CPRJ | <i>Aotus</i> sp. | <i>Callicebus</i> sp. | <i>Saimiri sciureus</i> | <i>Cebus</i> sp. | <i>Pithecia monachus</i> | <i>Chiropotes satanas</i> | <i>Cacajao melanocephalus</i> sp. | <i>Alouatta</i> sp. | <i>Ateles paniscus</i> | <i>Brachyteles arachnoides</i> | Total |
|--|------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------------|-------------|
| Group size | 2 | 5 | 1 | 27 | 1 | 1 | 3 | 2 | 2 | 6 | 50 |
| Number of samples | 1 | 5 | 1 | 30 | 3 | 1 | 4 | 1 | 3 | 8 | 57 |
| Samples with evolutionary forms of parasites | 1 (100%) | 5 (100%) | 0 | 18 (60%) | 1 (33.3%) | 0 | 2 (50%) | 0 | 1 (33.3%) | 0 | 28 (49.1%) |
| Protozoa | | | | | | | | | | | |
| <i>Balantidium coli</i> | 0 | 0 | 0 | 4 (13.3%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 (7%) |
| <i>Entamoeba</i> sp. | 0 | 3 (60%) | 0 | 1 (3.3%) | 1 (33.3%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 (8.7%) |
| Nematode | | | | | | | | | | | |
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | 0 | 0 | 0 | 1 (3.3%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (1.7%) |
| Eggs of the Superfamily Rhabditioidea | 0 | 1 (20%) | 0 | 6 (20%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 (12.2%) |
| Larvae of nematode | 0 | 0 | 0 | 15 (50%) | 0 | 0 | 1 (25%) | 0 | 1 (33.3%) | 0 | 17 (29.8%) |
| Cestode | | | | | | | | | | | |
| <i>Hymenolepis</i> sp. | 1 (100%) | 4 (80%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (25%) | 0 | 0 | 0 | 10 (17.54%) |

and *Entamoeba* sp. In general, captive animals are restricted to a smaller communal area than the ones living in the wild, which favors the transmission of gastrointestinal parasites due to its concentration of evolutionary forms.

In this study, different species of *Entamoeba* sp. were not identified. Although the laboratorial techniques were qualitative, in fecal samples, especially of Rhesus macaques, a large number of amebic cysts of distinct morphologic features could be observed. NHP can host ameba species similar to the ones found in humans, such as *Entamoeba coli*, *E. hartmanni*, *Iodamoeba buetschlii*, *Endolimax nana*, *E. histolytica*/E. *dispar*, in addition to *E. chattoni*, a specific simian species [31, 33]. It is known that the symptomatology of amebiasis in primates is clinically similar to human cases and that infections by *E. histolytica* have been more often reported in Catarrhini than in Platyrrhini macaques [36], with accordance to the results of this study.

Giardia duodenalis cysts were detected only in samples from *Saimiri sciureus* (1.7%) of the Cecal. Frequency of infection in *S. sciureus* (9%) higher than the ones in this study was detected at zoological gardens in Belgium [11], in *Callithrix jacchus* (23.78%) captives non-human primates from Rio Grande do Norte Center, Brazil [39], and in *Alouatta caraya* (27.7%) semi-captives in Argentina [19]. A genotyping of *G. duodenalis* in simians has provided the zoonotic pattern only, such as the genotype A1 detected in captive *Alouatta clamitans* of Santa Catarina, Brazil [38], and genotype B and AB (mixed infections) in captive simians of zoological gardens in Belgium [12]. It is worth to emphasizing that because captive non-human primates live very close to humans, they might be susceptible to infection with *G. duodenalis* strains of human origin, determined by cycles of zooanthroponosis transmission. The overall frequency of helminthes in this study was low, and evolutionary forms belonging to Nematode and Cestode classes were diagnosed in both institutions. The low prevalence of helminthes has generally been reported in captive NHP, resulting from the combination of a sanitary maintenance routine and the use of regular chemo prophylactic agents [21]. In addition, several nurturing centers of captive primates frequently perform feces examination on animals to keep track of the presence of helminthes in the breeding [23]. This practice was performed in both centers of the Rio de Janeiro.

Among the nematode, stands out *T. trichiura* eggs, diagnosed in Rhesus macaques at Cecal. The same eggs were also diagnosed in samples of wild living Rhesus in forests of India presenting higher positivity than in this study [23]. In fecal samples of Rhesus from the Kathmandu Temple in Nepal [8], helminthes' positivity was

Table 6 Frequency of cysts and trophozoites of *Balantidium coli* in fecal samples from *S. sciureus*, *M. fascicularis*, *M. mulatta*, *L. chrysomelas*, and *Cebus* sp. captives at Cecal and CPRJ

| | <i>Saimiri sciureus</i> | <i>Macaca fascicularis</i> | <i>Macaca mulatta</i> | <i>Leontopithecus</i> sp. | <i>Cebus</i> sp. |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------|------------------|
| <i>B. coli</i> cysts | 4 (1.4%) | 47 (55.2%) | 273 | 1 (1.9%) | 4 (13.3%) |
| <i>B. coli</i> trophozoites | 1 (0.4%) | 25 (29.4%)* | 107 (18.5%)* | 1 (1.9%) | 0 |
| Total <i>B. coli</i> | 5 (1.7%) | 72 (84.7%) | 380 (65.6%) | 2 (3.7%) | 4 (13.3%) |

Nonparametric test χ^2 .

*Without statistical significant difference between species ($P > 0.05$).

lower than at Cecal. Also found frequencies similar to the ones of this study when researching captive Cercopithecidae primates in zoological gardens [11].

