ANTONIO FRANCISCO MALHEIROS

OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS INTESTINAIS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO ENTRE OS ÍNDIOS TAPIRAPÉ HABITANTES DA AMAZÔNIA MATO-GROSSENSE, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2011

ANTONIO FRANCISCO MALHEIROS

OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS INTESTINAIS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO ENTRE OS ÍNDIOS TAPIRAPÉ HABITANTES DA AMAZÔNIA MATO-GROSSENSE, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Malheiros, Antonio Francisco.
Ocorrência de patógenos intestinais e fatores de risco associados à infecção entre índios Tapirapé habitantes da Amazônia Mato-Grossense, Brasil / Antonio Francisco Malheiros. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Jeffrey Jon Shaw.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Diagnóstico de Parasitas e de vetores.

Versão do título para o inglês: The occurrence of intestinal pathogens and risck factors associated with their infection among the Tapirapé indians of the Amazon region of Mato Grosso, Brazil

Descritores: 1. Doenças parasitárias 2. Protozoologia 3. Helmintologia 4. Epidemiologia 5. Biologia Molecular 6. Saúde indígena I. Shaw, Jeffrey Jon II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0208/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Antonio Francisco Malheiros.

Título da Tese: Ocorrência de patógenos intestinais e fatores de risco associados à infecção entre índios Tapirapé habitantes da Amazônia Mato-Grossense, Brasil.

Orientador(a): Jeffrey Jon Shaw.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a):
Assinatura: .....
Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a):
Assinatura: .....
Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a):
Assinatura: .....
Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a):
Assinatura: .....
Nome completo: .....
Instituição: .....

Presidente:
Assinatura: .....
Nome completo: .....
Instituição: .....

Documentos do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICB/USP e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11)3091.7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail:cep@ icb.usp.br

São Paulo, 14 de novembro de 2007.

PARECER 817/CEP

Prezado Senhor

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 80ª Reunião, **analisou** o projeto de sua responsabilidade intitulado: " *Etiologia das gastroenterites entre os índios Tapirapé da aldeia Tapi□itãwa, município de Confresa, Mato Grosso, Brasil* ".

Informo a V.Sa. que pelo fato do mesmo se tratar de estudo na área temática especial "Populações Indígenas", **este será encaminhado à CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) – e que somente após a aprovação final desta, o projeto poderá ser executado.**

Cordialmente,

Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
ANTONIO FRANCISCO MALHEIROS
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 120/2008

Registro CONEP: 14485 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0049.0.019.000-07 **Processo nº 25000.217397/2007-82**
Projeto de Pesquisa: *"Etiologia das gastroenterites entre índios Tapirapé da aldeia Tapi'itãwa, município de Confresa, Mato Grosso, Brasil".*
Pesquisador Responsável: Dr. Antonio Francisco Malheiros
Instituição: USP/Instituto de Ciências Biomédicas/Depto. de Parasitologia
CEP de origem: ICB/USP/SP
Área Temática Especial: População Indígena
Patrocinador: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso

Sumário Geral do Protocolo

A etnia indígena Tapirapé é formada pelo povo Tupi-Guarani da região da serra do Urubu Branco, no Mato Grosso habitantes de duas terras indígenas Urubu Branco no município de Confresa, e Tapirapé/Karajá.

Este projeto de pesquisa é oriundo de um Projeto interinstitucional – UNEMAT/USP/IEC/FUNASA, tem como objetivo investigar gastroenterites de origens parasitária e viral entre os índios da etnia Tapirapé.

O trabalho é centrado na investigação das gastrenterites, buscando estabelecer relação causa-efeito (rotavírus, protozoários intestinais), mas serão investigadas também as verminoses e outras enfermidades de interesse, especialmente mediante a identificação de pessoas doentes.

A população alvo do estudo está estimada em 260 pessoas, incluindo crianças, jovens, adultos e os mais velhos. Vale ressaltar que serão realizadas coletas de material biológico, exames e tratamento em todos os índios que comparecerem na aldeia durante a permanência da equipe do projeto na aldeia.

Os procedimentos previstos para a coleta, exames e tratamento previstos encontram-se descritos em detalhes, quanto aos métodos e técnicas a serem utilizadas. O armazenamento das amostras coletadas será feito no ICB que realizará a genotipagem molecular dos rotavírus. Outros espécimes (sangue, pele) eventualmente coletados para esclarecimento do diagnóstico de índios com suspeita de outras doenças infecciosas serão enviados para a USP.

Amostras conservadas de fezes serão encaminhadas à USP para tipagem molecular de *Entamoeba histolytica, E. coli. Cryptosporidium sp.*

Apresentação do Protocolo

A pesquisa resultará numa tese de doutorado. O projeto encontra-se estruturado, justificado e fundamentado teoricamente. O tema abordado é relevante, considerando que o quadro epidemiológico indígena existente no país, segundo dados da FUNASA, inclui doenças diarréicas entre os problemas de saúde de maior incidência, portanto os resultados alcançados poderão contribuir com os programas de assistência e promoção da saúde indígena possibilitando melhoria nas condições de vida do povo Tapirapé. A metodologia descrita está coerente com os objetivos pretendidos.

Apresenta uma "Ficha Preliminar de Inquerito", que será utilizada no decorrer do estudo.

O cronograma apresentado prevê a duração da pesquisa de 2008 a 2011.

O orçamento detalhado apresenta uma despesa total no valor de R$ 54.923,77(cinqüenta e quatro mil, novecentos e vinte e três reais e setenta e sete centavos) a ser financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT).

Apresenta cópia de um Oficio assinado pelo Cacique da aldeia Tapi'itáwa, em concordância e autorização da liderança indígena e de toda comunidade para a realização da pesquisa.

O *curriculum vitae* do pesquisador e do orientador do estudo evidência a qualificação na área de estudo.

Recomendações

1. A Folha de Rosto está preenchida, contém as assinaturas do responsável pela instituição e do patrocinador, entretanto não contém carimbo nem identificação do responsável pela instituição. Pede-se adequar. - OK
2. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) está escrito em linguagem clara e acessível. O conteúdo é apresentado na forma de questionário cujas perguntas e respostas contemplam as informações essenciais e necessárias a tomada de decisão dos sujeitos envolvidos, conforme estabelece as Resoluções CNS 196/1996 e 304/2000, entretanto no Termo apresentado não há esclarecimentos sobre os procedimentos e os responsáveis pela obtenção do TCLE, aspecto necessário, considerando que se trata de populações indígenas, por mais que haja processos de aculturação, deve também ser estudada a possibilidade de o texto ser adequado "às peculiaridades culturais e lingüísticas dos envolvidos", conforme item IV.2 da Resolução CNS 304/2000. É aconselhável que as explicações metodológicas sejam intermediadas por alguma liderança indígena ou especialistas naquelas culturas possibilitando a plena integração com os sujeitos de pesquisa.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima e encaminhar à CONEP as recomendações cumpridas antes do início do estudo.

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação.**

Brasília, 24 de março de 2008.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

SIPAR - Ministério da Saúde
Registro Número:
25000 059630/2008-87
22/04/08

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
Esplanada dos Ministérios, Bloco "G" – Ed. Anexo, Ala "B" – 4º andar – sala 4369 – CEP 70058-900- Brasília / DF
Tel. : (61) 3315-2951 / Fax : (61) 3226-8453
conep@saude.gov.br – http://conselho.saude.gov.br

OFÍCIO Nº 768 CONEP/CNS/MS Brasília, 22 de abril de 2008.

Ao Senhor:
Drº Luiz Vicente Rizzo
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisas
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP
Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Cep : 05.508-000, Cidade Universitária São Paulo SP

Assunto: Cumprimento das recomendações do Parecer 120/2008.

Registro CONEP 14485: *"Etiologia das gastroenterites entre índios Tapirapé da aldeia Tapi'itãwa, município de Confresa, Mato Grosso, Brasil".*

Senhor Coordenador,

1. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP comunica que as Recomendações do Parecer Nº **120/2008**, que estavam pendentes, foram atendidas, por meio da documentação recebida por ofício CEPSH.045.08 LVR/mcgn, de 10/04/2008.

Atenciosamente ,

Aparecida de Fátima Pianta F. Lino
Secretária-Executiva
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP/CNS/MS

jf

C.E. P.H.H. - ICB/USP
Recebido em 16/06/08

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733- telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEPSH. 097.08
LVR/mcgn

São Paulo, 17 de junho de 2008.

Prezado Senhor,

Em adendo ao Parecer 817/CEP, datado de 14.11.07, referente ao projeto intitulado: *"Etiologia das gastroenterites entre os índios Tapirapé da aldeia Tapi□itãwa, município de Confresa, Mato Grosso, Brasil "*, informo que, considerando o **Parecer Nº 120/2008** da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, **e Oficio nº 768 CONEP/CNS/MS**, cópia em anexo, o mesmo foi aprovado por esta Comissão em sua 85ª reunião, realizada em 17.06.08.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

Cordialmente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.
ANTONIO FRANCISCO MALHEIROS
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Documentação acerca da autorização da FUNAI para ingresso em Terras Indígenas

Fundação Nacional do Índio
Coordenação-Geral de Estudos e Pesquisas
SEPS 702/902, bloco A, sala 102. Brasília – DF CEP70390-025
TELEFAX (61) 3321-0613/ 3313-3606 E-mail: cgep@funai.gov.br

Ofício nº 128 /CGEP/08

Brasília, 28 de maio de 2008.

Ao Senhor
Antonio Francisco Malheiros
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – ICB II
Depto. De Parasitologia / USP
Cidade Universitária
05508 - 000 São Paulo - SP

Assunto: ingresso em terra indígena (Proc. nº.2433/07)

1. Cumprimentando-o, estamos encaminhando original da Autorização para Ingresso em Terra Indígena nº. 51 /CGEP/08 (em anexo), concedida a Vossa Senhoria e equipe, para ingressar na TI Urubu Branco, com o objetivo de desenvolver o projeto de pesquisa intitulada "Etiologia das gastroenterites entre índios Tapirapé da aldeia Tapi'itãwa, município de Confresa, Mato Grosso, Brasil", sob sua coordenação.

Atenciosamente,

Cláudio dos Santos Romero
Coordenador-Geral de Estudos e Pesquisas

G:\MAES\Antonio F Malheiros.doc

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO

AUTORIZAÇÃO PARA INGRESSO EM TERRA INDÍGENA | **Nº 051 /CGEP/08**

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Antonio Francisco Malheiros	**Processo: nº.2433/07**
Nacionalidade: brasileira	**Identidade: RG nº.479971 SSP MT**
Instituição/Entidade: Universidade do Estado de Mato Grosso, USP, Instituto Evandro Chagas	
Patrocinador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Mato Grosso – FAPEMAT	

OBJETIVO DO INGRESSO

Desenvolver o projeto de doutorado intitulado "Etiologia das gastroenterites entre os índios Tapirapé da aldeia Tapi'itãwa, município de Confresa, Mato Grosso, Brasil".

EQUIPE DE TRABALHO

Nome	Nacionalidade	Identidade
Jeffrey Jon Shaw	ingles	RNE W184473-X
Larissa Maria Scalon Lemos	brasileira	RG nº.2255384 SSP MG
Cristina Teodoro de Melo	brasileira	RG nº.0534174-4 SJ MT
Sebastião Aldo da Silva Valente	brasileira	CRF-PA/AP 786
Alexandre da Costa Linhares	brasileira	RG nº.1568554 SSP PA

Terra Indígena: Urubu Branco	**Etnia: Tapirapé**
Administração Regional: Araguaia	**Posto Indígena: Tapirapé**

VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO

Início: julho de 2008	**Término: julho de 2011**

OBSERVAÇÕES

*** Remeter à Funai/CGEP duas cópias da monografia, relatórios, artigos e outras produções oriundas dos estudos realizados.**

*** Esta autorização não inclui cessão de uso de imagem e som de voz dos índios, nem acesso a conhecimentos tradicionais associados a biodiversidade.**

Autorizo:

Brasília, 21 de maio de 2008.

Presidente da FUNAI

Márcio Augusto Freitas de Meira
Presidente da Funai

Documento de autorização do Cacique Tapirapé

TERRA INDÍGENA URUBU BRANCO
ETNIA TAPIRAPÉ - CONFRESA-MT

Ofício nº 02/2010 Confresa-MT, 13 de setembro de 2010.

Prezado Prof. Antonio Francisco Malheiros,

Venho através deste, informar-lhe que a liderança indígena e toda comunidade Tapirapé da Terra Indígena Urubu Branco, concorda e autoriza a publicação de dados, incluindo registros fotográficos e audiovisuais, em eventos e revistas de âmbito técnico, científico e educacional, coletados durante a execução do Projeto de Pesquisa "*Etiologia das gastroenterites entre os índios Tapirapé da aldeia Tapi'itãwa, município de Confresa, Mato Grosso, Brasil*", em nossa comunidade, coordenado pelo senhor e outros pesquisadores, que conta também com a minha participação Xario'i Carlos Tapirapé, e do Professor Kamoriwa'i Elber Tapirapé.

Sabemos que este Projeto faz parte do doutorado que o senhor está cursando na USP, sob orientação do Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw na área de Parasitologia, portanto esta autorização também se aplica a sua Tese.

Atenciosamente,

Xario'i Carlos Tapirapé
Cacique da Aldeia Tapi'itãwa
Confresa-MT

Aos meus pais Evanira e Ary Malheiros meus maiores exemplos de dedicação, força e amor a VIDA.

Ao Francis pelo incondicional apoio em todos os momentos desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Jeffrey Jon Shaw pela calorosa acolhida nesta empreitada e por acreditar em meu trabalho. Seus ensinamentos foram essenciais e serão sempre lembrados na minha vida profissional, assim como sua amizade, que será guardada com muita estima e apreço. Minha imensa gratidão!

Ao Francis pelo companheirismo, paciência e compreensão nos momentos difíceis deste trabalho, e por ter acreditado nesta jornada com muita dedicação, encorajamento e apoio incansável, bem como pelos maravilhosos momentos vividos em São Paulo. Sou eternamente grato!

Aos meus pais agradeço por tudo em minha vida. Principalmente por terem proporcionado uma excelente educação a toda a família e, por terem nos ensinado o amor a vida e respeito ao próximo. Amo vocês meus “velhos”.

Aos meus irmãos Mário, Maurício, Ary Jr. e Marcelo Malheiros, aos meus sobrinhos e sobrinhas, as minhas cunhadas, tios, tias, primos e primas, afilhados e afilhadas, comadres e compadres e todos os amigos por acreditarem no meu trabalho e, pelo amor e carinho.

A Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) pela liberação para qualificação profissional.

A Universidade de São Paulo – USP pela acolhida junto ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Parasitologia do ICB.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão das bolsas de estudos em São Paulo e em Londres.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) e da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA).

Ao VPS/FMVZ/USP pela importante colaboração nos trabalhos parasitários e moleculares, em espeical ao professor Dr. Rodrigo M. Soares e Dr. Paulo E. Brandão.

A London School of Tropical Medicine and Hygiene por ter me acolhido no doutorado-sanduíche em Londres, em especial ao Dr. Graham Clark.

Ao Hospital Universitário da USP, em especial ao grande amigo Valdir pelos ensinamentos, João, Luiz, Elaine, Lilian, Ivo, Marisa, Maria e Henriqueta pelo carinho e amizade.

Ao Instituto Evandro Chagas – IEC, em especial a Dra. Lourdes Garcez pela amizade e apoio imenso durante a fase inicial do Projeto e, por ter aberto as portas do IEC, ao Dr. Alexandre Linhares por ter me recebido junto a Secção de Virologia do IEC, e aos colegas e amigos do IEC pela colaboração nos trabalhos envolvendo Rotavírus e Adenovírus, em especial a Euzeni.

A Universidade Federal de São João del-Rei, em especial a Profa. Dra. Eliana da Rocha da pelas análises imunoenzimáticas para *E. histolytica*.

A Profa. Dra. Marta Geraldes Teixeira pela amizade, apoio e cedência da bolsa de estudo do CNPq pertencente ao seu projeto.

A todos os membros da banca de qualificação Dr. Marcelo F. Urbano, Dra. Solange M. Gennari e Dr. Ricardo A. Dias pelas relevantes contribuições para a tese.

A minha grande amiga e colega da UNEMAT Larissa Scalon Lemos pela enorme contribuição durante os árduos trabalhos de campo e, de laboratório em Confresa-MT. Muito Obrigado!

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Parasitologia do ICB II/USP Dr. Leandro Garrido, Alexandre La Luna, Lucas, Carlos, Ana Paula, Júlia, Fernando e Ricardo pela amizade e acolhida junto ao EPIGEN/USP.

Ao Prof. Dr. Henrique Krieger pela cedência de um espaço em seu laboratório e pelas boas conversas durante os almoços e cafés com o grupo.

A todos os docentes, funcionários e ex-funcionários do Departamento de Parasitologia/ICBII/USP, em especial a Ângela, Eladir, Wilma, Sandra, Sabrina, Silvia, Zezé, Alexandre e Dalva pela amizade e carinho.

A Dra. Solange M. Gennari pela amizade, apoio, incentivo e contribuições em todas as etapas da tese.

Aos meus colegas e amigos do VPS/FMVZ/USP pela acolhida e amizade, em especial a Juliana Martins, Camila Oliveira, Iracema Barros, Sueli dos Santos, Carolina Alejo, Mikaela Funada e Michele Sercundes pelas importantes contribuições e ensinamentos durante as técnicas moleculares.

Aos funcionários do VPS/FMVZ/USP, em especial ao Danival, Renatinho, Alexandre, Sandrinha, Carol e Pedrinho pela amizade.

A Sheila Oliveira do pela amizade, carinho e pelos seqüenciamentos junto ao LABMAS/FMVZ/USP.

A Iracema Barros pela amizade, carinho e, pelas contribuições e ensinamentos nas edições das sequências e análises filogenéticas.

A Giselle Ayres pela amizade, afeto e apoio em todos os momentos e pelas grandes contribuições na correção da tese.

Ao amigo Guilherme Braga pelas valiosas análises estatísticas e confecção do mapa.

Ao Dr. José Ricardo do Instituto Butantã pelos empréstimos dos *primers* durante os trabalhos no LABMAS/FMVZ/USP.

Ao Dr. Rune Stensvold do Statens Serum Institut na Dinamarca pela amizade e por ter me ensinado as práticas moleculares durante os trabalhos em Londres.

A Mohammed Alfellani da London School of Tropical Medicine and Hygiene pelas contribuições nas extrações de DNA.

Aos meus amigos Artemir, Acácio, Alessandro e Reginaldo pelo incentivo e pelos bons momentos vivenciados dentro e fora da USP.

A Secretaria de Saúde de Confresa-MT pela cedência dos espaços para montagem do laboratório, em especial a minha amiga Sueli Barbaresco, Pe. Alex e Danilo

Aos grandes profissionais e amigos Agenora, Cristina Melo, Dione, Irenildes, Poliana, Iranildes e Sérgio pela colaboração nos trabalhos de campo e laboratório em Confresa-MT.

A médica Ângela Sander pela amizade e grandes contribuições nos trabalhos de campo, medicando todos os indígenas analisados neste estudo.

A FUNASA de Confresa-MT pela viabilização de transporte as aldeias Tapirapé e, aos motoristas pela paciência e valiosas companhias.

Ao extraordinário e lutador povo Tapirapé pela amizade e acolhida nesta difícil tarefa em prol da saúde da comunidade, em especial aos agentes de saúde indígenas.

A toda liderança Tapirapé, em especial ao cacique Xirao'i Carlos Tapirapé e ao Prof. Kamarowia'i Elber Tapirapé pelas valiosas contribuições durante os trabalhos nas seis aldeias.

Aos amigos Luis e Nice por terem me apresentado, incentivado e mostrado a importância de conhecer de perto a saúde do povo Tapirapé.

As irmãzinhas de Jesus, moradoras da aldeia Urubu Branco, Odila, Veva e Beth pelo incentivo, informações, ensinamentos e pelas longas conversas durante os trabalhos de campo.

Aos meus grandes amigos Marcos e Rita Borges e Ivete Cevallos pela primeira acolhida em São Paulo.

Aos meus amigos Carlos Eduardo e Fátima, Arlindo e Eliane pela acolhida durante os trabalhos em Belém, por intermédio dos meus amigos e professores Germano Guarim e Vera Guarim (*in memorian).*

A bibliotecária do ICB Valéria Pedullo pelas correções e formatação da tese de acordo com as normas da ABNT.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste importante trabalho para minha vida.

Justamente por todos nós desejarmos a felicidade, devemos aspirar à sabedoria.