Besides this nematode, especially at CPRJ, thin-shelled eggs, oval, embryonated and sometimes presenting larvae with size compatible to the Superfamily Rhabditoidea (ranging 50–60 $\mu\text{m} \times 27\text{--}30 \mu\text{m}$), and nematode larvae were detected. This family was chosen for classification because the samples were collected from the enclosures' ground, making it impossible to avoid the presence of free living nonpathogenic evolutionary forms or pathogenic nematode belonging to the *Strongyloides* genus. In addition to eggs, nematode larvae were detected, but those were not morphologically classified. It is important to mention that the association of evolutionary forms most found in CPRJ was between nematode and eggs belonging to that Superfamily, which indicates the possibility of hatching of these eggs in the environment and determining the presence of these larvae. *Strongyloides* sp. has been detected orangutans living in the wild and semi-captives of Indonesia [21], and in captive *Callithrix jacchus* at Rio Grande do Norte, Brazil [39].

The findings of evolutionary forms of *Trichuris trichiura*, eggs of the Superfamily Rhabditoidea nematode larvae, and also eggs of *Ascaris lumbricoides* detected in samples of *Cebus* sp. indicate that the captive environment favored the evolution of parasite forms, from geohelminths to infective forms that can parasitize NHP.

Eggs of *Hymenolepis* sp. cestode were found both in *Saimiri sciureus* at Cecal, as in fecal samples of *Aotus* sp., *Callicebus* sp., and *Cacajao melanocephalus* at CPRJ. In samples collected in enclosures of Cecal, eggs of that cestode featured light color, with polar thickenings of membrane inner and size ranging between 40 and 50 μm , being compatible to *H. nana*. In CPRJ, eggs were yellowish and without polar thickenings of membrane inner, with size ranged from 70 to 80 μm , being compatible with *H. diminuta*. Positivity levels for *Hymenolepis* sp. lower than those presented in this study were reported in neotropical captive animals in Conservation and Breeding Centers in Peru [18]. Eggs of that cestode

were also detected in captive *Callicebus personatus nigrifons* in Minas Gerais, Brazil [17]. It is noteworthy that NHP can infect themselves through the ingestion of eggs from the environment, food, and water contaminated with feces of rodents, primates non-human, and human feces. In addition, insects hosting the cysticercus larvae can also infect the simians when ingested. Eggs of the Family Acanthocephalidae were detected only in *Leontopithecus* sp. newcomers at CPRJ. Those animals were kept in quarantine when they were examined, which indicates that the infection occurred while the primates were living in the wild.

Evolutionary forms of *B. coli* were detected though direct examination in both OW and NW non-human primates. Fecal samples from *M. fascicularis* and *M. mulatta* presented the highest frequency of trophozoite, with no significant statistical difference when compared. Presence of *B. coli* trophozoite in fecal samples also reported in great apes, chimpanzee and gibbon, and from OW primate *M. fuscata* [22]. The great release of trophozoites only by OW species may indicate that those species are more susceptible to infections by *B. coli*.

In the nurturing centers of non-human primates studied, high frequency of protozoan was evidenced, particularly at Cecal that hosts *Macaca mulatta* e *M. fascicularis* species that presented the highest parasitic frequency. Low prevalence of parasite in neotropical species may have occurred because these simians spent more time on tree trunks than on the ground where the majority of feces are found. These results point the need for sanitation programs focused on the control of gastrointestinal parasitosis, mainly for protozoosis. It is also important to emphasize the need for further parasitological studies regarding neotropical species for enrichment of the epidemiologic knowledge of parasitic infections.

Acknowledgments

At Primate Center from Rio de Janeiro (CPRJ/INEA) and the Laboratory Animals Breeding (Cecal/Ficoruz)

for providing scientific material. The authors would like to thank for project support: FAPERJ (Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro); IOC (Oswaldo Cruz Institute); and PROAES-UFF (Dean's

Office for Student Affairs of Federal Fluminense University); PROPPI-UFF (Dean's Office for Research Studies and Innovation of Federal Fluminense University).

References

- Angonesi OS, Almeida-Silva B, Mendes SL, Pyrrho AS: Endoparasitos em muriquis do norte, *Brachyteles hypoxanthus*, isolados em pequeno fragmento de mata Atlântica. *Neotrop Primates* 2009; **16**:15–8.
- Carmo AMC, Salgado CA: Ocorrência de parasitos intestinais em *Callithrix* sp. (Mammalia, Primates, Callitrichidae). *Rev Bras Zool* 2003; **5**: 267–72 (In portuguese).
- Conga DF, Browler M, Tantalean M, Montes D, Serra-Freire NM, Mayor P: Intestinal helminths in wild Peruvian red uakari monkeys (*Cacajao calvus ucayalii*) in the northeastern Peruvian Amazon. *J Med Primatol* 2014; **43**:130–3.
- Córdon GP, Prados AH, Romero D, Moreno MS, Pontes A, Osuna A, Rosales MJ: Intestinal parasitism in the animals of the zoological garden "Pena Escrita (Almuñecar, Spain)". *Vet Parasitol* 2008; **156**:302–9.
- Faust EC, D'antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie JE, Walker JH: A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *Am J Trop Med* 1938; **18**: 169–83.
- Hinde K: Milk composition varies in relation to the presence and abundance of *Balantidium coli* in the mother in captive Rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am J Primatol* 2007; **69**:625–34.
- Huber F, Bomfim TC, Gomes RS: Comparison between the efficiency of the formaldehyde-ether sedimentation technique and the sugar fluctuation technique for the detection of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* sp. oocysts in fecal samples from calves. *Rev Bras Parasitol Vet* 2003; **12**:135–7. (In Portuguese).
- Jha A, Chalise MK, Shrestha RM, Karki K: Intestinal parasitic investigation in temple Rhesus Monkeys of Kathmandu. *The initiation* 2011; **4**: 1–7.
- Johnson-Delaney CA: Parasites of Captive nonhuman primates. *Vet Clin Exot Anim* 2009; **12**:563–81.
- Kalema-Zikusoka G, Kock RA, Macfie EJ: Scabies in free-ranging mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Vet Rec* 2002; **150**:12–5.
- Levecke B, Dorny P, Geurden T, Vercammen F, Vercruyse J: Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. *Vet Parasitol* 2007; **148**:236–46.
- Levecke B, Geldhof P, Calerebout E, Dorny P, Vercammen F, Cacció SM, Vercruyse J, Geurden T: Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates reveals mixed assemblage A and B infections and novel polymorphism. *Int J Parasitol* 2009; **39**:1595–601.
- Lim YAL, Nigui R, Shukri J, Rohela M, Mat Naim HR: Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. *Vet Parasitol* 2008; **57**:154–9.
- Lutz AO: Schistosomum mansoni and Schistomatose according to observations made in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1919; **11**:121–55. (In portuguese).
- Malan FS, Horak IG, Vos V, Van Wik JA: Wildlife parasites: lessons for parasites control in livestock. *Vet Parasitol* 1997; **71**:137–53.
- Melfi V, Poyser F: Trichuris burdens in zoo-housed *Colobus guereza*. *Int J Primatol* 2007; **28**:1449–56.
- Melo AL, Neri FM, Ferreira MB: Helmintos de Sauás, *Callicebus personatus nigrifrons* (SPIX, 1823), Primates: Cebidae coletados em resgate faunístico durante a construção da usina hidrelétrica Nova Ponte, MG. *A Primatologia no Brasil* 1997; **6**:193–8.
- Michaud C, Tantalean M, Ique C, Montoya E, Gozalo A: A survey for helminth parasites in feral New World non-human primate populations and its comparison with parasitological data from man in the region. *J Med Primatol* 2003; **32**:341–5.
- Milozzi C, Bruno G, Cundom E, Mudry MD, Navone GT: Intestinal parasites of *Alouatta caraya* (Primates, Ceboidea): preliminary study in semi-captive and in the wild in Argentina. *Mastozool neotrop* 2012; **19**:271–8.
- Mul IF, Paembonan W, Singleton I, Wich SA, Van Bolhuis G: Intestinal parasites of free-ranging, semi-captive, and captive *Pongo abelli* in Sumatra, Indonesia. *Int J Primatol* 2007; **28**:407–20.
- Munene E, Otsyula M, Mbaabu D, Mutahi WT, Muriuki SMK: Helminth and protozoan gastro-intestinal (GIT) parasites in captive and wild-trapped African non human primates. *Vet Parasitol* 1998; **78**:1995–2201.
- Nakauchi K: The prevalence of *Balantidium coli* infection in fifty-six mammalian species. *J Vet Med Sci* 1999; **61**:63–5.
- Pamar SM, Jani RG, Mathakiya RA: Study of parasitic infections in non-human primates of Gujarat

ANEXO 7.

Artigo publicado pela Veterinary Parasitology

Veterinary Parasitology 210 (2015) 240–245



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Rapid Communication

Isolation and maintenance of *Balantidium coli* (Malmsteim, 1857) cultured from fecal samples of pigs and non-human primates



Alynne da Silva Barbosa^{a,*}, Otilio Machado Pereira Bastos^b,
Claudia M. Antunes Uchôa^b, Alcides Pissinatti^c, Paulo Ricardo Ferreira Filho^d,
Lais Verdán Dib^b, Eduarda Peixoto Azevedo^b, Mayara Perlingeiro de Siqueira^b,
Matheus Lessa Cardozo^b, Maria Regina Reis Amendoeira^a

^a Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, Rio de Janeiro), Oswaldo Cruz Institute, Toxoplasmosis Laboratory, Avenue Brazil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21045900, Brazil

^b Federal Fluminense University, Biomedical Institute, Department of Microbiology and Parasitology, Professor Hernani Mello Street, São Domingos, Niterói, Rio de Janeiro 24210-130, Brazil

^c Primate Center of Rio de Janeiro – CPRJ/INEA, RJ, Paradise Road, Guapimirim, Rio de Janeiro 25940-000, Brazil

^d Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, Rio de Janeiro), Building Service Nonhuman primates (CECAL), Oswaldo Cruz Foundation, Building 108, Brazil Avenue, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21045900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2015

Received in revised form 29 March 2015

Accepted 31 March 2015

Keywords:

Balantidium coli

Isolation

Xenic cultivation

Pig

Non-human primates

Brazil

ABSTRACT

Balantidium coli is a protozoa that can determine dysentery in humans, pigs and non-human primates having zoonotic potential. The lack of standardization in isolation and maintenance hinders the development of research on its biology and epidemiology. This study is aimed to standardize the isolation and maintenance of this parasite from animal feces, in culture medium, Pavlova modified. From 2012 to 2014, 1905 fecal samples were collected from captive animals of Rio de Janeiro. Were selected for isolation samples with a minimum of 10 trophozoites and/or 30 cysts of *B. coli*, totaling 88 pigs, 26 *Cynomolgus* and 90 rhesus macaques. In the presence of cysts, the sample was homogenized in saline solution, 500 μ L was removed and inoculated into culture medium. The material that contained trophozoites the inoculum was made from 240 μ L of fecal solution. All inoculate tubes with the subcultures were kept at 36 °C, and sterile rice starch was always added to the medium. The parasites isolate from pigs, 34%, and from *Cynomolgus* 38.4% were maintained in vitro for a period of more than 24 months. These procedures proved to be adequate for isolation and maintenance of *B. coli* from different animals, they were found to be inexpensive and easy to perform.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. +55 21 2562-1844.