(Sócrates)

RESUMO

MALHEIROS, A. F. **Ocorrência de patógenos intestinais e fatores de risco associados à infecção entre os índios Tapirapé habitantes da Amazônia mato-grossense, Brasil.** 2011. 166 f. Tese. Doutorado em Parasitologia. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

A prevalência de patógenos intestinais e fatores de risco associados com a infecção foram estudados numa população de 550 habitantes indígenas pertencentes a seis aldeias da etnia Tapirapé, habitantes do baixo Araguaia na região da Amazônia do Estado de Mato Grosso. Dentre os patógenos intestinais pesquisou-se a presença de adenovírus, rotavírus e parasitas intestinais. Quatro coletas foram realizadas, sendo duas no período de julho a agosto de 2008 e 2009, época de seca na região, e outras duas entre os meses de janeiro e fevereiro de 2009 e 2010, período chuvoso no local. Dados clínicos e epidemiológicos foram registrados durante as coletas. A presença de parasitas intestinais em amostras de fezes foi determinada utilizando as técnicas de Hoffman e Ritchie e a coloração de Kinyoun a frio. Além dessas técnicas uma modificação da técnica Sheather foi usada para detectar *Giardia intestinalis*. Um total de 1526 amostras de fezes foi coletado. Destas, 83,35% apresentaram ao menos um parasita intestinal e 65% tinham mais de um parasita. O parasita mais prevalente foi *Entamoeba coli* (827/1526 - 54,19%), seguido por *Endolimax nana* (825/1526 - 54,06%), *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (581/1526 - 38,07%), *Giardia intestinalis* (287/1526 - 18,81%) e *Blastocystis* spp. (257/1526 - 16,84%). Entre os helmintos o mais prevalente foi *Ancylostoma* spp. (293/1526 - 19,20%), seguido de *Hymenolepis nana* (129/1526 - 8,45%), *Strongyloides stercoralis* (66/1526 - 4,32%) e *Ascaris lumbricoides* (18/1526 - 1,18%). Kits comerciais de imunoensaio foram usados para detectar *Cryptosporidium*, rotavírus e adenovírus. Usando esses métodos não houve nenhuma ocorrência desses patógenos em nenhuma das quatro coletas. O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*, e das 60 amostras analisadas, apenas quatro foram positivas para *E. histolytica*. DNA foi extraído a partir de cistos *G. intestinalis* e *Blastocystis* spp., para a caracterização molecular. Das 102 amostras diagnosticadas para G. *intestinalis* por meio da técnica Sheather, 51 foram positivas na PCR. Deste total, 30 foram sequenciadas através do gene β-Giardina e, 35 amostras seqüenciadas utilizando o gene *gdh*. Apenas os assemblages A e B de *G. intestinalis* foram encontrados, sendo que o assemblage A foi a mais prevalente (78,47%). A caracterização molecular de *Blastocystis* spp. demonstrou que o subtipo 1 foi o mais dominante, seguido pelos subtipos 2 e 3. Entre as coletas todos os índios que possuíam resultados dos exames coproparasitológicos positivos receberam tratamento, entretanto a quimioterapia não foi um método eficaz de redução da prevalência de devido do alto nível de re-infecção. A instalação de saneamento básico e água potável, bem como intervenção educacional provavelmente causariam maior impacto na redução da prevalência de parasitas intestinais entre os Tapirapé.

Palavras-chave: Parasitas intestinais. Diagnóstico coproparasitológico. Caracterização molecular. Epidemiologia. Índios Tapirapé. Amazônia mato-grossense. Mato Grosso e Confresa.

ABSTRACT

MALHEIROS, A. F. **The occurrence of intestinal pathogens and risk factors associated with their infection among the Tapirapé Indians of the Amazon region of Mato Grosso, Brazil.** 2011. 166 p. Thesis. Doctor in Parasitology. São Paulo: Institute of Sciences Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2012.

The prevalence of intestinal pathogens and risk factors associated with their infection was studied in a population of 550 indigenous inhabitants belonging to six Tapirapé villages that are located in the lower Araguaia Amazon region of Mato Grosso State. Four collections were made, two in the dry season, from July to August, 2008 and 2009 and two during the rainy season, from January and February of 2009 and 2010. A total of 1526 fecal samples were collected. The presence of the following intestinal pathogens was investigated, rotavirus, adenovirus and intestinal parasites. Clinical and epidemiological data were also recorded during the study. Parasite presence in faecal samples was determined using the Hoffmann and Ritchie techniques and Kinyoun cold staining. Besides these techniques a modification of the Sheather technique was used to detect *Giardia intestinalis*. Of these as 83.35% had at least one intestinal parasite and 65% had more than one parasite. The most prevalent parasite was *Entamoeba coli* (827/1526 - 54.19%) followed by *Endolimax nana* (825/1526 - 54.06%), *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (581/1526 - 38, 07%), *Giardia intestinalis* (287/1526 - 18.81%) and *Blastocystis* spp. (257/1526 - 16.84%). Among the helminths the most prevalent was *Ancylostoma* spp. (293/1526 -19.20%), followed by *Hymenolepis nana* (129/1526 - 8.45%), *Strongyloides stercoralis* (66/1526 - 4.32%) and *Ascaris lumbricoides* (18/1526 - 1.18%). Commercial Immunoassay kits were used to detect *Cryptosporidium*, rotavirus and adenovirus. Using these methods there was no evidence of *Cryptosporidium*, rotavirus and adenovirus infections during the four collections. The enzyme immunoassay (ELISA) was used to differentiate *E. histolytica* from *E. dispar* but only four samples were positive for *E. histolytica* from 60 samples analyzed. DNA for molecular characterization was extracted from *G. intestinalis* cysts and *Blastocystis* spp. Of the 102 *G. intestinalis* samples diagnosed by the Sheather technique, 51 were positive by PCR. Of this total the gene β-Giardina gene was sequenced for 30 sample and and the GDH gene for 35. Only assemblages A and B were found and assemblage A (78.47%) was the most prevalent. The molecular characterization of *Blastocystis* spp. demonstrated that subtype 1 was dominant, followed by subtypes 2 and 3. All indigenous individuals who had positive results for known parasitic pathogens were treated, but chemotherapy did not prove to be an effective control method due to the high level of re-infection. Installation of sanitation, clean drinking water as well as educational intervention are likely to the most efficient measures in reducing the prevalence of intestinal parasites among the Tapirapé.

Key words: Intestinal parasites. coproparasitological Diagnosis. Molecular Characterization. Epidemiology. Indian Tapirapé. Amazon grossense. Mato Grosso and Confresa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa com a distribuição das Terras indígenas no Brasil 26
Figura 2 – Distribuição das Terras Indígenas no Estado do Mato Grosso 27
Figura 3 – Localização das Terras Indígenas Tapirapé e as principais vias de acesso 30
Figura 4 – Prevalência de protozoários e helmintos intestinais entre os índios brasileiros distribuída por biomas, com base nas publicações científicas entre 1981-2011 47
Figura 5 – Vista aérea da aldeia Tapi'itawã da etnia Tapirapé, Confresa-MT 49
Figura 6 – Banheiro localizado na aldeia indígena Urubu Branco, Confresa-MT 50
Figura 7 – Poço artesiano em TI Tapirapé, Aldeia Sapeva, Porto Alegre do Norte-MT 52
Figura 8 – Localização geográfica das seis aldeias Tapirapé, Amazônia mato-grossense 58
Figura 9 – Frequência de parasitas intestinais observadas nas 1526 amostras analisadas nas seis aldeias Tapirapé 72
Figura 10 – Cistos de *Blastocystis hominis* em lugol pela técnica de Ritchie. Aumento 400x 74
Figura 11 – Cistos de *Giardia intestinalis* em lugol pela técnica de Ritchie. Aumento 400x 75
Figura 12 – Cistos de *E. histolytica/dispar* (a) e *E. coli* (b) em lugol pela técnica de Ritchie. Aumento 400x 75
Figura 13 – Ovos de *Hymenolepis nana* em lugol pela técnica de Hoffmann. Aumento 400x 76
Figura 14 – Ovos de ancilostomídeo (a) e larva de *Strongyloides stercoralis* (b) em lugol pela técnica de Hoffmann. Aumento 400x 76
Figura 15 – Frequência dos parasitas intestinais analisados por aldeia durante a 1ª coleta 79
Figura 16 – Frequência dos parasitas intestinais analisados por aldeia durante a 2ª coleta 80
Figura 17 – Frequência dos parasitas intestinais analisados por aldeia durante a 3ª coleta 81
Figura 18 – Frequência dos parasitas intestinais analisados por aldeia durante

a 4ª coleta 82
Figura 19 – Freqüência dos parasitas intestinais observados nos participantes de todas as quatro coletas 83
Figura 20 – Relação parasita intestinal com época do ano nas quatro coletas 84
Figura 21 – Relação parasita intestinal com época do ano nos participantes das quatro coletas 85
Figura 22 – Distribuição da quantidade de parasitas intestinais na primeira coleta em todas as aldeias 88
Figura 23 – Distribuição da quantidade de parasitas intestinais na segunda coleta em todas as aldeias 88
Figura 24 – Distribuição da quantidade de parasitas intestinais na terceira coleta em todas as aldeias 89
Figura 25 – Distribuição da quantidade de parasitas intestinais na quarta coleta em todas as aldeias 89
Figura 26 – Distribuição por sexo e idade das amostras positivas para *E. histolytica/dispar* nas quatro coletas realizadas entre os Tapirapé 90
Figura 27 – Distribuição por sexo e idade das amostras positivas para *Giardia intestinalis* nas quatro coletas realizadas entre os Tapirapé 91
Figura 28 – Protozoários intestinais diagnosticados em fezes diarréicas nas quatro coletas 92
Figura 29 – Helmintos diagnosticados em fezes diarréicas nas quatro coletas 92
Figura 30 – Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene *gdh* provenientes de isolados de *Giardia intestinalis* 95
Figura 31 – Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene β-*giardina* provenientes de isolados de *Giardia intestinalis* 96
Figura 32 – Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene SSUrRNA provenientes de isolados de *Blastocystis* spp. 98
Quadro 1 – População indígena Tapirapé por município e aldeia, Mato Grosso 29
Quadro 2 – Distribuição da população indígena nas seis aldeias da etnia Tapirapé por faixa etária e por número de casas do Estado de Mato Grosso 49
Quadro 3 – Relação das seqüências de β-giardina (*bg*) e Glutamato desidrogenase (*gdh*), retiradas do GenBank para comparação com as amostras deste estudo 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos publicados sobre ocorrência de enteroparasitas em comunidades indígenas brasileiras, no período de 1981 a 2011 36

Tabela 2 – Número de exames coproparasitológicas realizadas por aldeia nas quatro coletas entre 2008 e 2010 na Terra Indígena Urubu Branco, etnia Tapirapé, Mato Grosso 73

Tabela 3 – Prevalência dos protozoários intestinais por aldeia nas quatro coletas realizadas entre 2008 e 2010 na Terra Indígena Urubu Branco, etnia Tapirapé, Mato Grosso 77

Tabela 4 – Prevalência dos helmintos por aldeia nas quatro coletas realizadas entre 2008 e 2010 na Terra Indígena Urubu Branco, etnia Tapirapé, Mato Grosso 78

Tabela 5 – Relação da consistência fecal observada nas amostras em todas as coletas 86

Tabela 6 – Distribuição das amostras em relação ao aspecto fecal analisado em todas as coletas 86

Tabela 7 – Frequência dos parasitas intestinais observados nas quatro coletas 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	desorribonuleotídeo trifosfatado
et al.	colaboradores
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FMVZ	faculdade de medicina veterinária e zootecnia
HCl	ácido clorídrico
LABMAS	laboratório de biologia molecular aplicada e sorologia
M	molar
mg	miligrama
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
pb	pares de base
PBS	salina em tampão fosfato
pH	concentração de hidrogênio iônico
Pk	proteinase K
rRNA	ácido ribonucléico ribossômico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNPs	polimorfismos de Base Única
TBE	tris borato EDTA
TE	tampão tris-EDTA
TRIS	hidroximetil aminometano
U	unidades
VPS	departamento de epidemiologia experimental aplicada às zoonoses
µL	microlitros
µg	microgramas
Xg	vezes aceleração da gravidade terrestre (9,8 m s^2)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
1.1 Povos indígenas... 26
1.2 A etnia Tapirapé. 27
1.3 Saúde indígena 30
1.4 O sistema de saúde indígena Tapirapé 31
1.5 Patógenos intestinais na população indígena 32
1.6 Potencial zoonótico dos parasitas intestinais 41
1.7 Importância e utilidade do diagnóstico aplicado às parasitoses intestinais 42
1.8 Eco-epidemiologia e fatores de risco x parasitoses intestinais entre indígena 46
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 53
3 MATERIAL E MÉTODOS 57
3.1 Área de estudo e público-alvo 58
3.2 Metodologia. 59
3.2.1 Período de coleta do material biológico. 59
3.2.2 Inquérito clínico-epidemiológico e dados demográficos. 59
3.2.3 Amostras fecais. 60
3.2.4 Exames parasitológicos e virológicos de fezes. 60
3.3 Ensaio imunoenzimático - ELISA. 61
3.4 Divulgação dos resultados. 62
3.5 Tratamento. 62
3.6 Conservação e armazenamento das amostras coletadas. 63
3.7 Diagnóstico molecular. 63
3.7.1 *Giardia intestinalis*. 63
3.7.2 *Blastocystis* spp. 68
3.8 Análise dos dados. 69
3.9 Capacitação. 69
3.10 Aspectos éticos. 70
4 RESULTADOS 71
4.1 Análises coproparasitológicas 72
4.2 Teste imunocromatográfico 93
4.2.1 Rotavírus e adenovírus 93
4.2.2 *Cryptosporidium* spp. 93

4.3 Ensaio imunoenzimático - ELISA 93
4.3.1 *Entamoeba histolytica/dispar* 93
4.4 Diagnóstico molecular 94
4.4.1 *Giardia intestinalis* 94
4.4.1.1 Glutamato desidrogenase - *gdh* 94
4.4.1.2 β-Giardina - *bg* 95
4.4.2 *Blastocystis* spp. 97
5 DISCUSSÃO 99
5.1 Pesquisa coproparasitológica 100
5.2 Teste imunocromatográfico 103
5.3 Ensaio imunoenzimático 104
5.4 Caracterização molecular 105
5.4.1 *Giardia intestinalis* 105
5.4.2 *Blastocystis* spp. 106
5.5 Fatores eco-epidemiológicos 108
5.6 Recomendação 113
6 CONCLUSÃO 115
REFERÊNCIAS 117
ANEXOS
ANEXO A 135
ANEXO B 139
ANEXO C 141
ANEXO D 143
ANEXO E 149

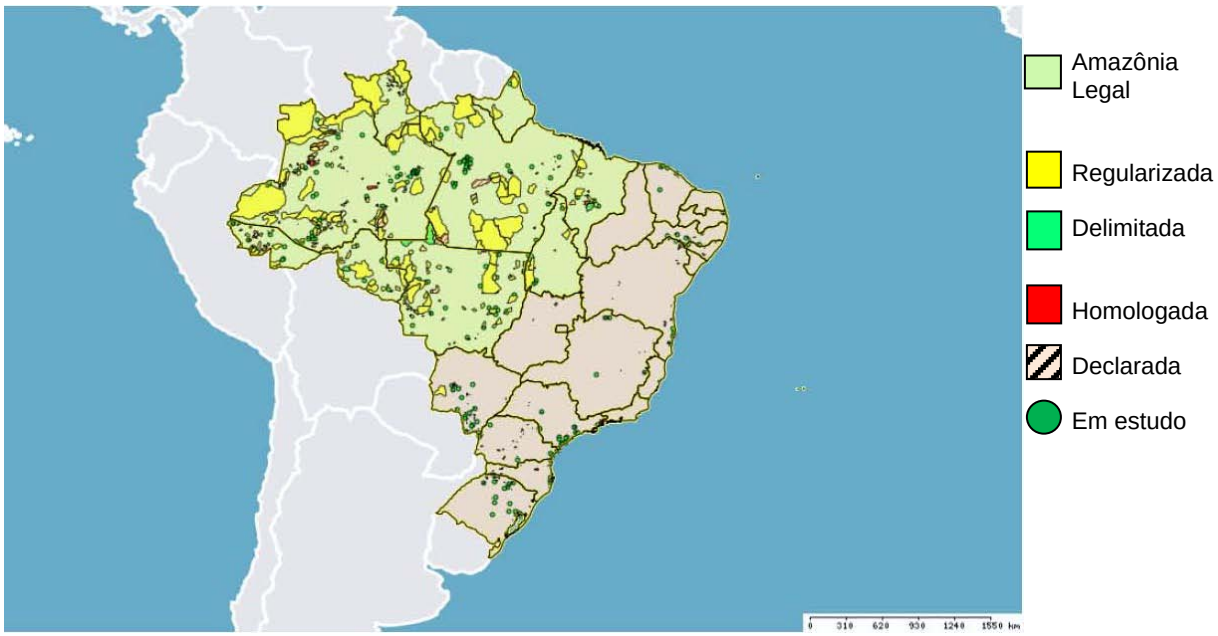
1 INTRODUÇÃO

1.1 Povos Indígenas

No mundo existem aproximadamente 370 milhões de índios que habitam 70 países do ártico norte ao pacífico sul (WHO, 2007). Nas Américas a população indígena atinge cerca de 43 milhões de pessoas (WHO, 2007). Já a população indígena brasileira é estimada em aproximadamente 734.137 pessoas, pertencentes a 225 etnias, falantes de mais de 180 línguas identificadas (FUNASA, 2011; IBGE, 2010).

De acordo com o levantamento realizado pela Fundação Nacional do Índio (FUNAI), as comunidades indígenas brasileiras habitam cerca de 107.000.000 hectares, distribuídos em 653 Terras Indígenas (TI) regularizadas, homologadas, declaradas ou em estudo pela FUNAI. Deste total, 98% estão localizadas na Amazônia Legal, equivalente a 13% do território nacional (FUNAI, 2010). A Amazônia Legal, extende-se por estados da região Norte (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), da região Nordeste (Maranhão) e Centro-oeste (Mato Grosso), destacado na grande área verde da figura 1,

Figura 1 – Mapa com a distribuição das Terras Indígenas no Brasil



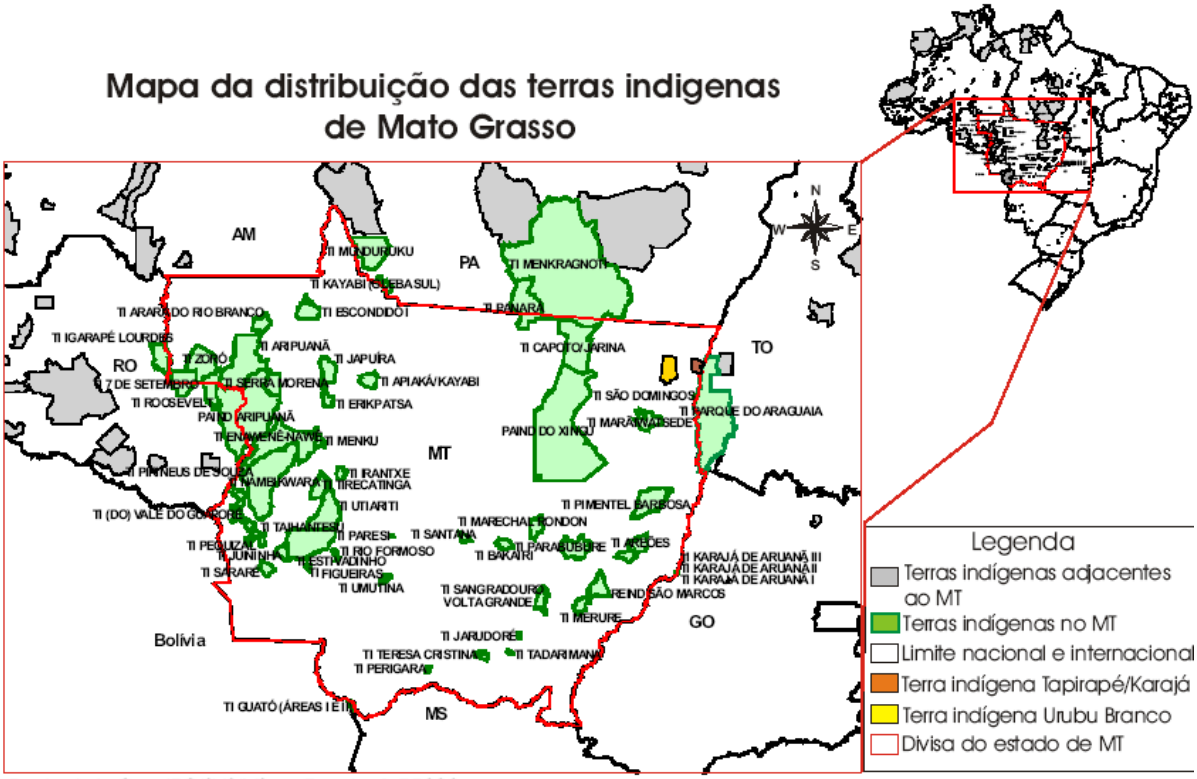
Projeção Geográfica - datum SAD-69

FONTE: adaptado de FUNAI (2011)

De acordo com a FUNAI o Estado do Mato Grosso possui uma dos maiores contingentes indígenas do país, com uma população de 23.123 índios, pertencentes a 42 etnias, distribuídas em 59 Terras Indígenas, destacadas na figura 2 (FUNAI, 2011). Dentre essas etnias, encontram-se os índios Tapirapé, com os quais foi desenvolvido este estudo.

Cada um destes povos tem sua própria maneira de compreender o mundo e de se organizar em seu território, o que se manifesta em suas diferentes culturas e na relação com o meio ambiente e ocupação de seu território.