E-mail addresses: alynnedsb@gmail.com, alynne.barbosa@ioc.fiocruz.br (A.d.S. Barbosa), otiliobastos@gmail.com (O.M. Pereira Bastos), claudiauchoa@vm.uff.br (C.M.A. Uchôa), pissinaticprj@globocom.com (A. Pissinatti), prhricardo@gmail.com (P.R.F. Filho), lais.dib@hotmail.com (L.V. Dib), dudadauna@gmail.com (E.P. Azevedo), mayaraperlingeiro@yahoo.com.br (M.P. de Siqueira), matheusJcardozo@hotmail.com (M.L. Cardozo), mramendoeira@globocom.com (M.R.R. Amendoeira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.030>

0304-4017/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Balantidium coli is the only ciliate protozoa that infect humans, although it may parasitize a wide range of animals. Pigs and non-human primates have been considered the most important reservoirs for human transmission (Walzer and Healy, 1982; Nakauchi, 1999). The mechanism of infection of *B. coli* is oral passive vehicles having as main water and food contaminated with cysts. This parasite inhabits the large intestine, which can trigger the infected hosts various gastrointestinal manifestations, which highlight diarrhea with mucus and blood (Schuster and Ramirez Avila, 2008).

The diagnosis of balantidiosis has been conducted mainly by direct examination and/or by parasitological techniques of concentration, with few studies using cultivation (Auerbach, 1953; Solaymani-Mohammadi and Petri, 2006). It is known that the maintenance of intestinal protozoa in vitro makes it possible to obtain biological material for research immunodiagnostic (Zaman, 1964; Dzbenksi, 1966), experimental infection (Jones, 1946), screening of drugs (Carneri, 1972), molecular and ultrastructural studies (Nilles-Bije and Rivera, 2010).

The first report of isolation and maintenance of *B. coli* was done by Barrett and Yarbrough (1921), using saline solution plus inactivated human serum. It is believed that xenic culture media employed for many years to *Entamoeba histolytica* may be used for the isolation and maintenance of *B. coli* (Zaman, 1978; Solaymani-Mohammadi and Petri, 2006). Given the complexity of xenic systems used, Pavlova (1938) described a simple monophasic medium used in the development of *Entamoeba* sp. Jones (1946) achieved good results in isolating of *Entamoeba* species with Pavlova, adding yeast extract. This modification was used by several authors for cultivation of strains of *E. histolytica* isolated from humans (Lima and Hirschfeld, 1996; Silva, 1997) and also by Carneri (1972) for maintenance of *B. coli* isolated from pigs.

Although *B. coli* has already been isolated, there is no standardization in the pre-processing steps of the fecal sample to produce the inoculum and the amount of reagent added to xenic medium such as rice starch. To optimize the cultivation of *B. coli*, this study aimed to standardize their isolation and maintenance from fecal samples from pigs and non-human primates in the xenic medium Pavlova modified by Jones.

2. Materials and methods

2.1. Ethical considerations

This study design was approved by the Animal Ethics (CEUA-Fiocruz) Committee, license N° LW57/12, Protocol 79P/11-2 and keeps it updated annually SISBIO – IBAMA, under protocol number 31900-2.

2.2. Fecal samples

From August 2012 to October 2014, 1905 fecal samples from captive animals in the state of Rio de Janeiro were collected. Of these, 790 were obtained from pigs (*Sus scrofa*),

Table 1

Frequency of positive fecal samples for *Balantidium coli* in captive animals in the state of Rio de Janeiro.

| Species | City | Samples collected |
|---|-------------------|-------------------|
| Pigs | | |
| <i>Sus scrofa</i> | Rio Bonito | 21 |
| <i>Sus scrofa</i> | Araruama | 7 |
| <i>Sus scrofa</i> | Saquarema | 12 |
| <i>Sus scrofa</i> | Maricá | 8 |
| <i>Sus scrofa</i> | Itaboraí | 12 |
| <i>Sus scrofa</i> | Casimiro de Abreu | 23 |
| <i>Sus scrofa</i> | Silva Jardim | 5 |
| <i>Sus scrofa</i> | Petrópolis | 479 |
| <i>Sus scrofa</i> | Itaperuna | 223 |
| Subtotal | | 790 |
| Nonhuman primates | | |
| Cecal | Rio de Janeiro | |
| <i>Saimiri sciureus</i> | | 285 |
| <i>Saimiri ustus</i> | | 11 |
| <i>Macaca fascicularis</i> | | 85 |
| <i>Macaca mulatta</i> | | 579 |
| Subtotal | | 960 |
| CPRJ | Rio de Janeiro | |
| <i>Cebuella pygmaea</i> | | 1 |
| <i>Callithrix aurita</i> | | 2 |
| <i>Callithrix jacchus</i> | | 2 |
| <i>Callithrix penicillata</i> | | 4 |
| <i>Callithrix geoffroyi</i> | | 2 |
| <i>Callithrix hybrid</i> | | 9 |
| <i>Calibella humilis</i> | | 1 |
| <i>Mico chrysoleucus</i> | | 2 |
| <i>Mico humeralifer</i> | | 2 |
| <i>Mico melanurus</i> | | 1 |
| <i>Mico saterei</i> | | 1 |
| <i>Saguinus</i> sp. | | 17 |
| <i>Leontopithecus</i> sp. | | 53 |
| <i>Callimico goeldii</i> | | 1 |
| <i>Aotus</i> sp. | | 1 |
| <i>Callicebus</i> sp. | | 5 |
| <i>Saimiri sciureus</i> | | 1 |
| <i>Cebus</i> sp. | | 30 |
| <i>Pithecia monachus</i> | | 3 |
| <i>Chiropotes satanas</i> | | 1 |
| <i>Cacajao melanocephalus</i> | | 4 |
| <i>Alouatta guariba</i> | | 1 |
| <i>clamitans</i> + <i>Alouatta caraya</i> | | |
| <i>Ateles paniscus</i> | | 3 |
| <i>Brachyteles arachnoides</i> | | 8 |
| Subtotal | | 155 |
| Total | | 1905 |

as follows: 88 samples from animals of family properties located in the cities of Rio Bonito, Araruama, Saquarema, Maricá, Itaboraí, Casimiro de Abreu, Silva Jardim and 702 of technicality creations of Petrópolis and Itaperuna. Of the non-human primates, 960 samples were collected by the Center for breeding laboratory (Cecal) Fiocruz situated in the very city of Rio de Janeiro and 155 of the Primatology Center of INEA located in Guapimirim city (Table 1). Fecal samples from pigs were obtained directly from the rectum using a long sleeve palpation and from the apes, fecal material was collected from the floor of their premises, and stored in plastic collectors.