Figura 2 - Distribuição das Terras Indígenas no Estado do Mato Grosso



1.2 A etnia Tapirapé

Os Tapirapé são um grupo indígena originário do baixo curso dos rios Tocantins e Xingu, onde viviam até o século XVII. Chegaram à região marginal ao médio curso do Araguaia por volta da segunda metade do século XVIII. Sua presença é anotada ao norte do rio Tapirapé a partir desse mesmo século (BALDUS, 1970).

De acordo com Wagley (1988) desde o início do século XX, o território dos Tapirapé era compreendido pela margem esquerda do rio Araguaia, até pouco acima da atual divisa dos estados de Mato Grosso e Pará. Eram aproximadamente 1.500 pessoas vivendo em cinco aldeias, todas localizadas próximas aos tributários da margem esquerda do Araguaia, sendo elas (do norte para o sul): *Anapatawa*, *Xexotawa* (grafado "Chichutawa"), *Moo'ytawa* ("Moutawa"), *Makotawa* ("Mankutawa"), e *Tapi'itawa* ("Tampiitawa").

Não obstante, esse considerável contingente sofreu uma depopulação, sobretudo em decorrência de ataques sofridos pelos índios Kayapó, forçando os Tapirapé a abandonarem suas aldeias setentrionais, no sul do Pará e norte de Mato Grosso, próximo aos municípios da atual Conceição do Araguaia-PA e Vila Rica-MT. Assim sendo, passaram a se concentrar nas proximidades de serras, matas e campos do médio curso do rio Tapirapé, já em terras matogrossenses e, a intensificar a aproximação com os índios Karajá. Esses contatos intermitentes oscilavam entre a cordialidade e hostilidade (WAGLEY, 1988).

Além dos confrontos com outros grupos indígenas, a população também sofreu com os surtos de malária e gripes, chegando a quase dizimar a etnia, diminuindo de 1.500 para 51 índios em meados da década de 1940. Com a diminuição da população, os remanescentes passam a se concentrar na aldeia de Tapi'itawa, procurando contato com a população regional e distância dos pontos setentrionais de seu território, permanentemente atacados por grupos Kayapó (BALDUS, 1970).

Após esses episódios, a Missão das Irmãzinhas de Jesus, a pedido do bispo dominicano de Conceição do Araguaia, instala-se junto à aldeia da barra do rio Tapirapé em 1951, passando a dar assistência aos Tapirapé na área de saúde. Na década de 1970 um casal leigo da equipe da pastoral indigenista da prelazia de São Félix do Araguaia iniciou um projeto de alfabetização na língua nativa, sendo esses fatores de suma importância para recuperação demográfica dos remanescentes (WAGLEY, 1988).

A partir de então, os Tapirapé, formados pelo povo Tupi-Guarani, passaram a habitar a região da serra do Urubu Branco, no Mato Grosso. Contudo, novos problemas sugiram na região em decorrência do início do projeto de "expansão agrícola" para ocupação da Amazônia brasileira, implantado pelo governo federal, durante o regime militar. Vários conflitos entre posseiros e grandes fazendas

obrigaram os índios a despojarem de suas terras em prol do “avanço econômico” no Araguaia.

Na década de 1980, a FUNAI deu início ao processo de homologação das TI Tapirapé, gerando a TI Tapirapé/Karajá, ocorrido em 24/03/1983 e, a TI Urubu Branco homologada em 08/09/1998 (ISA, 2010).

As duas TI perfazem um total de 233.699 hectares, sendo que a TI Urubu Branco, localizada no município de Confresa-MT (10º38’689”S 51º33’942”W), é a de maior extensão, com 167.533 ha. Já a TI Tapirapé/Karajá possui uma extensão territorial de 66.166 ha (IBGE, 2010).

Atualmente o povo Tapirapé conta com uma população de aproximadamente 652 indígenas, que habitam 12 aldeias distribuídas em três municípios do Mato Grosso (quadro 1). Nota-se na tabela que há apenas um habitante na aldeia Aiporé – kururu, um na aldeia Jatobá e um desaldeado, isto é, não é morador de uma aldeia indígena.

Quadro 1 - População indígena Tapirapé distribuída por município e aldeia, Mato Grosso

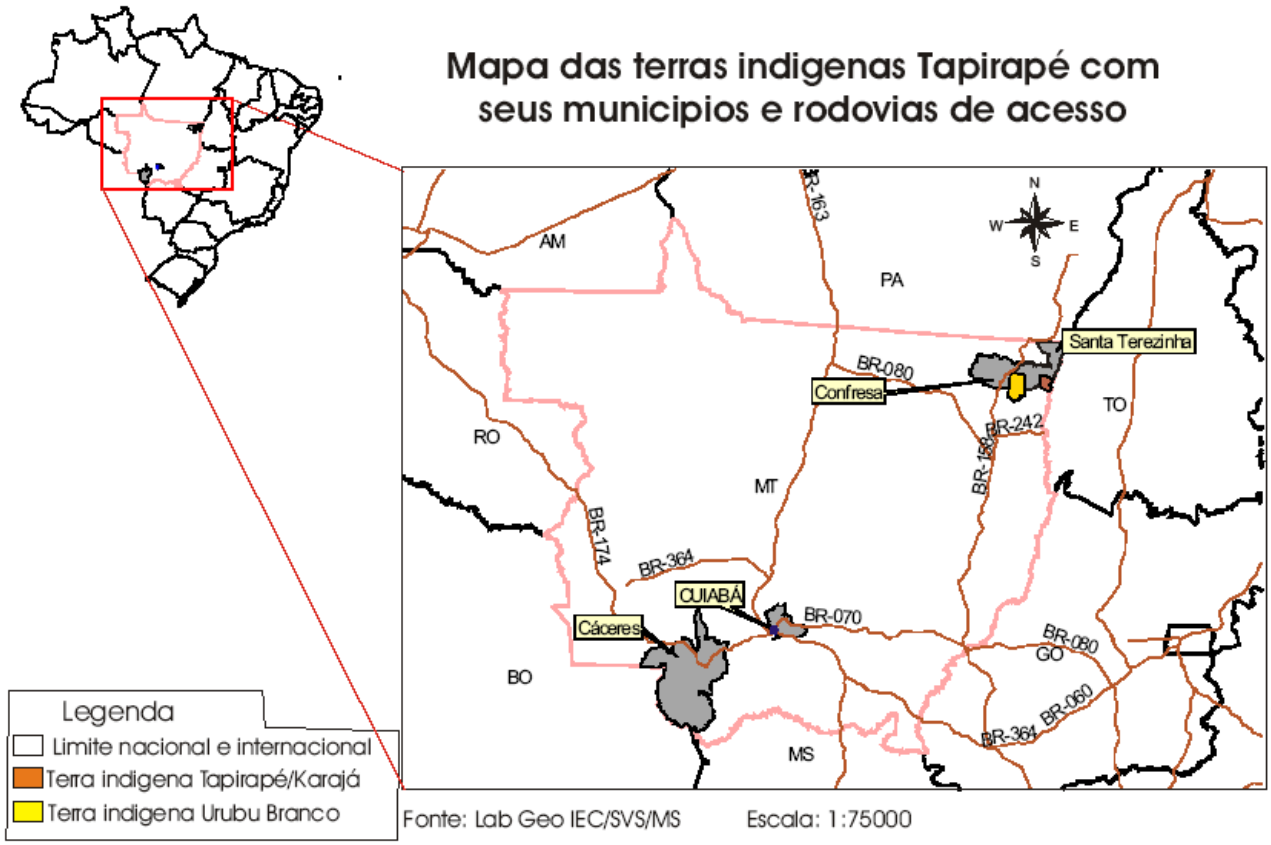
Terra Indígena (TI)	Município da Aldeia	Aldeia	Etnia	População
Urubu Branco	Confresa	Buriti II	Tapirapé	38
Urubu Branco	Confresa	Tapi'itãwa (Urubu-Branco)	Tapirapé	274
Urubu Branco	Confresa	Tapiparanytãwa (Córrego da Onça)	Tapirapé	78
Urubu Branco	Porto Alegre do Norte	Towajaatãwa (Sapeva)	Tapirapé	61
Urubu Branco	Porto Alegre do Norte	Wiriaotãwa (Codebra)	Tapirapé	47
Urubu Branco	Santa Terezinha	Akara'itãwa (Santa Laura)	Tapirapé	53
Tapirapé/Karajá	Santa Terezinha	Hawalorã	Tapirapé/Karajá	30
Tapirapé/Karajá	Santa Terezinha	Itxala	Tapirapé/Karajá	16
Tapirapé/Karajá	Santa Terezinha	Majtyri’tawa	Tapirapé/Karajá	52
Tapirapé/Karajá	Santa Terezinha	Desaldeados	Tapirapé/Karajá	1
Tapirapé/Karajá	Marcelândia	Aiporé – kururu	Tapirapé/Karajá	1
Tapirapé/Karajá	Peixoto de Azevedo	Jatobá	Tapirapé/Karajá	1
TOTAL				652

FONTE: Adaptado de SIASI - FUNASA (2011)

A TI Urubu Branco está localizada nos municípios de Confresa, Porto Alegre do Norte e Santa Terezinha e, a TI Tapirapé/Karajá coabitada pelos Karajá no

município de Santa Terezinha (figura 3). Há uma terceira TI, denominada Araguaia (1.358.499 hectares), em Tocantins e, é coabitada com os povos Avá-Canoeiro, Javaé e Karajá (IBGE, 2010).

Figura 3 - Localização das Terras Indígenas Tapirapé e as principais vias de acesso



1.3 Saúde Indígena

Vários têm sido os problemas que vêm agravando a saúde e afetando o modo de vida das populações indígenas do Brasil. A ocupação desordenada em áreas habitadas, em prol do avanço da agropecuária e outros setores produtivos, propiciaram o contato dos povos indígenas com os não-índios, o que favorece a transmissão de doenças comuns nas áreas urbanas, ou mesmo a introdução de novos patógenos nas populações indígenas.

Para amenizar essas problemáticas foi necessária a implantação do Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena (SIASI), com o objetivo de tornar públicas as informações, com base nas disposições constitucionais e as Leis nº

8.080 e 8.142, que se pautaram na Medida Provisória n.º 911-08, de 29/7/1999, e na Lei nº 9.836, de 23/9/1999, que estabeleceram a responsabilidade ao Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), assim como a definição do Subsistema de Atenção à Saúde Indígena (FUNASA, 2002).

A atenção básica à saúde indígena é uma área relevante para a pesquisa, sobretudo para as políticas públicas, uma vez que o conhecimento das condições da saúde de populações indígenas é fundamental para ações de prevenção e controle, e representa valiosa contribuição nos programas de saúde implantados pelo Ministério da Saúde, sob responsabilidade da FUNASA, através da Coordenação de Saúde do Índio (COSAI), Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEI) (DE SOUZA; SCATENA; SANTOS, 2007).

O subsistema de saúde indígena conta hoje com 717 postos de saúde, 367 hospitais de referência, 323 pólos-base e 55 Casas de Saúde Indígena (Casai). Este é estratégico e requer cuidados especiais dadas as especificidades históricas, etnográficas e sociais do povo fundador da cultura brasileira (FUNASA, 2002).

Porém, mudanças estão ocorrendo em relação à política de atenção à saúde Indígena no país, uma vez que, em consonância com o Art. 6º do Decreto nº 7.336, de 19 de outubro de 2010, alterado pelo Decreto nº 7.461, de 18 de abril de 2011, o Ministério da Saúde e a FUNASA deverão efetivar a transição da gestão do Subsistema de Atenção à Saúde Indígena para o Ministério da Saúde até o dia 31 de dezembro de 2011.

1.4 O sistema de saúde indígena Tapirapé

A TI Urubu Branco conta com seis postos de saúde, sendo um posto em cada aldeia, nos quais trabalham cinco auxiliares de enfermagem, uma enfermeira responsável, seis agentes indígenas de saúde (AIS) e três agentes indígenas de saneamento (AISAN) que atendem todas as aldeias. Esses profissionais estão sob a administração do escritório regional da FUNASA em Confresa-MT, que é responsável também pela locomoção, quando necessário, dos Tapirapé para o hospital mais próximo, neste caso, localizado em Confresa. Esse trabalho, que inclui exames básicos e pronto-atendimentos, é sempre acompanhado por um dos profissionais acima mencionados. Há também a presença de um médico, disponibilizado pela prefeitura, que atende uma vez por semana as seis aldeias

indígenas.

A realidade da atenção à saúde Tapirapé no Mato Grosso é um tanto quanto similar ao que acontece com os índios Yanomami habitantes da região do Alto Orinoco no sul da Venezuela divisa com o extremo norte do Brasil. Lá, eles vivem em dispersas comunidades onde os cuidados à saúde da população são geridos por meio de centros básicos de saúde primários, com a participação de um médico, um agente comunitário de saúde e um microscopista. Os Yanomami moram nas proximidades de um posto de saúde, no qual eles têm acesso a cuidados de saúde relativamente constante enquanto as populações mais remotas dependem das intermitentes visitas de uma equipe médica móvel, que provém o acesso ao tratamento de diversas doenças (GRENFELL et al., 2008).

Situação diferente é vivida pelas etnias indígenas Tacana e Esse Ejjas habitantes da Amazônia boliviana, que não dispõem de nenhum posto de saúde para atendimento das suas comunidades (LUNA MONRROY et. al., 2007), situação esta que pode gerar, neste caso, más condições na qualidade ou na ausência dos serviços de saúde podem agravar as condições nutricionais das crianças indígenas (ZONTA; OYHENART; NAVONE, 2010), gestantes e idosos da comunidade. Já o problema enfrentado pelas comunidades indígenas mexicanas é o pouco acesso dessas populações aos programas de saúde, sendo que os adultos são os menos atendidos pela equipe de saúde em Jalisco (GALVÁN-RAMIREZ; MADRIZ-ELIZONDRO; BERNAL-REDONDO, 2007) e, há escassez nos recursos e na cobertura de saúde para os índios da etnia Maia em Chiapas (MORALES-ESPINOZA et al., 2003).

1.5 Patógenos intestinais em população indígena

No que tange o termo patógenos incluem-se os parasitas intestinais, dentre os quais uma grande número de espécies está associada a problemas gastrointestinais. Nos países em desenvolvimento, a diarréia, é a segunda maior causa de mortalidade entre crianças abaixo de cinco anos de idade, sendo responsável por aproximadamente 1,5 milhões de mortes a cada ano (UNICEF, 2007).

Nesta realidade somam-se as populações indígenas, pois estudos previamente realizados na América Latina revelaram que a diarréia é uma das

principais causas de morte entre os grupos indígenas, com uma taxa de mortalidade três vezes maior que na população em geral, devido à oferta insuficiente ou má qualidade da água, desnutrição e outros fatores de risco específicos (BUTLER et al., 2001; FIGUEROA et al., 1983; FREIRE; TILLET, 2008; ROJAS, 2007).

Esses dados se confirmam com estudos envolvendo comunidades indígenas norte-americanas que revelaram que essas populações estão expostas a um elevado risco de diarréia grave (SANTOSHAM et al., 1985; SANTOSHAM, 1995).

Na Venezuela, mais precisamente no distrito de Sucre, o relatório epidemiológico do governo demonstrou que a diarréia tem afetado crianças indígenas abaixo de cinco anos de idade, destacando-a entre as cinco causas de morbidade e mortalidade nessas comunidades (MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD, 2011).

Além das enteroparasitoses, os processos diarréicos agudos estão também freqüentemente associados a infecções bacterianas e virais (REY, 2001). Os vírus entéricos de grande importância a saúde pública, especialmente em crianças, são veiculadas pela água, como os rotav[irus e adenovírus, e também estão associados aos problemas diarréicos (BALDACCI, 1979; CARDOSO; MARTINS; KITAJIMA, 1992; LINHARES, 2000; MASCARENHAS et al., 1996).

Os primeiros relatos associando os rotavírus a quadros de gastroenterite aguda entre silvícolas no Brasil datam da década de 70 (LINHARES et al., 1981; LINHARES, 1992). Um inquérito sorológico para rotavírus entre os índios Suruí e Karitiana (SANTOS; LINHARES; COIMBRA JÚNIOR, 1991) apontou elevadas prevalências para anticorpos anti-rotavírus em populações indígenas amazônicas, indicando que esses agentes devem desempenhar importante papel na epidemiologia das diarréias entre as comunidades estudadas.

Não há estudos envolvendo a ocorrência de adenovírus com comunidades indígenas brasileiras, todavia existem pesquisas com não-indígenas, a exemplo dos moradores da Amazônia Brasileira em Rondônia (MAGALHÃES et al., 2007; ORLANDI et al., 2006).

No entanto, as doenças infecciosas e parasitárias continuam sendo as mais importantes causas de morbidade tanto em indígenas que vivem em países desenvolvidos, quanto nos índios que habitam países em desenvolvimento, além da elevada ocorrência de doenças crônicas, como doença renal crônica, doença

cardiovascular e diabetes enfrentada pelos indígenas habitantes da Austrália (HOLD; MCCARTHY; CARAPETIS, 2010).

Essas doenças parasitárias têm provocado sérios problemas à saúde das comunidades indígenas, pois estão relacionados a diversos sintomas apresentados pelos hospedeiros, como os processos gastrointestinais. Alguns estudos já comprovaram a associação existente entre os agentes enteroparasitários e processos diarréicos agudos (MORENO et al., 2010; ORLANDI et al. 2001; OYOFO et al., 2002; SCHNACK et al,. 2003; UTZINGER et al., 1999).

No entanto, a presença de parasitas intestinais nem sempre está relacionada com algum sintoma. Num estudo de Ferrari et al. (1992), foram examinadas amostras fecais de 111 índios da etnia Karitiana em Rondônia, nas quais detectou-se *Ascaris lumbricoides* em 43 amostras (38,7%) não havendo associação com diarréia.

Esses autores, ainda, defendem que as verminoses normalmente não estão relacionadas aos quadros agudos diarréicos, mas trazem conseqüências para o desenvolvimento físico, psicomotor e comportamental, afetando, sobretudo indivíduos em desenvolvimento.

O poliparasitismo, isto é, detecção de mais de dois parasitas intestinais em amostra de um indivíduo ao exame coproparasitológico, também é uma ameaça às comunidades indígenas, chegando a representar 86% de casos entre os aborígenes (NAVONE et al., 2006). O fato de albergar um número elevado de parasitas ocasiona outro sério problema ao hospedeiro, a anemia, que pode causar graves efeitos a longo prazo, incluindo redução do desenvolvimento cognitivo (GRANTHAM-MCGREGOR; ANI, 2001; LOZOFF et al., 2000), do crescimento (LAWLESS et al., 1994), alterações da função imune (OPPENHEIMER, 2001) e redução da resistência física, além de quadros de grave anemia estarem associados ao aumento da mortalidade (WHO, 2001).

A etiologia da anemia é multifatorial e diversos fatores de risco ocorrem muitas vezes simultaneamente, como infecção com enteroparasitas a exemplo da ancilostomíase (CRAWLEY, 2004; SCHELLENBERG et al., 2003).

Porém, a prevalência de enteroparasitas não está apenas associada aos pacientes sintomáticos, mas também aos assintomáticos (DIB; LU; WEN, 2008; GUNZBURG et al., 1992; LIMA et al., 1997) e isto está bastante claro nas 21 publicações científicas dos últimos 30 anos, envolvendo parasitas intestinais em

comunidades indígenas brasileiras (tabela 1).

Diante do exposto, percebe-se que a associação entre os problemas diarréicos, outros agravos gastrointestinais, como dores abdominais e a ocorrência de parasitas intestinais está estabelecida há bastante tempo entre os povos indígenas que habitam os países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, e isto constitui um problema que preocupa a saúde pública, pois afeta populações de todas as faixas etárias, em especial crianças, idosos e imunossuprimidos.

Tabela 1 - Estudos publicados sobre ocorrência de enteroparasitas em comunidades indígenas brasileiras, no período de 1981 a 2011 (Continua)

REFERÊNCIA	LOCAL	PÚBLICO ALVO	RESULTADO
Coimbra e Mello (1981)	Parque Indígena Aripuanã, RO	Amostras fecais de 200 índios da etnia Suruí	60% positividade: *Ascaris lumbricoides* -53,3% Ancilostomideo - 43,3% *Strongyloides stercoralis* - 33,3% *Taenia* spp. - 5,8%
Lawrence et al. (1983)	Alto Amazonas, AM	Amostras de 53 índios das etnias Ticuna, Pano Central e Kanamari	100% positividade: *Trichiurus trichiura* – 98% Ancilostomideo – 95% *Entamoeba coli* – 69% *Ascaris lumbricoides* – 68%
Genaro e Ferraroni (1984)	Alto Rio Negro, AM	Amostras de 49 índios da etnia Nadëb-Maku	100% positividade: Ancilostomideo – 95,9% *Trichiurus trichiura* – 67,3% *Ascaris lumbricoides* – 61,2% *Entamoeba histolytica* – 36,7%
Santos et al. (1985)	Vales dos Rios Guaporé e Mamoré, RO	Amostras de 639 índios das etnias Massacá, Ajuru, Canoé, Jabuti, Mequém, Tupari, Macurap e Pacaánova	49% positividade: *Ascaris lumbricoides* – 21,3% *Giardia* spp. – 12,7% Ancilostomideo – 12,2% *Entamoeba histolytica* – 8,8%
Canfalonieri et al. (1989)	Serra dos Surucurus, RR	Amostras de 30 índios Yanomami	*Entamoeba histolytica* – 40%
Coimbra Junior e Santos (1991)	Terra Indígena Zoró, MT	Amostras de 173 indíos da etnia Zoró	39,9% positividade: *E. histolytica* - 16,8% *Giardia lamblia* – 9,8% Ancilostomideo - 5,2% *Hymenolepis nana* – 2,9%

Tabela 1 - Estudos publicados sobre ocorrência de enteroparasitas em comunidades indígenas brasileiras, no período de 1981 a 2011 (Continuação)

REFERÊNCIA	LOCAL	PÚBLICO ALVO	RESULTADO
Ferreira et al. (1991)	Parque Nacional do Xingu, MT	Amostras de 69 índios da etnia Iaulapiti	89,9% positividade: Ancilostomideo – 82,6% *Entamoeba coli* - 68,1% *Enterobius vermicularis* – 26,1% *Ascaris lumbricoides* – 20,3%
Ferrari et al. (1992)	Aldeia Karitiana, RO	Amostras de 111 índios da etnia Karitiana	38,7% positividade: *Ascaris lumbricoides* – 18,9% *Hymenolepis nana* – 10,8% *Entamoeba coli* – 10,8% *Entamoeba histolytica* – 4,5%
Santos et al. (1995)	Reserva indígena Pimentel Barbosa, MT	Amostras de 128 índios da etnia Xavante	58,5% positividade: Ancilostomídeo - 33,6% *Ascaris lumbricoides* - 25% *Giardia lamblia*- 8,6% *Entamoeba histolytica* - 7,8%
Lanelli et al. (1995)	Área Indígena Parabubure, MT	Amostras de 82 índios da etnia Xavante	*Entamoeba coli* - 54,3% *Ascaris lumbricoides* - 28,4% *Iodamoeba bütschlii* -23,5% Ancilostomideo - 13,6%
Miranda et al. (1998)	Aldeia Paranatinga, PA	Amostras de 126 índios em 1992 e 174 índios em 1995 da etnia Parakanã	1992 - 80,2% positividade: *Entamoeba histolytica* - 65% *Giardi lamblia* - 46,8% *Ascaris lumbricoides* - 42,8% Ancilostomídeo - 33,3%

Tabela 1 - Estudos publicados sobre ocorrência de enteroparasitas em comunidades indígenas brasileiras, no período de 1981 a 2011 (Continuação)

REFERÊNCIA	LOCAL	PÚBLICO ALVO	RESULTADO
			1995 – 88,5% positividade: *Entamoeba histolytica* – 52,5% *Ascaris lumbricoides* – 37,9% Ancilostomídeo – 19,5% *Giardia lamblia* – 17,2%
Miranda et al. (1999)	Aldeia Tembé, PA	Amostras de 93 índios da etnia Tembé	81,7% positividade: *Ascaris lumbricoides* - 34,4% Ancilostomídeo - 29% *Entamoeba histolytica* - 12,9% *Giardia lamblia* - 4,3%
Scolari et al. (2000)	Ortigueira, PR	Amostras de 100 índios da etnia Queimadas	93% positividade: *Ascaris lumbricoides* - 88% Ancilostomídeo - 52% *Trichuris trichiura* – 2%
Fontbonne et al. (2001)	Sertão do São Francisco, PE	Amostras de 112 índios da etnia Pankararu	95,3% positividade: *Entamoeba histolytica* – 82,4% *Ascaris lumbricoides* – 51,2% *Entamoeba coli* – 50,3% *Giardia lamblia* – 29,2%
Aguiar et al. (2007)	Aldeia Tereré, MS	Amostras de 333 índios da etnia Terena	73,5% positividade: *Blastocystis hominis* -40,9% *Entamoeba coli* – 33,2% *Entamoeba histolytica/dispar* – 31,6% *Endolimax nana* – 19,2%

Tabela 1 - Estudos publicados sobre ocorrência de enteroparasitas em comunidades indígenas brasileiras, no período de 1981 a 2011 (Continuação)

REFERÊNCIA	LOCAL	PÚBLICO ALVO	RESULTADO
Borges et al. (2009)	Oriximiná, PA	Amostras de 83 índios da etnia Mapuera	100% positividade: *Entamoeba coli* - 59% *Blastocystis hominis* - 57,8% *Endolimax nana* - 38,2% *Entamoeba histolytica/dispar* - 43,4%
Bóia et al. (2009)	Iuareté, AM	Amostras de 313 índios da etnia Hüpda	*Ascaris lumbricoides* - 37,5% *Giardia lamblia* - 33,3% Ancilostomídeo - 75% *Entamoeba histolytica/dispar* - 75%
Palhano-Silva et al. (2009)	Reserva Indígena Sete de Setembro, RO	Amostras de 519 índios da etnia Suruí	70,7% positividade: *Entamoeba coli* – 51,4% *Hymenolepis nana* – 29,5% *Endolimax nana* – 17,1% *Giardia duodenalis* – 16,2%
Toledo et al. (2009)	Cândido Abreu, PR	Amostras de 447 índios da etnia Kaingáng entre 2004 a 2006	2004 – 91,6% positividade: *Ascaris lumbricoides* – 63,2% *Entamoeba coli* - 58% *Endolimax nana* – 31,6% *Iodamoeba butschlii* – 26,4% 2005 – 94,6% positividade: *Ascaris lumbricoides* – 56,5% *Entamoeba coli* - 66% *Endolimax nana* – 40,1% *Iodamoeba butschlii* – 22,4%

Tabela 1 - Estudos publicados sobre ocorrência de enteroparasitas em comunidades indígenas brasileiras, no período de 1981 a 2011 (Conclusão)

REFERÊNCIA	LOCAL	PÚBLICO ALVO	RESULTADO
			2006 – 87,3% positividade: *Ascaris lumbricoides* – 34,1% *Entamoeba coli* – 65,8% *Endolimax nana* – 34,9% *Hymenolepis nana* – 31,7%
Moura et al. (2009)	Terras Indígenas (TI) Faxinal e Ivaí	111 amostras de solo da TI Faxinal e 132 da TI Ivaí da etnia Kaingáng	TI Faxinal – 75,7% positividade: *Ascaris lumbricoides* – 52,3% *Toxocara* spp. – 28,8% *Isospora* spp. – 44,1% *Entamoeba* spp. – 22,5% TI Ivaí – 96,2% positividade: *Ascaris lumbricoides* – 67,4% *Toxocara* spp. – 42,4% *Isospora* spp. – 73,5% *Entamoeba* spp. – 49,2%
Escobar-Pardo et al. (2010)	Parque Indígena do Xingu, MT	Amostras de 202 índios em 2007 e 102 índios em 2008 das etnias Pavuru, Moygu, Tuiararé, Diauarum, Capivara e Ngojwere	*2007 - 97,5% positividade:* *Endolimax nana- 50.9%* *Entamoeba coli - 48.5%* *Giardia duodenalis* -30,7% *Hymenolepis nana* -21.8% 2008 – 87,3% positividade: *Entamoeba coli* - 60.8% *Endolimax nana* - 50% *Giardia intestinalis* - 38.2% *Hymenolepis nana* - 28.5%

FONTE: Malheiros (2011)

1.6 Potencial zoonótico dos parasitas intestinais

Existem cerca de 1.500 agentes conhecidos por serem contagiosos para os seres humanos, 66 são protozoários e 287 são helmintos (CHOMEL, 2008; TAYLOR; LATHAM; WOODHOUSE, 2001) e, a maioria (60,3%) das doenças infecciosas são zoonoses emergentes (JONES et al., 2008).

Os seres humanos são suscetíveis à infecção com numerosas espécies de protozoários que colonizam o trato intestinal e, nota-se que um número crescente desses protozoários, apesar da variação do significado clínico, tem demonstrado potencial nas transmissões zoonóticas (THOMPSON; SMITH, 2011).

Dentre os parasitas intestinais, destacam-se aqueles que são considerados patogênicos como os protozoários *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. e *Isospora belli* que podem ser albergados pelos seres humanos (CLARK, 2006; CNOPS; ESBROECK, 2010; FOTEDAR et al., 2007; FRANZÉN et al., 2009; SMITH et al., 2006) e por diversas espécies de animais domésticos como cães, gatos, bovinos e equinos (CACCIÒ et al., 2008; MONIS et al., 2003; SOUZA et al., 2007; VERONESI et al., 2010) e silvestres (EKANAYAKE et al., 2006; PÉREZ CÓRDON et al., 2008; SOARES et al., 2011).

Giardia inclui-se nesse grupo e é de ocorrência ubíqua, capaz de infectar seres humanos, animais domésticos e muitas espécies de vida livre entre mamíferos, aves, anfíbios e répteis (FENG; XIAO, 2011; THOMPSON, 2004).

O *Blastocystis hominis*, apesar de sua patogenicidade ser ainda controvérsia entre os especialistas, é também um parasita comumente diagnosticado em amostras fecais humanas (BORGES et al., 2009; CLARK, 1997; ROLDÁN et al., 2009; STENSVOLD et al., 2008), de animais domésticos como cães, suínos, bovinos e gatos (CHAPMAN et al., 2009;) e de animais silvestres como macacos, roedores, aves e répteis (ABE et al., 2002; DUDA; STENZEL; BOREHAM, 1998; PARKAR et al., 2010).

Os Tapirapé criam cães, gatos, porcos e galinhas, além de alguns animais silvestres como macaco-prego (*Cebus* sp.), cateto (*Dicotyles tayassu*), ema (*Rhea americana*), tartaruga (*Podocnemis expansa*), arara-vermelha (*Ara chloropterus*) e arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*). Além disso, mantém outros hábitos tradicionais também observadas em outras etnias da Amazônia mato-grossense, como a coleta de mel, coco e ovos de quelônio.

A pesca é também uma atividade comum, entretanto a atividade principal de subsistência é sem dúvida a caça de diversas espécies de animais, como o *Dicotyles albirostris* (queixada), *Coelogenys* sp. (paca), *Dasyprocata* sp. (cotia), *Myrmecophaga jubata* (tamanduá bandeira), *Testudo tabulata* (jabuti), *Nasua narica* (quati), *Podecnemis unifilio* (tracajá), *Dorcephalus bezoarticus* (veado-campeiro), *Tapirus americanus* (anta), *Mazama americana* (veado-mateiro), *Euphrarctus sexintus* (tatu), *Alouatta* sp.(guariba) e *Alopochen discolor* (pato-do-mato).

Para “aumentar” o número oriundo da caça, os Tapirapé cultuam o ritual mais importante do grupo, o *Marakayja*, pelo qual marca-se a passagem dos meninos para a condição de homens adultos. Nesse ritual, o *paxe* tem grande importância, pois em seus sonhos ele viaja à "casa dos queixadas" para multiplicar a quantidade de caça (ISA, 2010).

Estudos demonstram que, em locais com condições de higiene precária, a exemplo de comunidades indígenas, o contato do ser humano com animais domésticos pode elevar o potencial de infecção por parasitas intestinais zoonóticos, em decorrência da contaminação do solo por formas infectantes de helmintos e protozoários intestinais (COIMBRA JÚNIOR; MELLO, 1981; MORALES-ESPINOZA et al., 2003; NISHI et al., 2009; PALHANO-SILVA et al., 2009).

1.7 Importância e utilidade do diagnóstico aplicado às parasitoses intestinais

Os diagnósticos precisos são importantes para revelar a realidade de uma população em estudo, incluindo-se casos sintomáticos quanto assintomáticos das doenças parasitárias.

A microscopia óptica é a mais comum e conhecida técnica no diagnóstico coproparasitológico. Lutz et al. (1919), Hoffman, Pons e Janer (1934), Faust et al. (1939) entre outros, foram os bastiões no pioneirismo taxonômico e morfológico na detecção de ovos de helmintos e cistos de protozoários em amostras fecais.

Métodos de sedimentação apresentam maior sensibilidade para estruturas parasitárias pesadas, tais como larvas e ovos de média e alta densidade. Portanto, mesmo que não seja o método de predileção para algumas situações, a técnica de Ritchie possui boa capacidade diagnóstica tanto para ovos de helmintos com maior densidade quanto para cistos de protozoários.

Outras importantes técnicas, como a centrífugo-flutuação em sacarose

(SHEATHER, 1923) surgiu para somar-se aos esforços dos parasitologistas, em busca de enteroparasitas que necessitavam de diagnósticos mais específicos, como cistos e trofozoítos de *Giardia* spp.

Ferramentas importantes, com o uso de corantes, como a coloração por fucsina de Kynioun a frio (LENNETTE et al., 1985), contribuiu sobremaneira na elucidação dos coccídios intestinais (*Ciclospora* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Isospora* spp.).

Testes imunoenzimáticos como o Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) foram primordiais para diferenciação da ameba patogênica (*Entamoeba histolytica*) da comensal (*Entamoeba dispar*) (SILVA et al., 2005). Já os testes imunocromatográficos, por meio dos kits comerciais para detecção de anticorpos, foram essenciais, no diagnóstico de infecções por parasitas intestinais como *Cryptosporidium* spp. e, de dois vírus de grande importância a saúde pública, rotavírus e adenovírus.

O diagnóstico molecular, por meio da Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) e seqüenciamento dos nucleotídeos, são uma das mais avançadas técnicas no estudo taxonômico e epidemiológico dos enteroparasitas dentre outros agentes biológicos.

Com a aplicação de técnicas moleculares, tem sido possível identificar, em animais e nos seres humanos, por exemplo, isolados de *Giardia* com reconhecido potencial zoonótico (SOUZA et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2011).

O gênero *Giardia* possui seis espécies conhecidas, *Giardia* intestinalis, também denominada *Giardia lamblia* ou *Giardia duodenalis* que são encontradas em seres humanos e em outras espécies de mamíferos, *Giardia muris* diagnosticadas em roedores, *Giardia agilis* em anfíbios, *Giardia psittaci* e *Giardia ardeae* diagnosticados em pássaros e *Giardia microti* em ratazanas e ratos almiscarados (CACCIÒ; RYAN, 2008).

Molecularmente *Giardia intestinalis* é classificada em seis grupos genotípicos (ou *assemblages*). Os assemblages A e B são considerados grupos zoonóticos e, são identificados em humanos, cães, gatos, castores, lontras, gorilas, veados, ratos domésticos, bovinos, ovinos e diversas espécies silvestres. Os assemblages C e D são detectados em cães, coiotes e ratos domésticos. Assemblage E é encontrado exclusivamente em artiodáctilos, como bovinos, caprinos, ovinos e suínos,

assemblage F somente em gatos domésticos, assemblage G em ratos e assemblage H em focas (FENG; XIAO, 2011).

No Brasil alguns trabalhos foram realizados acerca da caracterização molecular de *Giardia intestinalis* envolvendo seres humanos (ROCHA et al., 2003; SOUZA et al, 2007; VOLOTÃO et al, 2007; VOLOTÃO et al., 2011), e animais como cães, gatos, gado (SOUZA et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2011) macacos, avestruzes, onça-pintada (SOARES et al., 2011).

Técnicas moleculares foram também importantes nos estudos envolvendo *Blastocystis* spp., causador da Blastocistose.

Blastocystis spp. é prostista pertencente ao sub-filo Sarcodina, comumente diagnosticado em amostras fecais diarréicas e não-diarréicas de imunocompetentes e imunodeprimidos (STENSVOLD et al., 2008; STENZEL; BOREHAM, 1996), sendo considerado parasita entérico de significado clínico (CLARK, 1997; TAN, 2008), apesar das controvérsias sobre sua patogenicidade ao ser humano. Este parasita é classificado no âmbito de um grupo de organismos bastante diversificado denominado Stramenopiles, sendo este o único membro destes associados com patologia humana, apesar de seu potencial zoonótico (TAN et al., 2010).

Stensvold et al. (2007a) chegaram num consenso para buscar a padronização da terminologia *Blastocystis*, com o intuito de melhorar a comunicação e correlacionar os resultados das pesquisas por especialistas, baseada principalmente nas análises publicadas da pequena subunidade do gene RNA ribossomal (SSU-rDNA), propondo que todos os isolados de mamíferos e aves deveriam ser designados como *Blastocystis* sp. e, este foi um passo importante para conhecer a distribuição geográfica do parasita.

Desde então, os trabalhos ao redor do mundo têm demonstrado a circulação de 13 diferentes subtipos (STs) diagnosticados em seres humanos e nos animais.

Na Europa, Oceania e alguns países da África como o Egito o ST3 é o mais comum entre os estudos realizados com amostras fecais humanas (DOMÍNGUEZ-MÁRQUEZ et al., 2009; MELONI et al., 2011; MENOUNOS et al., 2008; ROBERTS et al., 2011; SOUPPART et al., 2010).

Diversos estudos têm relatado *Blastocystis* associados com outros enteroparasitas patogênicos. Boorom et al. (2008) diagnosticaram *Blastocystis* recorrentes em co-infecções com *Giardia* spp. ou *Entamoeba histolytica* em pacientes sintomáticos (prisão de ventre e diarréia). No Japão, Hirata et al. (2007)

descobriram co-infecções de *Blastocystis* e *Strongyloides stercoralis* em pacientes do sexo feminino e masculino.

Nos últimos anos, *Blastocystis* spp., que caracteriza-se pela transmissão oral-fecal, tem despertado interesse junto a comunidade científica, no qual tem se verificado, nos diagnósticos coprológicos e moleculares, um elevado aumento de casos em indivíduos HIV soropositivos (AMENTA et al., 1999; IDRIS et al., 2010; TAN; ONG; SURESH, 2009).

Vários estudos epidemiológicos, realizados em diferentes países, relatam *Blastocystis* spp. como o organismo eucariótico mais comum diagnosticado em fezes humanas (SOUPPART et al., 2010) e, de cães (LEELAYOOVA et al., 2009; PARKAR et al., 2010; STENSVOLD et al., 2009a) mas, a prevalência da infecção por *Blastocystis* como causa de diarréia ou outros sintomas é ainda uma controvérsia, já que pode ser encontrado em indivíduos sintomáticos e assintomáticos (STENSVOLD et al., 2009b).

Nos Estados Unidos Jones et al. (2009) analisaram 21 pacientes sintomáticos, com doença gastrointestinal crônica que foram positivos para *Blastocystis* e destes, seis foram infectados com o ST3 e apenas um com o ST1. Na Turquia, Dogruman-Al et al. (2009) examinaram 35 isolados de *Blastocystis* em seres humanos e consideraram que ST2 e ST3 foram associados com algumas infecções crônicas em pacientes sintomáticos e assintomáticos, mas ST3 foi o mais comum. Wong et al. (2008) analisaram 276 fezes de pacientes de um hospital de Cingapura. A prevalência foi baixa (3,3%), o que provavelmente reflete a higiene relativamente boa que é dominante neste país em particular, mas novamente ST3 foi o subtipo dominante. No Egito, 20 amostras de fezes positivas para *Blastocystis* oriundas de pacientes que apresentavam sintomas gastrointestinais, e ST3 foi o mais freqüente seguido por ST1 e ST2 (SOUPPART et al., 2010). Todos os estudos acima, com exceção de Wong et al (2008) e Dogruman-Al et al. (2009) foram de pacientes com problemas gastrointestinais, mas por causa da ausência de pesquisas em indivíduos normais nas mesmas áreas, é difícil dizer se algum subtipo particular foi ligada a sintomas patológicos.

Até o momento, o maior número de isolados caracterizados para *Blastocystis* foi de 107 pacientes dinamarqueses dos quais 93 eram suspeitos como tendo alguma doença enteroparasitária e, ST3 foi o subtipo mais dominante entre os três encontrados no estudo (STENSVOLD et al., 2007b).

Outros nove subtipos – ST1, ST2, ST4, ST5, ST6, ST7, ST8 (LI et al., 2007; WHIPPS et al., 2010; YOSHIKAWA et al., 2004) foram também diagnosticados em seres humanos, e destes os ST1, ST2 e ST5 além do ST3 foram encontrados também em cães, indicando a importância zoonótica deste parasita (PARKAR et al., 2007; STENSVOLD et al., 2009a). Dado de grande importância para a saúde pública, em especial as populações que vivem em áreas com precárias condições de vida.

No Brasil apenas dois estudos coproparasitológicos acerca de *Blastocystis* foram realizados abrangendo aborígenes, um com 83 índios da comunidade Mapuera habitantes da região amazônica (BORGES et al., 2009) e, outro estudo envolvendo 313 índios da etnia Terena do Centro-oeste brasileiro, demonstrando alta prevalência do parasita (AGUIAR et al., 2007).