2.3. Laboratory analysis and sample selection

Immediately after collection, samples were sent to the Laboratory of Parasitology, Biomedical Institute, UFF/Niteroi, Rio de Janeiro. The sample was eluted in sterile phosphate buffered saline (PBS) and subjected to direct examination. The presence of the parasites was confirmed by observation of the samples under light microscopy at 100 fold magnification. The samples inoculated in xenic culture medium showed the parameter with a minimum of 10 mobile trophozoites and/or 30 cysts in microscopic analyses.

2.4. Preparation of culture medium

The Pavlova xenic medium (1938) modified by Jones (1946) was used for the isolation and maintenance of strains, being produced using the following reagents: sodium phosphate dibasic 1.292 g, potassium phosphate monobasic 0.42 g, sodium chloride 7.27 g, yeast extract 1.46 g. The reagents were homogenized in 1000 mL of distilled water, keeping the final pH between 7.2 and 7.4. Subsequently, the culture medium was autoclaved (120 °C/20 min) and stored at 4 °C. Before using of culture medium, 5% inactivated and sterile bovine fetal serum was added and solutions of the antibiotics which were produced aseptically. One milliliter of streptomycin sulfate was added to a final concentration of 500 µg/mL and then penicillin G potassium, with a final concentration of 1000 IU/mL was added. Finally, 10 mL of complete medium was distributed in sterile glass tubes with screw cap.

One gram of sterile rice starch was suspended in sterile 10 mL medium modified Pavlova, and stored under refrigeration at 4 °C. At the time of inoculation for the isolation, as well as the each maintenance subculture had a suspension of 60 µL of sterile rice starch added into the tubes containing the fresh medium.

2.5. Isolation of strains of *B. coli*

Fecal samples selected that had only the parameter for cysts were eluted in PBS and filtered through sieve covered with gauze. The filtrate was incorporated for two conical bottom tubes with 15 mL, centrifuged at 377 g for 5 min and subsequently the supernatant discarded. Then, the pellet was suspended in saline solution and centrifuged again. This washing procedure of the material was conducted for three consecutive times. After this step, 500 µL of the sediment was inoculated in the culture medium. The sample that had only trophozoites, the inoculum was made from 240 µL of fecal eluted in sterile saline. The two isolation procedures were used when samples presented parameters for trophozoites and cysts. Inoculation was always performed in duplicate, with two tubes containing medium modified Pavlova, which were held vertically on bacteriological incubator at 36 °C (Fig. 1).

The tubes were examined after 24 h of incubation, 60 µL of the pellet was withdrawn, and deposited on a microscope slide covered with coverslip. The readings were performed using a microscope with 100 fold magnification. In cultures found with mobile trophozoites, 500 µL

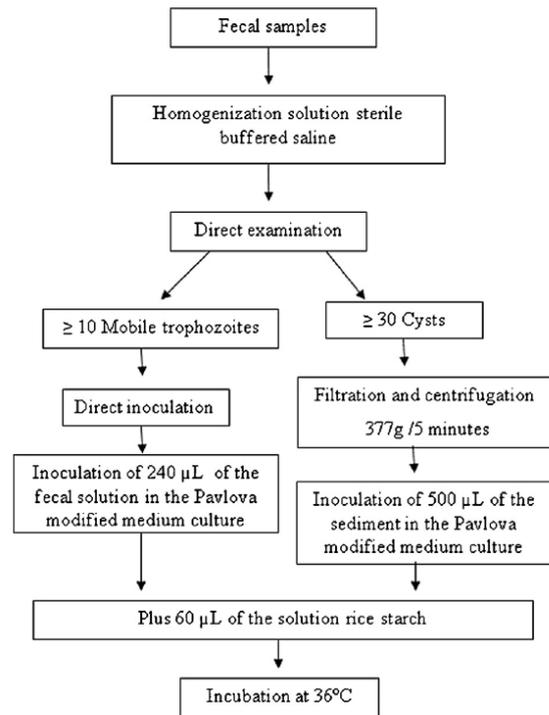


Fig. 1. Flowchart illustrating the stages of the isolation of *Balantidium coli* in the medium modified Pavlova culture.

of the sediment was transposed to a tube containing new fresh medium. Negative tubes without trophozoites in movement, were re-incubated for 24 h and subsequently checked. In these cases, the verification procedure and incubation was performed three times, during a maximum period of 72 h, and at the end, if negative, the material was discarded. The strains were considered isolated when it was observed mobile trophozoites in this verification step.

2.6. Maintenance of strains of *B. coli*

Strains isolated that remained alive after subsequent subcultures were admitted for maintenance. Initially, the mobile trophozoites cultures were maintained at subcultures for intervals of 24 h. After the eighth to tenth pass, i.e. when there was no fecal debris, subculture time was extended to intervals of 48 h.

3. Results

Of the total of 1905 fecal samples collected and evaluated by direct examination, 204 showed parameters of inoculation. Of the selected samples, 88 were from pigs (*Sus scrofa*), and 116 non-human primates, of which 26 were *Cynomolgus macaques* (*Macaca fascicularis*) and 90 Rhesus macaques (*Macaca mulatta*), both species of the Old World and inhabitants of Cecal/Fiocruz (Tables 1 and 2).