1.8 Eco-epidemiologia e fatores de risco x parasitoses intestinais entre indígenas

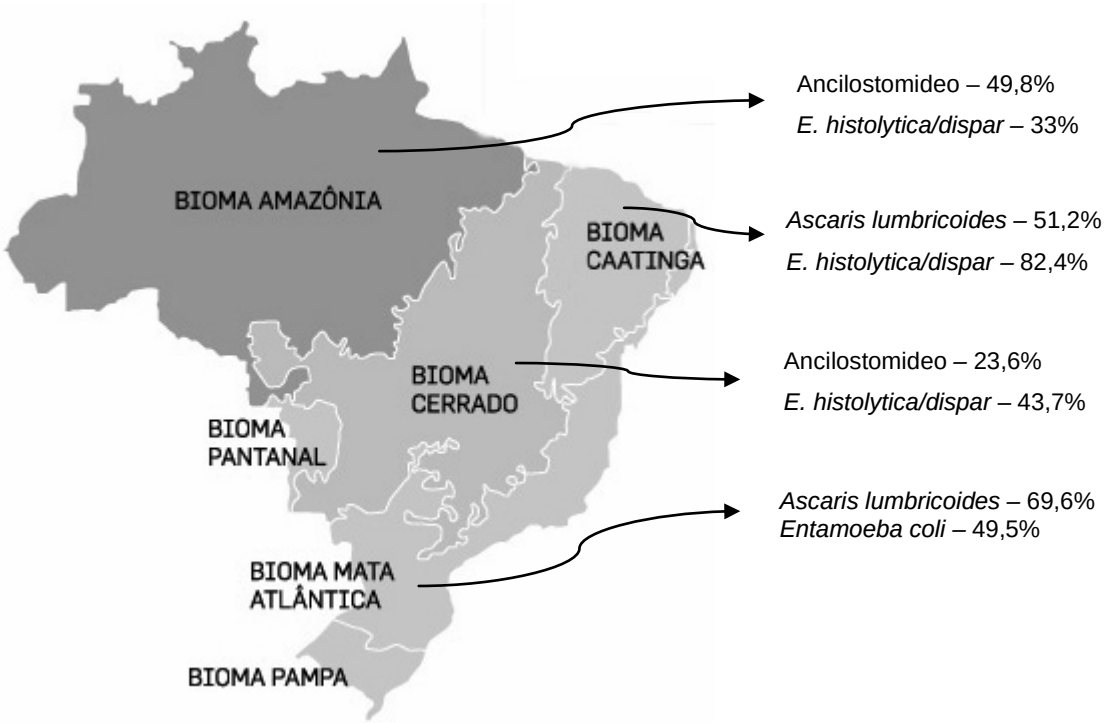
O Brasil possui seis distintos biomas, sendo eles Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Pampas e Pantanal (IBGE, 2010) e, nos últimos 30 anos foram publicados 21 artigos nos quais o objetivo era investigar a ocorrência de parasitas intestinais em seus moradores mais antigos, os índios. O maior número de trabalho foi realizados na Amazônia, totalizando treze trabalhos na referida região, seguida do Cerrado, com quatro trabalhos, Mata Atlântica com três estudos e Caatinga com apenas um trabalho. A figura 4 apresenta os helmintos e protozoários intestinais mais prevalentes nos habitantes indígenas por região ecológica.

Desequilíbrio ambiental, falta de saneamento básico, poluição dos mananciais, condições de moradias precárias, instalações sanitárias inadequadas e carência de políticas públicas voltadas à promoção da saúde, são alguns dos fatores que favorecem o desencadeamento de problemas associados às infecções causadas por parasitas intestinais em populações carentes desses fatores primordiais à vida humana, como os indígenas. Uma dessas necessidades foi considerada por Fontbonne et al. (2001) num estudo com índios da etnia Pankararu em Pernambuco, onde verificaram prevalência de 82,4% de *Entamoeba histolytica* entre os moradores do mesmo domicílio nas aldeias estudadas.

Podem ser fatores de risco para a infecção por patógenos gastrointestinais em

populações carentes: o número de habitantes das residências estudadas, o tipo de construção, saneamento e abastecimento de água e hábitos de higiene. Tais fatores nos levam a refletir acerca dos problemas socioeconômicos, como a pobreza, que estão associados a vida precária e às condições de habitação, que podem levar ao aparecimento de diarréia e outras doenças infecciosas parasitárias decorrentes da ausência de água tratada, assim como de tratamento adequado de lixo nas aldeias (ZONTA; OYHENART; NAVONE, 2010).

Figura 4 – Prevalência de protozoários e helmintos intestinais entre os índios brasileiros distribuída por biomas, com base nas publicações científicas entre 1981-2011



FONTE: Malheiros (2011)

Os Tapirapé moram em casas construídas de adobe e algumas de alvenaria. Todas elas cobertas com palha buriti (*Mauritia flexuosa*)**,** espécie bastante utilizada pelos índios mato-grossenses, da qual se emprega a madeira e as folhas na construção civil, artesanato, atividades esportivas (como a “corrida da tora” praticada pelos índios Xavante), e os frutos no preparo de bebidas (TAPIRAPÉ, 2006).

As atividades agrícolas, como o cultivo de roça, eram itinerantes até a década de 1940, porém, com a diminuição das áreas, devido a entrada do não-índio, os índios foram obrigados a abandonar essa prática secular (WAGLEY, 1988). As

principais culturas são mandioca, para a fabricação de farinha, banana, mamão, murici (*Byrsonima crassifolia* L.), cará, batata doce, abóbora, amendoim, feijão andu (*Cajanus cajan* L.), arroz e algodão. Hoje a roça está estabelecida aproximadamente 20 km da aldeia. Em contrapartida, alguns cultivares como o urucum (*Bixa orellana* L.), jenipapo (*Genipa americana* L.) e cuité (*Crescentia cujete* L.), muito utilizados nos ritos tradicionais e artesanato, são mantidos próximos às casas da aldeia.

Além da confecção de artesanatos os Tapirapé utilizam raízes, caules, folhas, sementes e embiras de várias espécies vegetais na medicina tradicional.

As casas Tapirapé estão dispostas num quadrado e, este sistema de construção é similar nas demais aldeias da etnia. Na maior aldeia – Tapi'itãwa – localiza-se a "casa dos homens" chamada de Takara, construída no centro da aldeia, para reunião dos homens Tapirapé e preparação para os ritos de passagem (figura 5). Nota-se também, na aldeia Urubu Branco, a presença da única escola da TI, onde funciona o sistema de ensino fundamental e médio mantido pelo governo do Estado do Mato Grosso.

No total 112 famílias ocupam as seis aldeias da etnia Tapirapé, constituídas por 248 homens e 256 mulheres, somando 551 índios habitantes dessas comunidades.

Figura 5 – Vista aérea da aldeia Tapi'itawã da etnia Tapirapé, Confresa-MT

FONTE: Google maps (2011)

O quadro 2 apresenta a distribuição das 79 casas pertencentes às seis aldeias da etnia Tapirapé coabitadas por crianças, adolescentes, adultos e idosos. A média de ocupação em cada casa é de seis pessoas, porém, algumas chegam a ter 20 moradores dividindo o mesmo teto.

Quadro 2 – Distribuição da população indígena nas seis aldeias da etnia Tapirapé por faixa etária e por número de casas no Estado do Mato Grosso

ALDEIA	Entre 0 e 4 anos	Entre 5 e 14 anos	Entre 15 e 29 anos	Entre 30 e 59 anos	≥ 60 anos	Qtde. de casas
Akara'itãwa (Santa Laura)	6	19	16	12	0	9
Buriti II	2	17	10	9	0	7
Tapi'itãwa (Urubu-branco)	38	89	82	54	11	38
Tapiparanytãwa (Córrego da Onça)	11	18	23	13	3	11
Towajaatãwa (Sapeva)	3	27	16	13	2	8
Wiriaotãwa (Codebra)	9	13	14	9	2	6
Total	69	183	161	110	18	79

FONTE: Malheiros (2011)

Para as seis aldeias Tapirapé existem somente 14 banheiros, todos eles implantados pela FUNASA e todas estão licalizadas na aldeia Urubu Branco. Esses banheiros, construídos de alvenaria (figura 6), são compostos de vaso sanitário e chuveiro e são de uso comum da comunidade, todavia a maioria dos índios não usufrui dessas instalações. A grande maioria dos adultos Tapirapé utiliza a mata próxima às casas para defecação, e as crianças defecam no entorno das casas das aldeias.

Figura 6 – Banheiro localizado na aldeia indígena Urubu Branco, Confresa-MT

FONTE: Malheiros (2011)

Fato que merece atenção é o hábito higiênico que os Tapirapé mantinham até a década de 1950. Naquele tempo, todos os membros de uma mesma família, pai, mãe e crianças iam juntos à mata para defecar. O pai seguia na frente para abrir caminho, sendo acompanhado pelos filhos ao centro e a mãe atrás. O patriarca esperava todos os filhos defecarem e, em seguida, ele e a esposa o faziam. No final, a mãe cobria as fezes jogando terra sobre elas com os pés. Tal comportamento, além de evitar a proliferação de moscas e outros vetores atraídos pelo odor, protegia a família, principalmente os menores, de ataques de onça ou de queixadas, por

estarem na mata em grupos e não isolados.

Todavia, os desmatamentos, gerados pela ocupação desordenada na região Araguaia por posseiros e grileiros para fins agropecuários no início da década de 1970, obrigando os índios a abandonarem seus costumes, que somados à ausência de uma infraestrutura sanitária mínima favorecerem a contaminação do solo e de córregos, próximos às aldeias e postos de saúde por formas infectantes de helmintos e protozoários. Fato este observado por Lanelli, Silva e Agostin (1995) num estudo realizado com os Xavante de Parabubure também no Mato Grosso.

Além dos desmatamentos, as queimadas provocadas pela implantação de extensas pastagens para criação bovina e cultura de cana-de-açúcar na região do Araguaia, contribuíram para a degradação ambiental das terras indígenas habitadas pelos Tapirapé. Essas ações antrópicas promovem o aquecimento global, ocasionado pela emissão de gás carbônico oriundo também das queimadas, podendo alterar a dinâmica de transmissão de zoonoses parasitárias em áreas endêmicas, o que pode permitir que alguns parasitas sejam transmitidos em regiões onde antes estavam ausentes (TORGERSON; MACPHERSON, 2011).

O abastecimento de água das aldeias Tapirapé é feito através de poços artesianos (figura 7) implantados pela FUNASA, porém poucos índios filtram ou fervem a água para consumo ou no preparo de alimentos.

Figura 7 – Poço artesiano em TI Tapirapé, Aldeia Sapeva, Porto Alegre do Norte-MT

FONTE: Malheiros (2011)

Miranda et al. (1999) salientaram que as conseqüências negativas do enteroparasitismo para a qualidade de vida e bem-estar, assim como o risco de quadros graves, processos obstrutivos e formas invasivas, devem ser considerados pela equipe de saúde atuante nas aldeias.

Conquanto, dados sobre a ocorrência de parasitas intestinais entre indígenas são escassos, embora configurem a sua relevância na gênese dos quadros de gastroenterite aguda ou crônica. De modo geral, tanto a transmissão direta como a indireta decorre da contaminação fecal do meio ambiente, condição que prevalece amplamente nas aldeias (LINHARES, 1992).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Pouco se sabe sobre etiologia dos parasitas intestinais em comunidades indígenas, e até o momento nenhum estudo tinha sido realizado nas aldeias dos índios Tapirapé, habitantes da Amazônia mato-grossense.

Enteroparasitas como *Blastocystis hominis, Giardia intestinalis* e *Entamoeba histolytica* estão associados a problemas diarréicos (FENG; XIAO, 2011; LIMA, 2001; STARK et al., 2007) e, até o momento, nenhum trabalho tinha sido desenvolvido junto às comunidades indígenas brasileiras, envolvendo as ferramentas moleculares importantes na elucidação da epidemiologia desses protozoários intestinais.

Um surto de diarréia, com suspeita de ser desencadeado por enteroparasitoses, foi apontado pelos agentes de saúde indígena da etnia Tapirapé no nordeste mato-grossense há seis anos.

Considerando a pluralidade étnica dos povos indígenas com o modo de vida particular dos diferentes grupos, as influências muito distintas às quais estão sujeitos nos diferentes territórios que ocupam o conhecimento da epidemiologia dos principais patógenos responsáveis por problemas de saúde são fundamentais para subsidiar propostas de prevenção e controle. Não obstante, o processo de geração e transferência do conhecimento sobre epidemiologia desses agentes no local precisa ter a participação efetiva dos índios. O envolvimento dos indígenas nos programas de prevenção e controle torna as medidas mais eficazes, a exemplo do Projeto em saúde e educação, implantando pelas irmãzinhas de Jesus desde 1952, no qual capacitaram-se agentes e auxiliares de saúde indígenas, obtendo-se um ganho bastante considerável na recuperação populacional do povo Tapirapé. Alfabetizados e capacitados, esses agentes desenvolvem com habilidade diversas atividades, incluindo diagnósticos, tratamentos, indicações de medicamentos, redações de encaminhamentos de doentes e tarefas de laboratoristas, como elaboração e análise de lâminas para identificação de tuberculose e de tipos de malária. A FUNAI e a FUNASA foram e são grandes parceiras nesse processo de assistência organizada pela missão (ISA, 2010). Até os dias atuais as três irmãzinhas convivem na aldeia Tapi’itãwa com a comunidade.

O presente estudo é resposta à solicitação da comunidade, com concordância da liderança local, inclusive com a participação da FUNASA por meio da inclusão no estudo do professor - índio - Kamoriwa'i Elber Tapirapé e do cacique Xario’i Carlos Tapirapé.

A FUNASA apoiou localmente o projeto com a participação de todos os profissionais da saúde indígena nas ativades de campo.

A parceria entre o Instituto Evandro Chagas – IEC, da Secretaria de Vigilância em Saúde, e a Universidade de São Paulo, por meio do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas e, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, foi imprescindível no diagnóstico microscópico e molecular dos patógenos entre a população indígena estudada.

Um dos pontos considerados relevantes deste estudo foi a participação direta dos colaboradores indígenas, Xirao'i Carlos Tapirapé e Kamoriwa'i Elber Tapirapé, egressos dos cursos de Licenciatura em Ciências Matemática e da Natureza e Ciências Sociais, vinculado ao Projeto 3.º Grau Indígena da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Xirao'i e Kamoriwa'i são moradores da Terra Indígena Urubu Branco e, atuam como educadores do ensino médio na Aldeia Tapi'itãwa, sendo Xirao'i o cacique dessa comunidade. Com isso proporcionou-se a estes índios uma grande oportunidade de aprendizando e espera-se estes tenham sido sensiblizados e venham apoiar futuras propostas de controle desses patógenos.

Outro fator significativo na proposta é a participação de mais quatro professores indígenas da etnia Tapirapé, também moradores da região, que são acadêmicos do Projeto 3.º Grau Indígena. Suas participações possibilitarão o desenvolvimento de trabalhos de conclusão de curso relacionados ao tema proposto. Estas ações corroboram com a Política Nacional de atenção à Saúde dos Povos Indígenas que integra a Política Nacional de Saúde, pois visa estimular as instituições de ensino e pesquisa a produzir conhecimentos e tecnologias adequadas aos problemas de interesse das comunidades e propor programas especiais que facilitem a inserção de alunos de origem indígena (FUNASA, 2002).

Objetivos

- Determinar a prevalência de parasitas intestinais, rotavírus e adenovírus entre os índios Tapirapé da Terra Indígena Urubu Branco (Mato Grosso, Brasil);
- Caracterizar molecularmente as seqüências parciais de gene codificador das enzimas β-Giardina – *bg* e Glutamato Desidrogenase - *gdh* de cistos

de *Giardia intestinalis*;

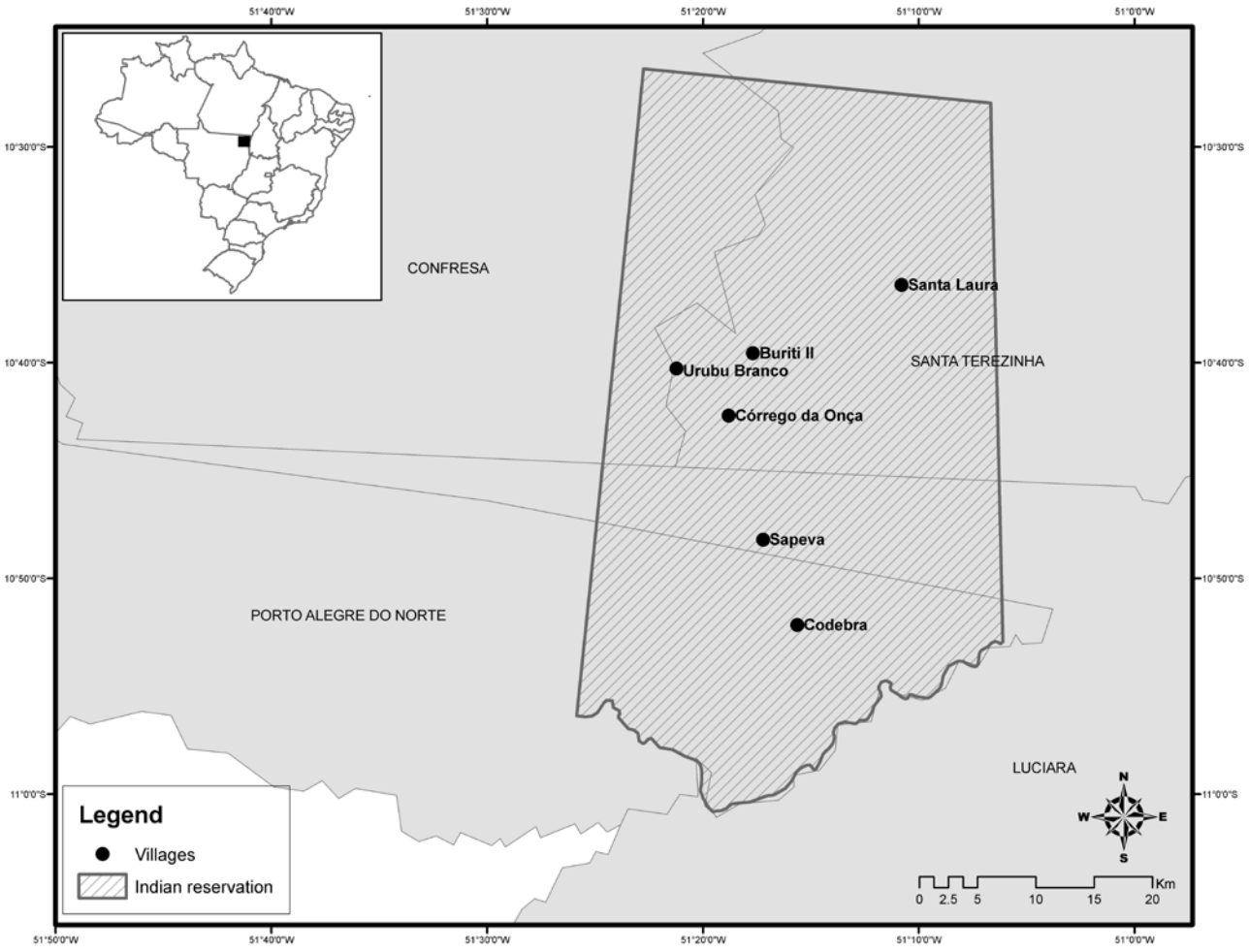
- Confirmar molecularmente o diagnóstico das seqüências de gene codificador visando a pequena subunidade ribossomal nuclear RNA (SSU-rRNA), de cistos de *Blastocystis* spp.;
- Realizar inquérito clínico - epidemiológicos e demográficos na comunidade indígena.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e Público-alvo

Para este estudo foi selecionada a TI Urubu Branco composta de 550 índios moradores de seis aldeias, sendo três no município de Confresa: Tapi'itãwa - Urubu-Branco (10º40’137”S; 51º21’114”W), Tapiparanytãwa – Córrego da Onça (10º42’259”S 51º18’479”W) e Buriti II (10º39’318”S 51º17’397”W); duas pertencentes ao município de Porto Alegre do Norte: Wiriaotãwa - Codebra (10º52’066”S 51º15’378”W) e Towajaatãwa – Sapeva (10º48’074”S 51º17’118”W); e uma localizada no município de Santa Terezinha: Akara'ytãwa – Santa Laura (10º36’352”S 51º10’849”W), como pode ser observado na figura 8.

Figura 8 - Localização geográfica das seis aldeias Tapirapé, Amazônia mato-grossense



FONTE: Malheiros (2011)

Os biomas Amazônia e Cerrado compõem a região habitada pelos Tapirapé, entremeados de campos limpos, com vegetação tipicamente formada por Savana-

Floresta Ombrófila, Savana-Formações Pioneiras e Savana-Floresta Estacional.

A fauna da região é composta por animais típicos da região Amazônica.

A bacia hidrográfica compõe as grandes bacias do Amazonas e Tocantins. Para a bacia Amazônica contribui o rio Liberdade e para a bacia Tocantins-Araguaia contribui os rios Tapirapé e Tucunara.

O relevo é constituído pela depressão Araguaia e planície Bananal. O clima da região é equatorial e úmido, com quatro meses de seca, de junho a setembro.

A precipitação anual é de 2.000 mmm com intensidade máxima em janeiro, fevereiro e março, com temperatura média anual de 24 ºC, maior máxima 42 ºC, e menor 4 ºC (MATO GROSSO, 2010).

3.2 Metodologia

Antes de iniciar os trabalhos de campo o projeto foi apresentado à comunidade e liderança indígenas. Reuniões periódicas ocorreram com as lideranças indígenas, UNEMAT, FUNAI, FUNASA, IEC e USP.

3.2.1 Período de coleta do material biológico

As coletas foram realizadas num período de 18 meses, distribuídos em quatro coletas num intervalo de seis meses, ficando assim distribuídas: julho/2008, janeiro/2009, julho/2009 e janeiro/2010.