Of the selected 204 samples, 107 (52.4%) strains were isolated in medium modified Pavlova, and of these, 51

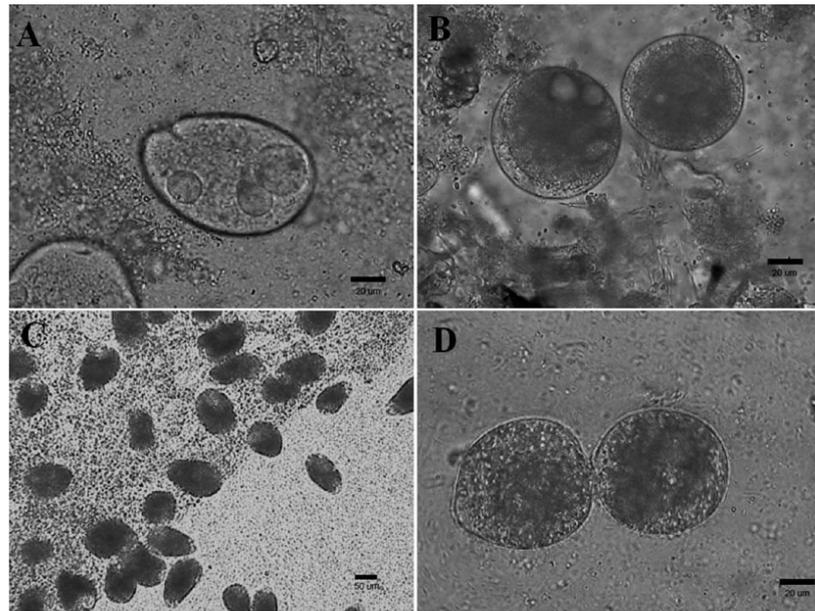


Fig. 2. Illustration of evolutionary forms of *Balantidium coli* observed in fecal sample and xenic cultivation. (A) Trophozoites of *B. coli* (100 \times) detected on direct examination in *Cynomolgus* macaque fecal sample. (B) *B. coli* cyst (100 \times) detected in fecal sample of pig. (C) Trophozoites of *B. coli* (50 \times) observed in strain isolated from *Cynomolgus* macaque maintained xenic cultivation. (D) Trophozoites of *B. coli* (100 \times) in cross-division process observed in strains isolated from pig kept in xenic cultivation.

(25%) were maintained for at least a week. Strains maintained, 28 originated from fecal samples with inoculation standard for trophozoites (Fig. 2A) followed by 15 samples with cysts standard (Fig. 2B) (Table 2). Maintained in the medium modified Pavlova for more than 24 months it was observed that only 40 strains, of which 10/26 (38%) isolates were from *Cynomolgus* macaques (Fig. 2C) and 30/88 (34%) were from pigs. All strains of *B. coli* derived from Rhesus macaques were maintained in vitro, remained viable for up to 1 week of incubation.

4. Discussion

The protocol for the isolation and maintenance of *B. coli* in the medium modified Pavlova used in this study allowed for the isolation of 107 strains and the maintenance of 51, from 204 fecal samples selected from different animal species. There are few published reports of frequency of isolation and maintenance of strains of ciliated. Furthermore, most studies of cultivation of the ciliate *B. coli* described small number of maintenance ranging from one to a maximum of five (Cunha and Muniz, 1937; Klaas, 1974; Nilles-Bije and Rivera, 2010; Tempelis and Lysenko, 1957). A large number of isolates, as reported in this study was described by Svensson (1955) that maintained 60 strains of *B. coli* isolated from pigs slaughtered in slaughterhouses, in a biphasic medium containing horse serum coagulated, the liquid portion of the same serum.

Levine (1940), Svensson (1955), Tempelis and Lysenko (1957), Zaman (1964), Nilles-Bije and Rivera (2010) reported the isolation and maintenance of *B. coli* from

material obtained from the cecum of pigs. In this study, the removal of fecal material was performed directly from the rectum of pigs and the floor of the enclosures of captive non-human primates, no need for necropsy, which made faster, less laborious collection, besides favoring the animal welfare.

Xenic biphasic media have been more used in the isolation of ciliated than monophasic. Tempelis and Lysenko (1957) studied the production of hyaluronidase in strains of *B. coli*, modified the Nelson medium (1947) by replacing the egg base by agar. It is known that biphasic media requiring more than a day to be made, comprising steps of tilting and solidification of the solid part of the autoclaving solution of the liquid coating and assembly of the complete medium in the tubes. Already Pavlova modified, to be a monophasic liquid medium, showed simple assembly with few reagents, requiring an average of 2 h to complete production.

To guarantee the successful isolation and maintenance of intestinal protozoan adopted the methodology described by Clark and Diamond (2002) who advocates the use of fecal sample parasitic rich cells, direct sowing in the presence of trophozoites, centrifugation of the samples with cysts and the addition of broad-spectrum antibiotics such as penicillin and streptomycin, but some adjustments have been made in isolation of *B. coli*.

The direct inoculation of stool presenting trophozoites of ciliate and centrifuging samples containing cysts used in this study facilitated the isolation, since it decreases the step of pre-insulated recommended by Nelson (1940), where the fecal contents were deposited in a glass beaker,

Table 2
Frequency of isolation and maintenance in Pavlova modified medium for *Balantidium coli* strains from animals captives in different cities of the state of Rio de Janeiro, Brazil.