3.2.2 Inquérito clínico – epidemiológico e dados demográficos

As fichas preliminares de inquérito clínico-epidemiológicos (Anexo B) foram aplicadas a todos os índios com acompanhamento médico, utilizando o modelo preconizado em protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002), após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo A) por todos os membros que concordaram em participar do trabalho. Na ficha foram abordados questionamentos como idade, sexo, quadro diarréico, hábitos de higiene e presença de animais.

3.2.3 Amostras fecais

Os coletores universais descartáveis de plástico foram entregues aos agentes indígenas de saúde, que distribuíram os potes devidamente nomeados, assinalados com um número que cada indivíduo recebeu durante a aplicação das fichas de inquérito e o número da casa. Essa prática se repetiu em todas as coletas.

Os coletores eram levados ao laboratório por um agente de saúde, no primeiro horário da manhã, para os exames coproparasitológicos.

3.2.4 Exames parasitológicos e virológicos de fezes

As amostras de fezes frescas foram processadas no mesmo dia do recebimento, ou no máximo dois dias após o recolhimento, sendo até então mantidas sob refrigeração a 4 °C., num laboratório equipado exclusivamente para este estudo em Confresa-MT.

Análises macroscópicas do material fecal eram feitas antes dos exames microscópicos, para obtenção de dados como consistência fecal (formada, pastosa, cíbalos e diarréica) e, aspecto fecal (normal, mucoso, sanguinolento e muco-sanguinolento). Todas as informações macroscópicas e microscópicas das amostras fecais eram mantidas numa ficha elaborada para este estudo (Anexo C).

Para evidenciar as formas de protozoários intestinais e helmintos foram utilizadas as técnicas de sedimentação espontânea, instituída por Hoffman, Pons e Janer (1934) e centrífugo-sedimentação em formol-éter, preconizada por Ritchie, Pan e Hunter (1952) apud Allen e Ridley (1970), com o objetivo de aumentar a sensibilidade dos exames de microscopia.

Uma porção da amostra fecal de cada indígena era colocada num copo descartável de 200 mL, enumerado para cada índio, diluído na proporção de 1/3 de água e dissolvida com ajuda de um palito de madeira. Em seguida, o material era distribuído em dois tubos cônicos de plástico (falcon) de 15 ml e, filtrado usando miniparasitofiltros descartáveis com tela de 8 mm que estavam sobre os tubos.

As amostras fecais foram analisadas com auxílio de microscópio óptico (aumento de 400x) utilizando corante lugol nas lâminas.

Vale ressaltar que, neste estudo, não houve repetições nos exames microscópicos e, também não houve contagem dos ovos dos helmintos, dada a

impossibilidade de prolongar o período de permanência nas comunidades para realização das atividades (mais de 40 dias em cada uma das quatro coletas).

Para diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* spp., *Isospora belli* e *Ciclospora cayetanensis* foi empregada nas duas primeiras coletas a técnica de coloração pela fucsina de Kynioun a frio (LENNETTE et al., 1985). Nas duas últimas coletas, além da coloração, foi utilizado teste imunocromatográfico para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por meio do kit comercial RIDA® QUICK *Cryptosporidium* (r-biopharm, Darmstadt, Germany).

Para detecção de Rotavírus e Adenovírus foram empregados testes imunocromatográficos (GABBAY et al., 2005), utilizando o kit comercial Bioeasy®. Caso fossem positivas para Rotavírus e/ou Adenovírus, seriam encaminhadas ao Instituto Evandro Chagas - IEC em Belém (PA), para tipagem por PCR precedida de transcrição reversa (RT-PCR) (DAS et al., 1994; GOUVEA et al., 1990).

3.3 Ensaio Imunoenzimático – ELISA

Para cumprimento desta etapa foi firmada uma colaboração com o Laboratório de Imunologia - Centro de Ciências da Saúde - Campus Centro Oeste Dona Lindu da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ).

Um total de 60 amostras foi selecionado para o teste, sendo 30 amostras previamente diagnosticadas negativas e 30 positivas para *E. histolytica/E. dispar* nas técnicas de Hoffman e Ritchie durante a 4ª coleta. Todas as amostras estavam conservadas em dicromato de potássio 2,5% e armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

Para o ensaio imunoenzimático foi utilizado o *Kit* comercial *E. histolytica* II® (Techlab, Blacksburg, Virginia, USA). O princípio da técnica consiste na detecção da adesina da *E. histolytica* utilizando anticorpos antiadesina.

As microplacas (96 cavidades) utilizadas foram aquelas fornecidas pelo fabricante, previamente sensibilizadas com anticorpos policlonais que se ligam a adesina do complexo *E. histolytica*/*E. dispar.*

Uma gota do conjugado (~50µL), que consiste em um anticorpo monoclonal ligado a peroxidase específico para a adesina da *E. histolytica*, era dispensado em cada cavidade. Em seguida eram adicionados 200µL de cada amostra fecal emulsificada no diluente fornecido no *Kit*. A microplaca era então incubada durante

2 horas à temperatura ambiente. Quando havia adesina na amostra, ocorria a ligação desta com o conjugado e o anticorpo policlonal imobilizado na placa. Após três etapas de lavagem acrescentava-se o substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) que, na presença do complexo enzima-anticorpo-adesina, induzia a formação de cor. Após cerca de 10min adicionava-se a solução bloqueadora (ácido sulfúrico 1M) em cada cavidade. Em todos os testes eram incluídos controles positivo e negativo disponibilizados pela UFSJ.

A microplaca era analisada em espectofotômetro (ELx808 Absorbance Microplate Reader-Biotek) sob comprimento de onda 450nm. A absorbância apresentada pelo controle negativo foi subtraída da leitura das cavidades do controle positivo e das amostras. Uma amostra era considerada positiva para a presença da adesina quando apresentava absorbância $\geq$ 0,050 (após subtração do valor de absorbância do controle negativo), e classificada como negativa quando o valor era inferior a 0,050, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4 Divulgação dos Resultados

Após os exames em cada período de coleta, os resultados eram divulgados à população por meio dos agentes de saúde indígena, e para a médica do município para tratamento médico e posterior controle de cura, além de disponibilizados à FUNASA para as intervenções pertinentes.

3.5 Tratamento

Os medicamentos eram receitados e administrados após o resultado de cada uma das quatro análises coproparasitológicas. A médica que acompanhava a execução dos trabalhos receitava medicamentos a todos os índios que apresentaram alguma espécie de parasita intestinal nas amostras fecais, por meio do protocolo estabelecido para este estudo (Anexo D). As administrações dos antiparasitários eram acompanhadas pela equipe de saúde de cada aldeia. A FUNASA e a Prefeitura Municipal de Confresa eram os órgãos responsáveis pela distribuição gratuita dos medicamentos pertencentes a farmácia básica.

3.6 Conservação e Armazenamento das Amostras Coletadas

Todas as amostras fecais diagnosticadas positivamente nas quatro coletas para alguma enteroparasitose foram conservadas em dicromato de potássio a 2,5% e, posteriormente transportadas em gelo reciclável para armazenamento a 4 ºC no Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP.

O dicromato de potássio foi utilizado principalmente para conservação de cistos de *Giardia intestinalis* e, posterior emprego da técnica coproparasitológica de Sheather para confirmação do resultado.

Durante a 4ª coleta as amostras positivas de *Blastocystis* spp. diagnosticadas nas técnicas de Hoffman e Ritchie foram conservadas em Etanol a 96%.

3.7 Diagnóstico Molecular

3.7.1 *Giardia intestinalis*

A tipagem molecular para *Giardia intestinalis* foi realizada nas amostras positivas pela técnica de Sheather (Sacarose), realizada junto ao Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – VPS, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP.

A técnica de Sheather modificada consistiu na diluição de aproximadamente 2 mL do material conservado em dicromato de postássio 2,5% em 11 mL de solução sacarose (d=1,203g/cm^3), seguida de filtração em uma camada de gaze e centrifugação do filtrado em tubos cônicos de 15 mL a 1500 rpm por 10 minutos. Logo após, uma alíquota da película superficial do material centrifugado foi recuperada com o auxílio de uma alça bacteriológica e disposta em uma lâmina. A preparação foi coberta com uma lamínula (1x1cm) para a observação dos cistos em microscópio óptico (aumento de 400 x).

O material positivo para cistos de *Giardia intestinalis* era inserido sobre uma placa de Petri estéril, após a lavagem da lâmina e lamínula onde os cistos foram observados, com 1,5 mL de tampão TE (10mM Tris-HCL pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0). O lavado obtido foi transferido da placa para um microtubo de 1,5mL e a seguir centrifugado a 12.000g por 10 minutos. Desprezado o sobrenadante, 1 mL do mesmo tampão foi adicionado e seguiu-se com outra centrifugação nas mesmas

condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo os cistos de *G. duodenalis* foi imediatamente submetido à extração de DNA ou armazenado a -20 °C para posterior processamento.

Após a fase microscópica, iniciou-se a extração de DNA utilizando a enzima Proteinase K, após a purificação em tampão TE com o intuito de Romper os cistos por choque-térmico.

Para tanto, em cada amostra foi adicionado 490 µL do tampão de digestão: 10mM TrisHCl pH 8.0; 100mM NaCl; 25mM EDTA e 1% SDS. Para a ruptura dos cistos foram realizados três ciclos consecutivos de congelamento em gelo seco, ou em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 57 °C. A seguir, 10 µL da enzima proteinase K (20mg/mL) foram adicionados a cada amostra e as mesmas foram incubadas em banho-maria por 2 horas a 57 °C ou “overnight” a 37 °C.

A etapa seguinte foi purificar e precipitar os produtos da digestão foi adicionado em cada amostra 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio, seguido por homogeneização em *vortex* e centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4° C. Posteriormente, para a precipitação, o sobrenadante (400 µL) foi transferido a novo microtubo de 1,5 mL e em seguida adicionou-se 400 µL de propanol absoluto. Após a homogeneização em *vortex*, a mistura alcoólica foi estocada por 2 horas em freezer -20 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 30 minutos a 4 °C e em seguida o propanol foi descartado por inversão de tubo. O sedimento foi suspenso em 500 µL de etanol 70% onde foi novamente centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo deixado em posição invertida até estar completamente seco. Posteriormente, 30 µL de TE (TrisHCL pH8,0 10mM; EDTA pH8,0 1mM) foram adicionados ao sedimento que após a homogeneização em *vortex* foi incubado a 56 °C por 10 minutos, seguindo de homogeneização e armazenamento a -20 °C até o momento da amplificação.

Após a extração do DNA foi realizada a amplificação das seqüências dos genes por meio da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR utilizando um gene mais conservado, o β-*Giardina* - *bg* e o gene *Glutamato Desidrogenase* – *gdh*, que além da PCR foi empregada a seminested-PCR (SOUZA, 2007)

Na PCR do *gdh* foram utilizados os *primers* GdhF-l (senso): 5´ AAY GAG GTY ATG CGC TTC TGC CA 3´ e #579ll (anti-senso): 5´ GAT GTT YGC RCC CAT CTG RTA GTT C 3´ visando a amplificação de um fragmento de aproximadamente 890 pb

e, na seminested-PCR foram utilizados os *primers* GdhF-II (senso): 5´ ACT TCC TBG AGG AGA TGT GCA AGG A 3´ e #579II (anti-senso): 5´ GAT GTT YGC RCC CAT CTG RTA GTT C 3´ com a finalidade de amplificar um fragmento menor, de 659 pb.

O protocolo de reação empregado utilizou 45 µL de mix de reagentes (31,2 µL água mQ; 1 µL dNTP (10mM); 3 µL de cada *primer* (10pmol/ µL); 5 µL de 10X PCR Buffer; 1,5 µL MgCl (50mM); 0,3 µL taq Polimerase (5U/ µL)) e 5 µL de DNA extraído, resultando um volume final de 50µL em cada microtubo que foi levado a máquina temocicladora.

Os parâmetros para o termociclador foram: aquecimento inicial de 95 °C por 3 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 56 °C por 30 segundos; e 72 °C por 120 segundos. Por fim seguiu-se um aquecimento final de 72 °C por 5 minutos.

Para o gene codificador β-Giardina foi utilizado o primer G7 (senso): 5' AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GC 3' e G759 (anti-senso): 5' GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC 3' nesta que foi utilizada apenas a amplificação primária de um fragmento de aproximadamente 753 pb, descritos por Cacciò, De Giacomo e Pozio (2002).

O protocolo de reação empregado utilizou 45 µL de mix de reagente (34,6 µL água mQ; 1 µL dNTP (10mM); 1 µL de cada *primer* (10pmol/ µL); 5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL MgCl (50mM); 0,4 µL taq Polimerase (5U/ µL)) e 5 µL de DNA extraído, resultando um volume final de 50 µL em cada microtubo que foi levado à máquina temocicladora.

Os parâmetros para o termociclador foram: aquecimento inicial de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 65 °C por 30 segundos; 72 °C por 60 segundos, seguidos de um aquecimento final de 72 °C por 7 minutos.

Os fragmentos amplificados dos genes *gdh* e *bg* foram visualizados através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em cuba horizontal, previamente imerso em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA pH 8,0 1mM).

Após a corrida eletroforética, executada a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm de gel), o gel foi corado em solução de brometo de etídeo a 0,5µg/mL durante 20 minutos. Para a visualização dos produtos amplificados o gel foi observado em transluminador ultravioleta.

As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb dispostos no gel juntamente com as amostras analisadas.

Logo após a separação dos produtos amplificados pela eletroforese, as bandas de interesse foram recortadas do gel e então purificadas com o auxílio de kit comercial, seguindo instruções do fabricante (GFX *Gel extraction system*).

Na reação de seqüenciamento automático foi utilizado o *kit* comercial *BigDye TM terminator – cycle sequencing ready reaction – Applied Biosystems*. O DNA obtido de cada produto de PCR após a reação de purificação descrita no item anterior foi utilizado como amostra para a reação de seqüenciamento. Cada produto de PCR foi seqüenciado em duplicata, com os *primers* senso e anti-senso para cada reação.

A reação de sequenciamento foi executada utilizando-se para cada amostra 4 µL *Sequencing buffer*, 2 µL de *BigDye* ^{TM} e 1 µL *primer*. A quantidade de DNA colocada foi de 13 µL, totalizando um volume final de 20 µL.

O ciclo de seqüenciamento foi efetuado no termociclador *Mastercycler Gradient Eppendorf* com a utilização do programa: Desnaturação inicial: 96 ºC por 1 minuto; desnaturação: 96 ºC por 15 segundos; rampa: 1,0 ºC/s; hibridização: 50 ºC por 15 segundos; rampa: 1,0 ºC/s; extensão: 60 ºC por 4 minutos; rampa: 1,0 ºC/s. O ciclo foi repetido por 39 vezes a partir da etapa de desnaturação (segunda etapa).

Após a reação de sequenciamento os produtos foram purificados por precipitação em álcool. Em cada amostra foi adicionado 80 µL de isopropanol a 65%, que após a homogeneização, as amostras foram mantidas em local protegida da luz por 30 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas a 16.000 rpm por 30 minutos. O isopropanol foi descartado por inversão de tubo e o sedimento foi homogeneizado com 300 µL de etanol a 60%. Uma nova centrifugação foi precedida a 16.000 rpm por 15 minutos. O excesso de etanol foi cuidadosamente aspirado com o auxílio de pipeta e os microtubos foram conduzidos ao banho-seco a 90º C por 5 minutos.

As amostras precipitadas foram mantidas a -20 ºC até o momento do sequenciamento.

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com 3,4 µL de formamida e Blue Dextran-EDTA (*Applied Biosystems*) na proporção de 5:1, colocadas em banho seco a 95 °C por 3 minutos e depois refrigeradas a 4 °C por 2 minutos. Em seguida

foram aplicadas na placa de sequenciamento através do protocolo do manual técnico do equipamento ABI Prism ^{TM} 377 DNA Sequencers (*Applied Biosystems*).

A qualidade dos produtos sequenciados, bem como a montagem da seqüência final de cada amostra foi realizada utilizando-se o programa *Phred-Phrap*, contido na suíte *Codoncode Aligner.*

Determinadas as seqüências de nucleotídeos de cada amostra, as mesmas foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W, contido na suíte *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999), tomando-se como base seqüências homólogas disponíveis no GenBank (2010) para os genes *bg* e *gdh* (quadro 3).

Com o auxílio do programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) foi avaliado o grau de diversidade nucleotídica existente entre as seqüências e árvores filogenéticas foram elaboradas empregando-se métodos de distância.

Quadro 3 – Relação das seqüências de β-giardina (*bg*) e Glutamato desidrogenase (*gdh*), retiradas do GenBank para comparação com as amostras deste estudo

gene	Assemblage	N° GenBank	Hospedeiro	Origem
bg	A	EU014394	Ser humano	Afeganistão
bg	A	GQ919293	Peixe	Austrália
bg	A	AY072723	Ser humano	Itália
bg	A	EU621373	Cervo	Polônia
bg	B	EUO14392	Animal silvestre	Alasca
bg	B	AY072727	Ser humano	Austrália
bg	B	DQ090526	Ser humano	Noruega
bg	B	AY647266	Gado	Itália
bg	C	AY545646	Cão	Itália
bg	D	AY370530	Coiote	EUA
bg	E	DQ116604	Ovino	México
bg	E	AY072729	Suíno	República Tcheca
bg	F	AY647264	Gato	Itália
gdh	A	EF507605	Gato	Brasil
gdh	A	AY178737	Ser humano	Austrália
gdh	A	M84604	Ser Humano	EUA
gdh	A	EF507600	Gato	Brasil
gdh	B	AY178756	Ser humano	México
gdh	B	AY178750	Cão	Canadá
gdh	C	EF507637	Cão	Brasil
gdh	D	EF507612	Cão	Brasil
gdh	E	AY178741	Suíno	República Tcheca
gdh	F	EF507608	Gato	Brasil
gdh	G	AF069058	Rato	Austrália
gdh	H	GU176092	Foca	EUA

FONTE: Malheiros (2011)

3.7.2 *Blastocystis* spp.

Após o diagnóstico coproparasitológico, por meio das técnicas de sedimentação espontânea (Hoffman) e centrifugo-sedimentação em formol-éter (Ritchie) durante a 4ª coleta, as amostras fecais positivas para *Blastocystis* spp. foram preservadas em etanol 96% e mantidas sob refrigeração a 4 °C, para posterior tipagem molecular.

Para isso, foi firmada colaboração com o Pathogen Molecular Biology Department, London School of Hygiene and Tropical Medicine, University of London, por meio de doutorado sanduíche financiado pelo CNPq**.**

Inicialmente, as amostras positivas na microscopia foram lavadas três vezes em tampão fosfato-salina (PBS) antes da extração usando o QIAamp^{TM} DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante, exceto os DNAs que foram eluídos em 100μL de tampão AE.

PCR e seqüenciamento foram realizados como descrito por Scicluna, Tawari e Clark (2006) visando a pequena subunidade ribossomal nuclear RNA (SSU-rRNA), utilizando os primers bl1400ForC e bl1710RevC, que amplificam um fragmento de 310 bp do gene ssrRNA, e Extrato-N-Amp PCR Readymix (Sigma-Aldrich Dinamarca, Brøndby, Dinamarca). Nos casos em que seqüências indicaram a presença de um novo ST potencial, os primers RD5 e BhRDr (SCICLUNA; TAWARI; CLARK, 2006) foram empregados para obter informações adicionais ssrRNA seqüência do gene para a inclusão nas análises filogenéticas. Os produtos de PCR foram purificados utilizando Gene JETTM do kit de purificação (Fermentas, Londres, Reino Unido) e, seqüenciado unidirecionalmente usando o primer BhRDr, um BigDye seqüenciamento AI versão Kit 3.1. (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e um seqüenciador ABI 3730.

As seqüências foram editadas com Chromas versão 2.33 (Technelysium Pty Ltd., Austrália) alinhadas com Multalin (2011) e, comparadas individualmente com as seqüências de gene *Blastocystis* SSU-rRNA disponíveis no GenBank (2010) utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Os subtipos foram identificados para determinar a correspondência exata ou a mais próxima semelhança com todos os subtipos conhecidos de *Blastocystis* conforme a classificação estabelecida por Stensvold et al. (2007a).

As análises filogenéticas foram feitas usando a versão do software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Inferência filogenética foi realizada pelo método de neighbor-joining (NJ) de Saitou e Nei (1987). Distância genética foi calculada por meio do modelo Kimura-2-parâmetros. A confiabilidade foi avaliada utilizando análise bootstrap (1000 repetições).

Os subtipos foram identificados por determinar a correspondência exata ou a mais próxima semelhança com todos os subtipos de *Blastocystis* conhecidos. Infecções mistas de subtipo foram identificadas pela presença de mais de uma seqüência de nucleotídeos distintos em traços seqüência, observou que os picos de duplas em áreas semi-conservadas do gene.

3.8 Análise dos dados

Os dados foram compilados em tabela (Excel versão 2007) para posterior análise estatística.

Informações epidemiológicas, incluindo as associações entre parasitas e época do ano, clínicas, microscópicas e moleculares foram analisadas estatisticamente usando as técnicas de qui-quadrado de Pearson eteste exato de Fisher. Considerou-se um nível de significância (α) de 0,05. Para realização das análises estatísticas e gráficas utilizou-se o pacote SPSS® (SPSS, 2010).