| Animal/Cities | Selected | | | Isolated | | | Maintenance (*) | | |
|---------------------------|----------|-------------|-----------|-----------|-------------|------|-----------------|-------------|-----------|
| | Total | Trophozoite | Cyst | Total | Trophozoite | Cyst | Total | Trophozoite | Cyst |
| | | | | | | | | | |
| <i>Pigs</i> | | | | | | | | | |
| Rio Bonito | 5 | 2(40%) | 3(60%) | 0 | 0 | 0 | 4(80%) | 2(40%) | 2(40%) |
| Araruama | 3 | 1(33.3%) | 2(66.6%) | 0 | 0 | 0 | 3(100%) | 1(33.3%) | 1(33.3%) |
| Saquarema | 6 | 2(33.3%) | 2(33.3%) | 2(33.3%) | 0 | 0 | 4(66.6%) | 2(33.3%) | 2(33.3%) |
| Maricá | 4 | 2(50%) | 1(25%) | 1(25%) | 0 | 0 | 2(50%) | 1(25%) | 1(25%) |
| Itaboraí | 10 | 0 | 9(90%) | 1(10%) | 0 | 0 | 4(40%) | 1(10%) | 3(30%) |
| Casimiro de Abreu | 19 | 7(36.8%) | 9(47.3%) | 3(15.7%) | 0 | 0 | 10(52.6%) | 2(10.5%) | 8(42.1%) |
| Silva Jardim | 3 | 1(33.3%) | 1(33.3%) | 1(33.3%) | 0 | 0 | 3(100%) | 1(33.3%) | 1(33.3%) |
| Petropolis | 28 | 20(71.4%) | 3(10.7%) | 5(17.8%) | 0 | 0 | 15(67.8%) | 9(32.1%) | 2(7.1%) |
| Itaperuna | 10 | 10(100%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 7(70%) | 0 | 0 |
| Subtotal | 88 | 45(51.1%) | 30(34%) | 13(14.7%) | 0 | 0 | 52(59%) | 25(28.4%) | 19(21.5%) |
| <i>Non-human primates</i> | | | | | | | | | |
| Cynomolgus/Rio de Janeiro | 26 | 14(53.8%) | 12(46.1%) | 0 | 0 | 0 | 17(65.3%) | 10(38.4%) | 7(26.9%) |
| Rhesus/Rio de Janeiro | 90 | 59(65.5%) | 8(8.8%) | 23(25.5%) | 0 | 0 | 38(31.1%) | 21(23.3%) | 6(6.6%) |
| Subtotal | 116 | 73(62.9%) | 20(17.2%) | 23(19.8%) | 0 | 0 | 55(47.4%) | 31(26.7%) | 13(11.2%) |
| Total | 204 | 118(57.8%) | 50(24.5%) | 36(17.6%) | 0 | 0 | 107(52.4%) | 56(27.4%) | 32(15.6%) |

subsequently homogenized in phosphate-buffered saline, filtered through cheesecloth and then transferred to a conical bottom tubes. Such material was incubated for 48 h and after this period; the sediment tubes that presented the best quantitative growth of trophozoites could then be inoculated into culture medium.

The most important adjustment was the addition of 60 μ L of rice starch suspension in the tubes with medium, of every subculture. This was necessary to ensure the energy reserves of parasites, since starch is a carbohydrate source. During the period of installing the isolation protocol it was observed that cultures that did not receive the addition of starch or starch receiving directly diluted in the culture medium died in the first days of incubation. It was also observed that trophozoites receiving excess rice starch becomes more rounded, increase in size and decrease their multiplication, thereby reducing the quantities trophozoites with eight formats, which are in the process of dividing (Fig. 2D). This fact was also noted by Levine (1940) studied the morphology of strains of *B. coli* isolated from pigs in a medium composed of 5% horse serum, Ringer's solution and rice starch. It is worth mentioning that the ciliated and the starch grains are heavy and settle to the bottom of the tube, facilitating the intake of the food. In this study also it was observed that trophozoites maintained for long periods in vitro become larger and more rounded than the trophozoites of fecal samples (wild forms), which had become smaller and thinner.

During the realization of this study it was kept the same concentration of penicillin recommended by Silva (1997) in the isolation of *Entamoeba histolytica*, but increased the concentration of streptomycin, 100 mg to 500 mg for better control of the microbiota. The tubes were held vertically in bacteriological incubator at 36 °C, Cox (1961) noted that the strains of *B. coli* incubated in this temperature range can remain viable for up to 4 days, allowing the lengthening of the intervals of the subcultures.

The main components of xenic media are sources of nucleic acids (yeast extract), carbohydrates (glucose and starch) and lipids (serum). The serum of animal origin is a fundamental reagent for the growth of intestinal protozoa in vitro. The fetal bovine serum in this study was adequate to maintain the nutritional requirements of *B. coli* in agreement with the results of Klaas (1974) was able to keep the two strains of porcine origin for up to 30 months and 7 months, respectively, with intervals of subcultures 72 h using xenic medium with gastric mucin and this fetal serum.

As can be noted not all samples selected presented success in isolation and maintenance. These cases were confirmed by the absence or the presence of trophozoites degenerates. Several hypotheses could explain such an occurrence. Among them, the small amount of viable evolutionary forms in a fecal sample, with no capacity to excyst in vitro, inadequate balance of the microbiota – ciliate-culture medium and also due to the existence of strains unable to grow in xenic proposed system.

The best results for the isolation of the *B. coli* in the medium modified Pavlova were obtained from fecal samples rich in trophozoites, agreeing with reports from Lima and Hirschfeld (1996) in the isolation of *E. histolytica*. The

high isolation from trophozoites may be due to the high frequency of these evolutionary forms in the selected samples. This happened both in the fecal material of pigs as the Old World primates of the *Macaca* genus such as Rhesus and *Cynomolgus* macaques of the Cecal.

Of the 51 strains of *B. coli* in maintenance, 40 have stabilized in the medium, and were held for more than 24 months. Of these, 10 were isolated from *Cynomolgus* macaques and 30 from pigs. Even being kept for a long period of medium modified Pavlova with antibiotic solutions, the cultures of the strains remain xenics system, composed of *B. coli*, flagellates and bacterias. At no time of the isolation or in the maintenance of the ciliated was observed the presence of fungal structures. High maintenance time in xenic system was also reported by Zaman (1978) who maintained strains of *B. coli* isolated from pigs in a medium composed of saline plus gastric mucin, bovine serum and rice starch for a period of 30 months. Attempts at long-term maintenance of *B. coli* from pigs in vitro with no satisfactory results were reported by Nilles-Bije and Rivera (2010), with medium Ringer, added 10% horse serum and rice starch, the trophozoites remained viable for only 14 days.