3.9 Capacitação

Na última fase do projeto, mediante o diagnóstico do quadro epidemiológico da comunidade em estudo, foram realizadas reuniões com a liderança e os profissionais da área de saúde atuantes na aldeia, bem como de palestras destinadas à comunidade em geral, com o objetivo de sensibilização quanto aos fatores de risco para enteroparasitoses e condições de saúde e vida dos Tapirapé. Ocorreram também oficinas de educação em saúde para a liderança indígena, agentes de saúde indígena, professores indígenas e comunidade.

3.10 Aspectos Éticos

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP's) da Universidade de São Paulo (USP), que aprovou e encaminhou para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP por se tratar de comunidade indígena. O estudo está aprovado junto à CONEP sob número 120/2008.

O projeto também foi enviado ao setor de Análise de Projetos de Pesquisa da Fundação Nacional do Índio – FUNAI, que emitiu autorização para ingresso em Terra Indígena Tapirapé, somente após o paracer favorável do CNPq quanto ao mérito científico.

Os TCLE's foram apresentados à comunidade antes do início das atividades, de modo a esclarecer os participantes do estudo seus direitos em relação à pesquisa. O termo foi feito para cada um dos entrevistados, respeitando a política estabelecida pela liderança Tapirapé. Todos tiveram oportunidade de pensar e fazer perguntas até que se sentissem plenamente esclarecidos. O direito ao sigilo e privacidade, bem como todos aqueles previstos na Resolução CNS 196/96 e suas complementares foram cuidadosamente observados, considerando o respeito pleno à cultura e modo de vida dos sujeitos.

4 RESULTADOS

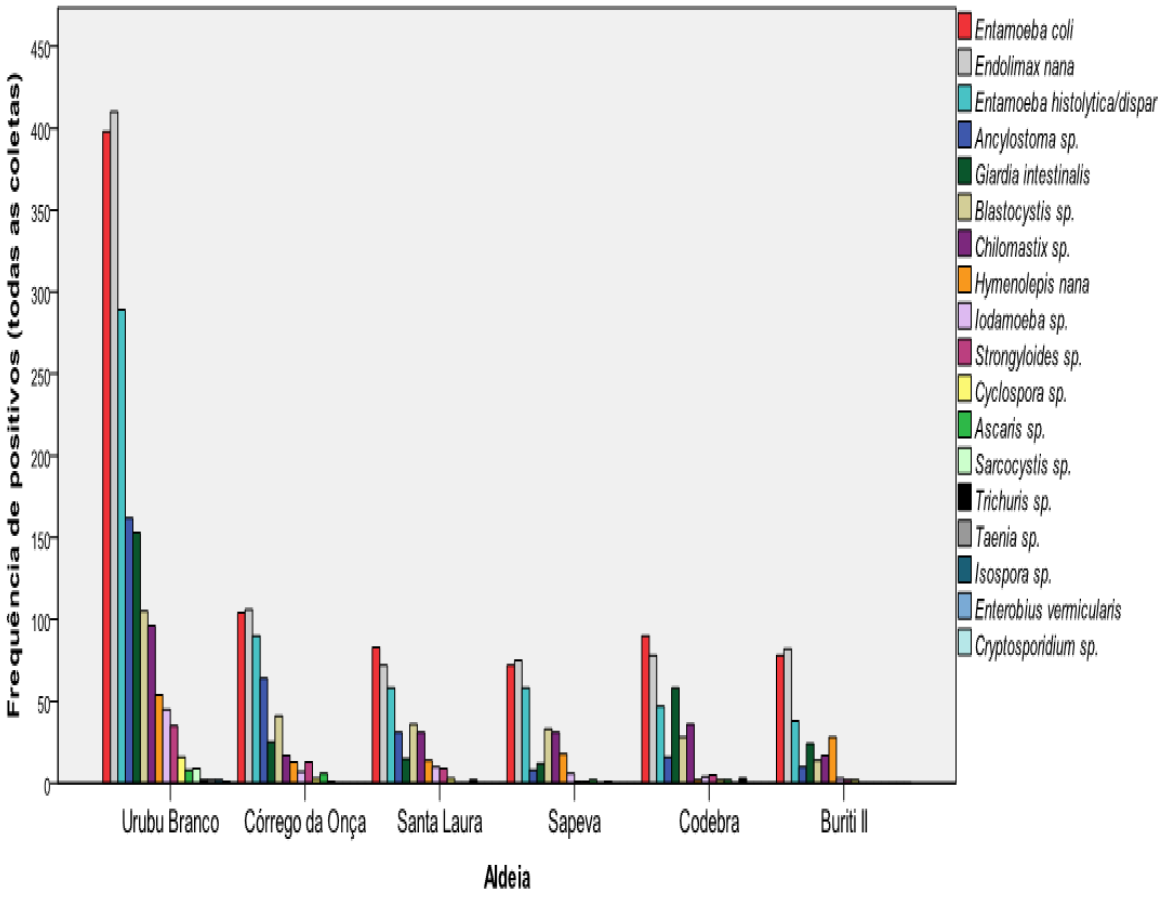
4.1 Análises coproparasitológicas

Nos quatro trabalhos de campo, envolvendo as seis aldeias indígenas Tapirapé do Mato Grosso, 1526 amostras fecais foram coletadas e examinadas entre 2008 e 2010.

A figura 9 apresenta a distribuição dos parasitas intestinais nas quatro coletas realizadas nas seis aldeias indígenas.

A prevalência de ao menos uma espécie de parasita intestinal nas amostras fecais indígenas atingiu 83,35% com 1272 das 1526 amostras analisadas positivas, demonstrando um resultado bastante expressivo de infecação por parasitas intestinais entre os Tapirapé (tabela 2).

Figura 9 – Frequência de parasitas intestinais observadas nas 1526 amostras analisadas nas seis aldeias Tapirapé



FONTE: Malheiros (2011)

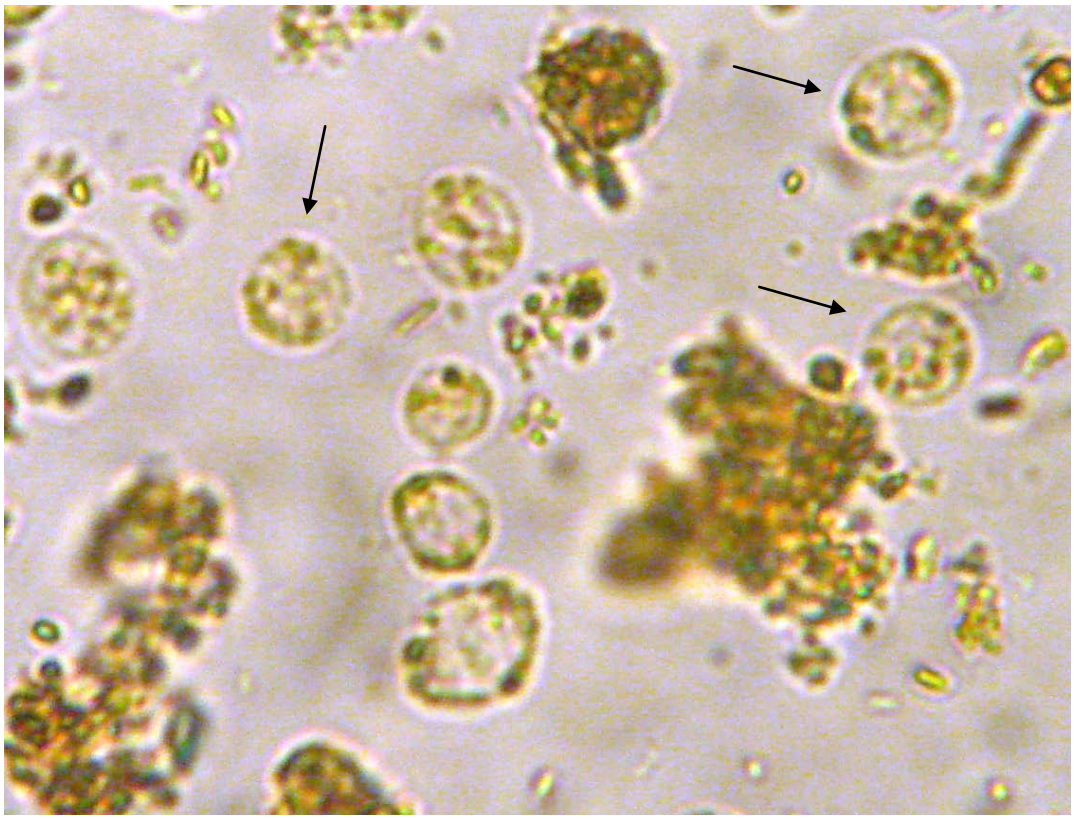
Tabela 2 – Número de exames coproparasitológicos realizados por aldeia nas quatro coletas entre 2008 e 2010 na Terra Indígena Urubu Branco, etnia Tapirapé, Mato Grosso

Aldeia	COLETAS														
	1ª coleta			2ª Coleta			3ª coleta			4ª coleta			Total		
	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%
Urubu Branco	175	159	43,92	174	139	37,07	202	162	39,80	193	166	43,46	744	626	41,02
Córrego da Onça	31	28	7,73	45	37	9,86	49	37	9,09	51	44	11,52	176	146	9,57
Sapeva	47	41	11,33	41	24	6,40	42	26	6,39	35	29	7,59	165	120	7,86
Codebra	28	26	7,18	47	40	10,93	45	36	8,85	39	37	9,69	159	139	9,11
Santa Laura	46	41	11,33	31	25	6,67	36	23	5,65	38	30	7,85	151	119	7,80
Buriti II	35	34	9,39	37	32	8,53	33	32	7,86	26	24	6,28	131	122	7,99
Total	**362**	**329**	**90,88**	**375**	**297**	**79,46**	**407**	**316**	**77,64**	**382**	**330**	**86,39**	**1526**	**1272**	**83,35**

N = Número examinado; P = Número de amostras positivas; % = Porcentagem de positivos
FONTE: Malheiros (2011)

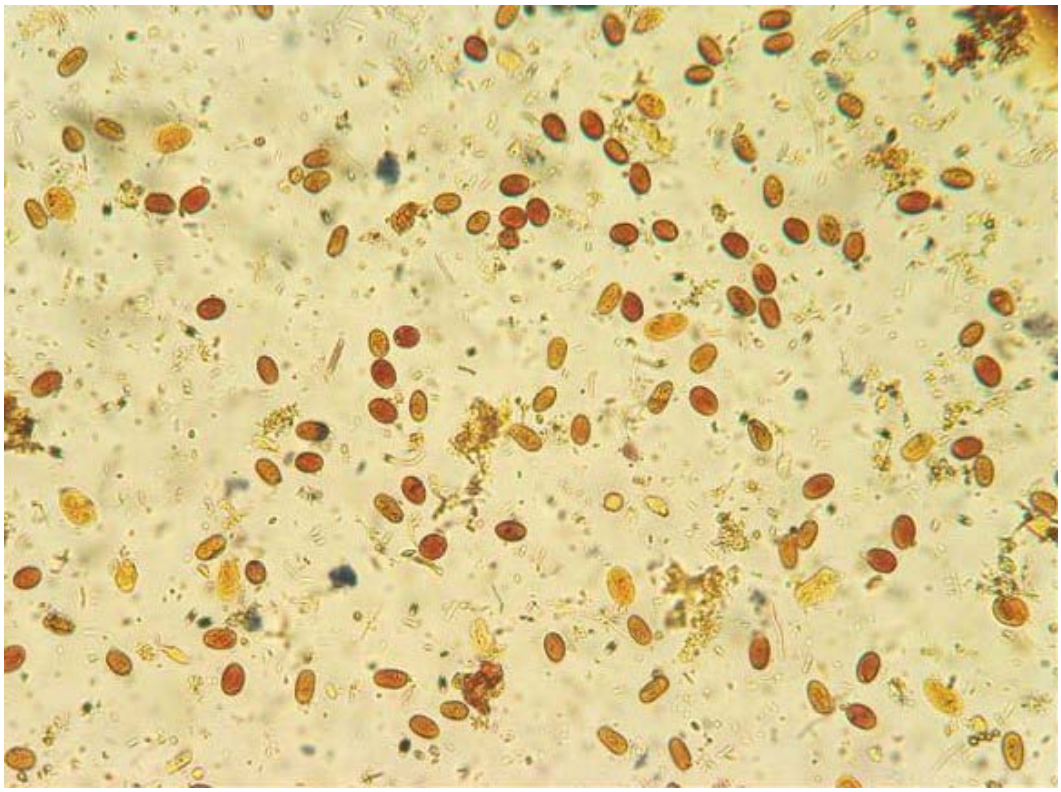
O protozoário intestinal mais ocorrente nas seis aldeias foi *Entamoeba coli* com 827 amostras positivas (54,19%), seguido de *Endolimax nana* em 825 amostras (54,06%). Na sequência, os mais ocorrentes foram *Entamoeba histolytica/E. dispar* observado em 581 amostras (38,07%), *Giardia intestinalis* prevalente em 287 (18,81%) e *Blastocystis* spp. diagnosticado em 257 amostras positivas (16,84%), os quais podem ser observados nas figuras 10 a 12.

Figura 10 – Cistos de *Blastocystis hominis em* lugol pela técnica de Ritchie. Aumento 400x



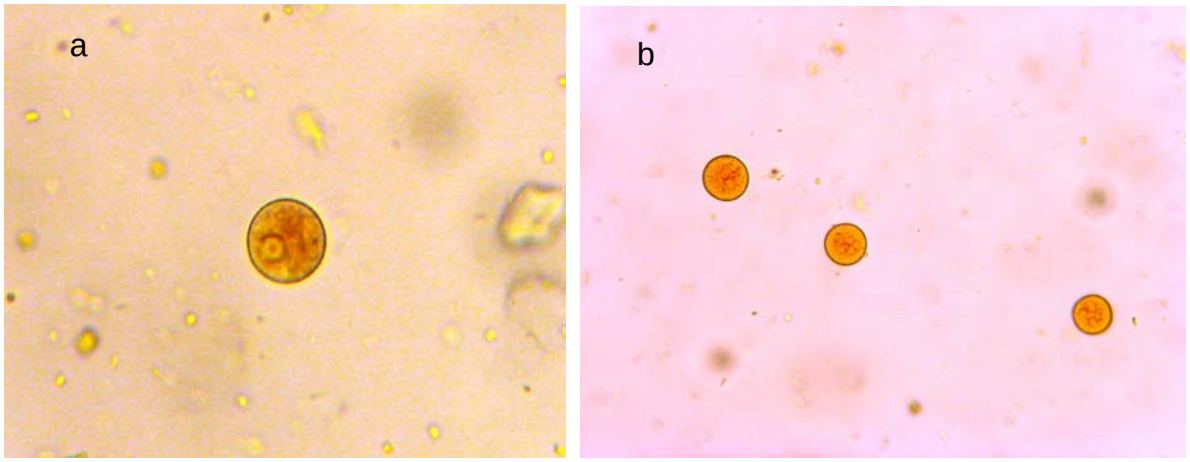
FONTE: Malheiros (2011)

Figura 11 - Cistos de *Giardia intestinalis* em lugol pela técnica de Ritchie. Aumento 400x



FONTE: Malheiros (2011)

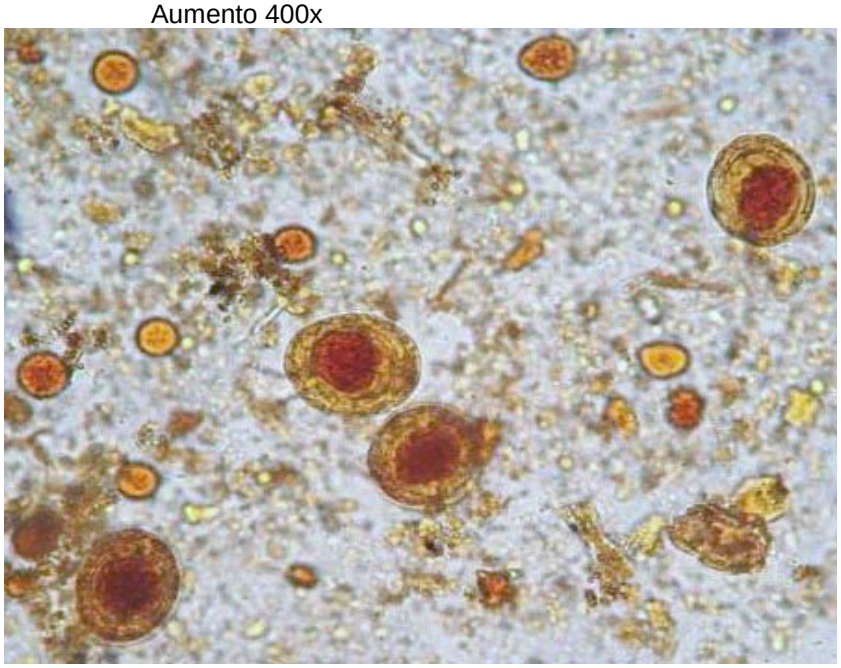
Figura 12 - Cistos de *E. histolytica/dispar* (a) e *E. coli* (b) em lugol pela técnica de Ritchie. Aumento 400x



FONTE: Malheiros (2011)

Entre os helmintos, os três mais prevalentes, observados nas figuras 13 e 14, foram *Ancylostoma* spp. presente em 293 das amostras analisadas (19,20%), acompanhado por *Hymenolepis nana* presente em 129 amostras (8,45%) e em seguida pelo *Strongyloides stercoralis* em 66 amostras (4,33%), (figuras 16 e 17).

Figura 13 - Ovos de *Hymenolepis nana* em lugol pela técnica de Hoffman. Aumento 400x



FONTE: Malheiros (2011)

Figura 14 - Ovo de ancilostomídeo (a) e larva de *Strongyloides stercoralis* (b) em lugol pela técnica de Hoffman. Aumento 400x

FONTE: Malheiros (2011)

Endolimax nana foi o protozoário intestinal de maior prevalência em quatro das seis aldeias Tapirapé. O parasita foi diagnosticado em 62,60% das amostras da aldeia Buriti II, em 60,23 da Córrego da Onça, em 55,24% da aldeia Urubu Branco e, em 45,45% das amostras da aldeia Sapeva. Dados apresentados na tabela 3.