The 11 strains isolated from Rhesus macaques no success was made in maintaining a long period in the proposed medium culture. In most cases the strains were developed up to a week. This fact was also reported by Cunha and Muniz (1937), who also failed to maintain prolonged strains of *B. coli* isolated from the Rhesus in Boeck and Drobolav's biphasic xenic modified medium. The authors attribute the high acidification that occurs in the medium due to bacterial metabolism present in the fecal sample of Rhesus, which hinders the development of ciliated.

Currently the passages of the strains for new and fresh media culture have been carried out at intervals 48–72 h. Such adaptation of subculturing intervals agrees with the practice adopted by Auerbach (1953) who isolated strain of *B. coli* of the pig in a xenic biphasic medium with egg and Ringer's solution plus horse serum, rice starch suspension and penicillin and streptomycin solutions and with Rees (1927) in strains isolated from pigs and guinea pig (*Cavia porcellus*) kept in Barret and Yarbrough medium. As evidenced to this study of the culture tubes, Auerbach also reported the presence of a blue coloring of the media after 4 days of incubation of the strains. It is known that xenic cultivation is always accompanied by bacteria of the intestinal microbiota of the animal, which have not yet been identified. The function of this microbial metabolism for ciliate not yet had been determined.

In conclusion, the proposed protocol besides having contributed to the isolation of strains of *B. coli* in the xenic medium also proved adequate for maintenance of the parasite in vitro, as it presented a methodology easily applicable in research laboratories. This study was the first that demonstrated all isolation steps of *B. coli* and also the only that isolated several strains of *B. coli* from feces of different hosts. Despite being defined in this study that the isolates belong to the ciliated species *B. coli*, emphasize the need for molecular typing of strains for better taxonomic classification of the protozoa.

Acknowledgments

The authors would like to thank for project support: FAPERJ (Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro, Grant Number E26/110 440/2012), IOC (Oswaldo Cruz Institute), PROPPI-UFF (Dean's Office for Research and Innovation Studies of Fluminense Federal University) and PROAES-UFF (Dean's Office for Student Affairs of the Federal Fluminense University).

References

- Auerbach, E., 1953. The study of *Balantidium coli* (Stein, 1863) in relation to cytology and behavior in culture. *J. Morphol.* 93, 405–445.
- Barrett, H.P., Yarbrough, N., 1921. A method for the cultivation of *Balantidium coli*. *Am. J. Trop. Med.* 1, 161–165.
- Carneri, L., 1972. Isolation of *Balantidium coli* in culture and study of the speed of action of metronidazole and nitrimidazine. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 14, 321–325.
- Clark, G.C., Diamond, S.L., 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 329–341.
- Cox, F.E.G., 1961. The cultivation of *Balantidium coli* throughout its viable temperature range. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 55, 305–308.
- Cunha, A.M., Muniz, J., 1937. Conjugation and Endomixis in ciliates of the genus *Balantidium*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 32, 75–93.
- Dzbenksi, T.H., 1966. Immuno-fluorescent studies on *Balantidium coli*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60, 387–389.
- Jones, W.R., 1946. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; method for evaluating with the anti-amoebic properties of new compounds. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 40, 130–140.
- Klaas, J., 1974. Two new gastric mucin cultivation media and a chemically defined maintenance medium for *Balantidium coli*. *J. Parasitol.* 60, 907–910.
- Levine, N.D., 1940. Changes in the dimensions of *Balantidium* from swine upon cultivation. *Am. J. Hyg.* 32, 1–7.
- Lima, L.M., Hirschfeld, M.M.P., 1996. Cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 from fecal samples. *Rev. Bras. Anál. Clín.* 28, 179–181 (Portuguese).
- Nakauchi, K., 1999. The prevalence of *Balantidium coli* infections in fifty-six mammalian species. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 63–65.
- Nelson, E.C., 1940. An intestinal content cultivation medium: I. Methods of preparation and use and data obtained in the cultivation of *Balantidium coli* from the pig. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 731–745.
- Nelson, C.E., 1947. Alcoholic extract medium for the diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med.* 27, 545–552.
- Nilles-Bije, M.L., Rivera, W.L., 2010. Ultrastructural and molecular characterization of *Balantidium coli* isolated in the Philippines. *Parasitol. Res.* 106, 387–394.
- Pavlova, E.A., 1938. Sur les méthodes de la culture d'*Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Med.* 7, 224–227 (French).
- Rees, C.W., 1927. *Balantidia* from pigs and guinea-pigs: their viability, cyst production and cultivation. *Science* 61, 89–91.
- Schuster, F.L., Ramirez Avila, L., 2008. Current world status of *Balantidium coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 626–638.
- Silva, E.F., 1997. *Entamoeba histolytica*: isolation, axenização and characterization of different strains by morphological, biochemical, biological and pathogenicity in vivo and in vitro (PhD thesis). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 73 pp. (in Portuguese).
- Solaymani-Mohammadi, S., Petri Jr., W.A., 2006. Zoonotic implications of the swine transmitted-protozoal infections. *Vet. Parasitol.* 140, 189–203.
- Svensson, R., 1955. On the resistance to heating and cooling of *Balantidium coli* in culture and some observations regarding conjugation. *Exp. Parasitol.* 4, 502–525.
- Tempelis, C.H., Lysenko, M.G., 1957. The production of hyaluroidase by *Balantidium coli*. *Exp. Parasitol.* 6, 31–36.
- Walzer, P.D., Healy, G.R., 1982. *Balantidiasis*. In: Steele, J.H. (Ed.), *Handbook Series in Zoonoses*. CRC, Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 15–24.
- Zaman, V., 1964. Studies on the immobilization reaction in the genus *Balantidium*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58, 255–259.
- Zaman, V., 1978. *Balantidium coli*. In: Kreier, J.P. (Ed.), *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, pp. 633–653.