Já *Ancylostoma* spp. foi entre os helmintos o mais prevalentes em quatro das seis aldeias, com prevalência em 36,36% na Córrego da Onça, 21,91% na Urubu Branco, 20,53% na Santa Laura e 10,69 na aldeia Codebra to total as amostras analisadas por aldeia. Os resultados de outros helmintos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 3 – Prevalência dos protozoários intestinais por aldeia nas quatro coletas entre 2008 e 2010 na Terra Indígena Urubu Branco, etnia Tapirapé, Mato Grosso

Protozoário intestinal	ALDEIAS																				
	Urubu Branco			Córrego da Onça			Sapeva			Codebra			Santa Laura			Buriti II			Total		
	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%
***Blastocystis* spp.**	744	105	14,11	176	41	23,30	165	33	20	159	28	17,61	151	36	23,84	131	14	10,69	1526	257	16,84
C. cayetanensis	744	16	2,15	176	3	1,70	165	1	0,61	159	2	1,26	151	3	1,99	131	2	1,53	1526	27	1,77
C. mesnili	744	96	12,90	176	17	9,66	165	31	18,79	159	36	22,64	151	31	20,53	131	17	12,98	1526	228	14,94
E. coli	744	399	53,63	176	104	59,09	165	72	43,64	159	91	57,23	151	83	54,97	131	78	59,54	1526	827	54,19
E. histolytica*	744	290	38,98	176	90	51,14	165	58	35,15	159	47	29,56	151	58	38,41	131	38	29,01	1526	581	38,07
E. nana	744	411	55,24	176	106	60,23	165	75	45,45	159	79	49,69	151	72	47,68	131	82	62,60	1526	825	54,06
G. intestinalis	744	153	20,56	176	25	14,20	165	12	7,27	159	58	36,48	151	15	9,93	131	24	18,32	1526	287	18,81
I. butschlii	744	46	6,18	176	7	3,98	165	6	3,64	159	4	2,52	151	10	6,62	131	3	2,29	1526	76	4,98
I. belli	744	2	0,27	176	0	0	165	0	0	159	0	0	151	0	0	131	0	0	1526	2	0,13
***Sarcocystis* spp.**	744	9	1,21	176	1	0,57	165	0	0	159	0	0	151	0	0	131	0	0	1526	10	0,66

N = Número examinado nas quatro coletas; P = Número de amostras positivas; % = Porcentagem de positivos; **Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*

FONTE: Malheiros (2011)

Tabela 4 – Prevalência dos helmintos por aldeia nas quatro coletas entre 2008 e 2010 na Terra Indígena Urubu Branco, etnia Tapirapé, Mato Grosso

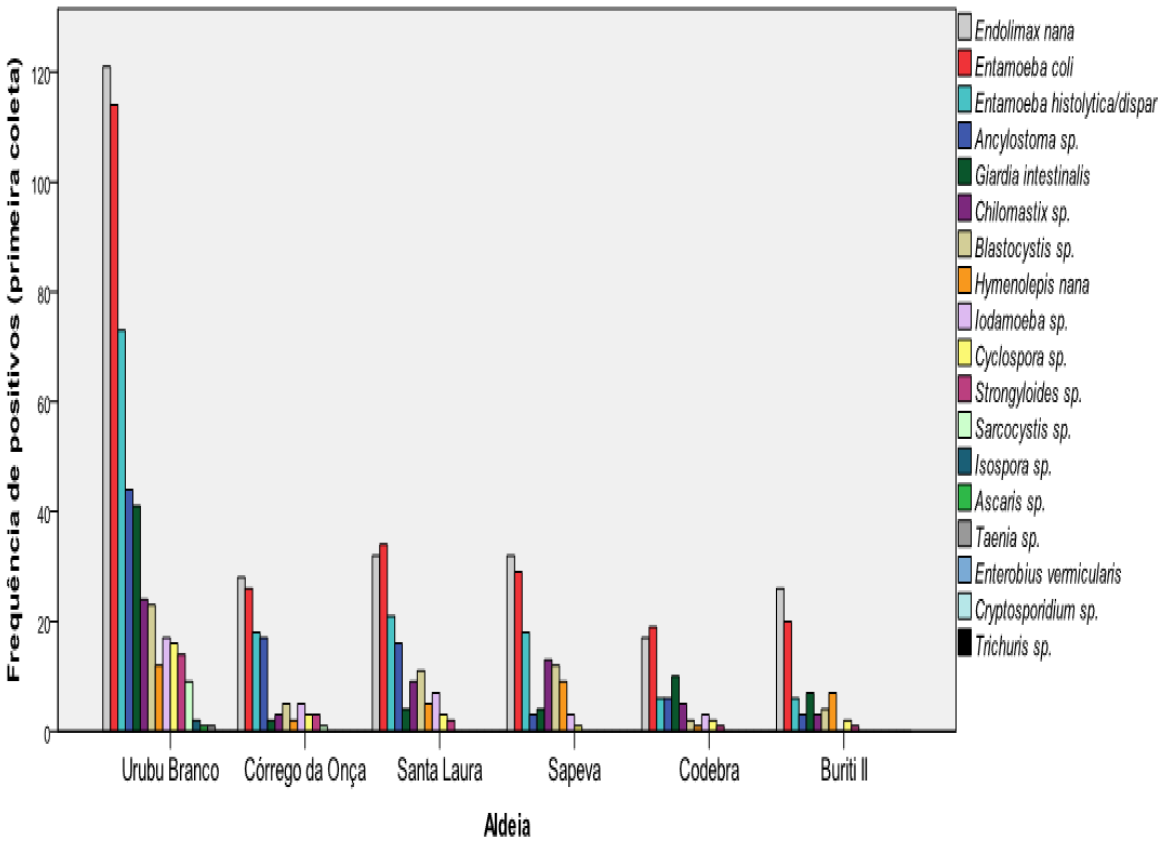
Helminto	ALDEIAS																				
	Urubu Branco			Córrego da Onça			Sapeva			Codebra			Santa Laura			Buriti II			Total		
	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%	N	P	%
***Ancylostoma* spp.**	744	163	21,91	176	64	36,36	165	8	4,85	159	17	10,69	151	31	20,53	131	10	7,63	1526	293	19,20
A. lumbricoides	744	8	1,08	176	6	3,41	165	2	1,21	159	2	1,26	151	0	0	131	0	0	1526	18	1,18
H. nana	744	54	7,26	176	13	7,39	165	18	10,91	159	2	1,26	151	14	9,27	131	28	21,37	1526	129	8,45
S. stercoralis	744	36	4,84	176	13	7,39	165	1	0,61	159	5	3,14	151	9	5,96	131	2	1,53	1526	66	4,33
***Taenia* spp.**	744	2	0,27	176	0	0	165	0	0	159	0	0	151	4	2,65	131	0	0	1526	6	0,39
Trichuris trichiura	744	2	0,27	176	0	0	165	1	0,61	159	3	1,89	151	2	1,32	131	0	0	1526	8	0,52

N = Número examinado nas quatro coletas; P = Número de amostras positivas; % = Porcentagem de positivos
FONTE: Malheiros (2011)

Nas figuras 15 a 18 são apresentadas a frequência dos parasitas intestinais por coleta em cada uma das seis aldeias estudadas.

Na 1ª coleta (julho e agosto de 2008), os resultados foram similares aos dados observados em todas as coletas, prevalecendo *E. nana* e *E. coli* entre os protozoários intestinais e, *Ancylostoma* spp. e *Hymenolepis nana* entre os helmintos.

Figura 15 – Frequência dos parasitas intestinais analisados por aldeia durante a 1ª coleta



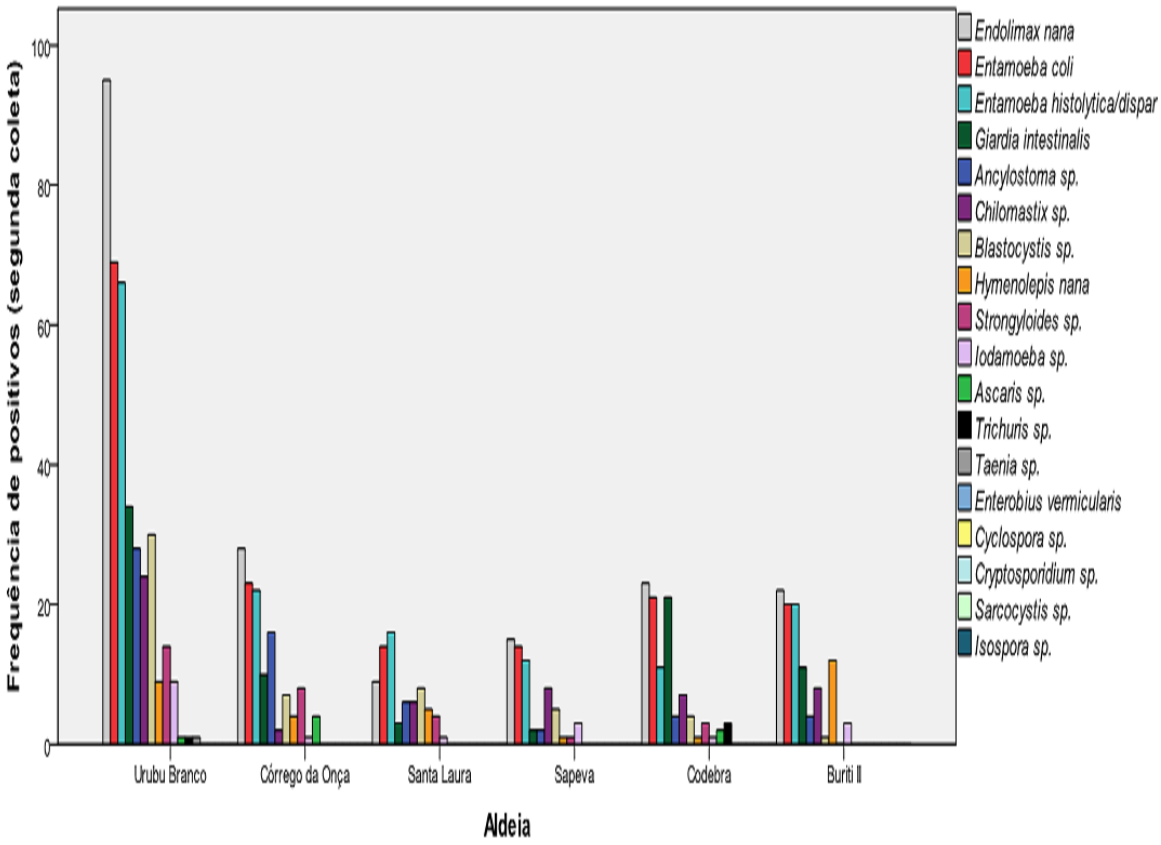
FONTE: Malheiros (2011)

Na 2ª coleta (janeiro e fevereiro de 2009), seis meses após a 1ª coleta e quatro meses após a administração dos antiparasitários aos índios com resultados positivos para ao menos um parasita intestinal, houve uma pequena mudança na distribuição dos parasitas com diminuição das amostras positivas de *Giardia intestinalis* na aldeia Urubu Branco de 23,43% para 19,54% e, de *E. histolytica/E. dispar* de 42,29% para 37,93%.

Em contrapartida, a quantidade de amostras positivas de *Giardia intestinalis* elevou de 6,45% para 22,22% na aldeia Córrego da Onça e, de 35,71% para 45,65% na aldeia Codebra.

Entamoeba histolytica/*Entamoeba dispar* sofreu um aumento substancial na aldeia Buriti II de 17,14% na 1ª coleta para 54,05% na 2ª coleta.

Figura 16 – Frequência dos parasitas intestinais analisados por aldeia durante a 2ª coleta.



FONTE: Malheiros (2011)

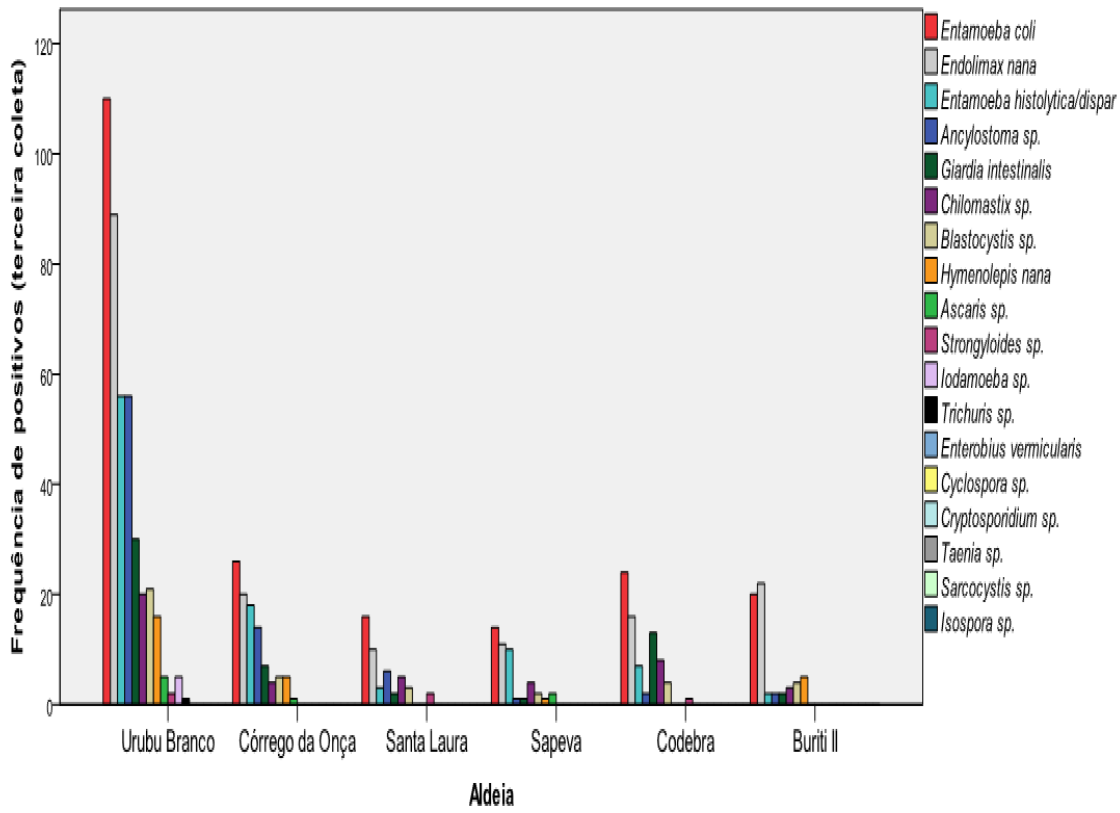
Na 3ª coleta (julho e agosto de 2009) e, quatro meses após a 2ª medicação aos índios com resultados positivos, houve uma inversão nos valores em relação as duas coletas anteriores, uma vez que *E. coli* foi o mais prevalente em cinco das seis aldeias, superando a prevalência de *E. nana* que fora mais frequente em quatro aldeias na 1ª coleta e cinco aldeias na 2ª coleta, mantendo sua prevalência apenas na aldeia Buriti II.

Nota-se uma diminuição no número de amostras positivas de *Giardia intestinalis* da coleta anterior para esta, em metade das aldeias (Córrego da Onça,

Codebra e Buriti II). O mesmo acontecimento é observado para as amostras de *Hymenolepis nana* nas aldeias Santa Laura e Buriti II.

Ancylostoma spp. apresentou aumento da incidência após diminuição observada na 2ª coleta.

Figura 17 – Frequência dos parasitas intestinais analisados por aldeia durante a 3ª coleta



FONTE: Malheiros (2011)

Na última coleta (janeiro e fevereiro de 2010), realizada seis meses após a 3ª coleta e, quatro meses após a 3ª medicação dos indígenas positivas para ao menos um parasita intestinal, houve um aumento significativo nos casos de *E. histolytica*/*E. dispar* em todas as aldeias e este patógeno foi o mais comum em duas aldeias (Córrego da Onça e Sapeva).

Entamoeba coli foi o mais prevalente nas aldeias Codebra e Buriti II. Na Urubu Branco o protozoário, também foi o mais prevalente juntamente com *E. nana*, que foi o mais ocorrente na aldeia Santa Laura.

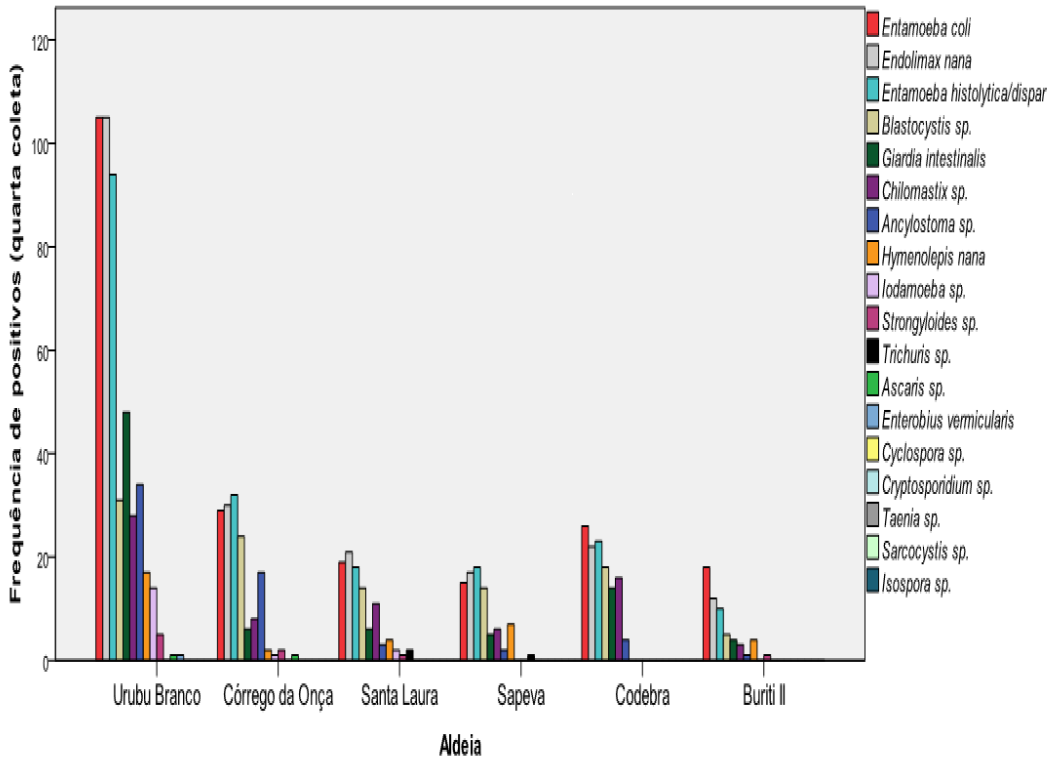
Hymenolepis nana, na aldeia Córrego da Onça, entretanto, apresentou aumento de incidência da 3ª para a 4ª coleta, e *Ancylostoma* spp. diminuiu sua

incidência na aldeia Urubu Branco, e aumentou sua incidência na aldeia Codebra nesta última coleta.

Ascaris lumbricoides que, apesar de ter apresentado baixa prevalência (1,18%) em relação ao total das amostras analisadas, teve um aumento gradativo da incidência da 1ª para a 3ª coleta, sendo diagnosticado em uma, seis e oito amostras respectivamente. Entretanto, na última coleta, ocorreu queda na incidência, sendo este diagnosticado em apenas duas amostras. Já *Enterobius vermicularis* e *Taenia* spp. foram diagnosticados em apenas um e dois indivíduos, respectivamente, em todas as coletas realizadas.

Durante as análises por meio da técnica de Kinyoun a frio, *Ciclospora cayetanensis* foi diagnosticado em 1,77% do total de amostras analisadas, *Sarcocystis* spp. em 0,66% e, *Isospora belii* em apenas 0,13% das amostras examinadas. Estes protozoários foram diagnosticados somente na 1ª coleta.

Figura 18 – Frequência dos parasitas intestinais analisados por aldeia durante a 4ª coleta

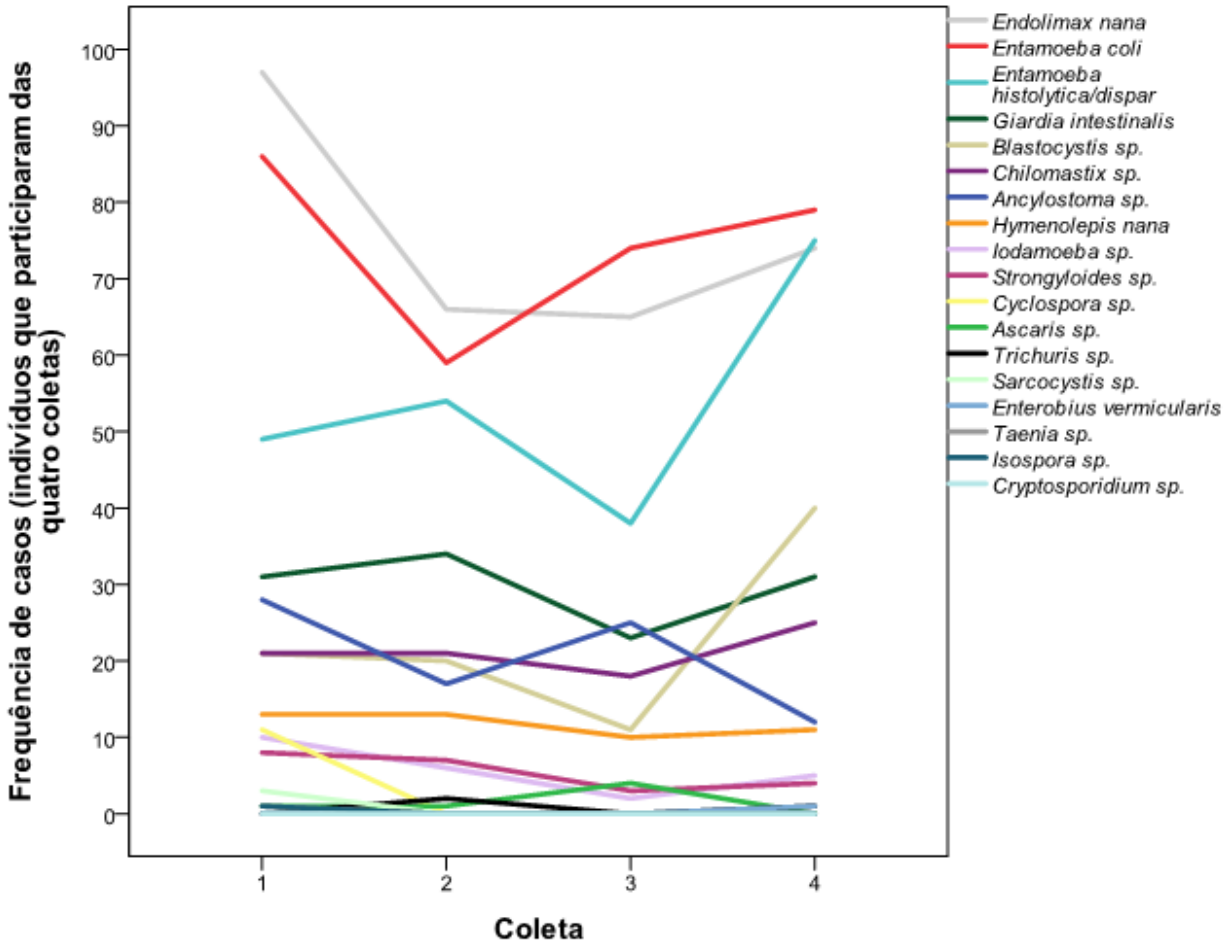


FONTE: Malheiros (2011)

Neste estudo houve 140 indivíduos que participaram de todas as quatro coletas. A figura 19 ilustra os resultados dos exames coproparasitológicos destes indivíduos.

Nesta análise verifica-se que a prevalência dos parasitas intestinais foi oscilante, caso este que se aplica ao helminto *Ancylostoma* spp. e, aos protozoários intestinais *E. nana, E. coli, G. intestinalis*, *E. histolytica*/*E. dispar* e *Blastocystis* spp, sendo que estes dois últimos duplicaram suas prevalências da primeira coleta comparada com a última.

Figura 19 – Freqüência dos parasitas intestinais observados nos participantes de todas as quatro coletas

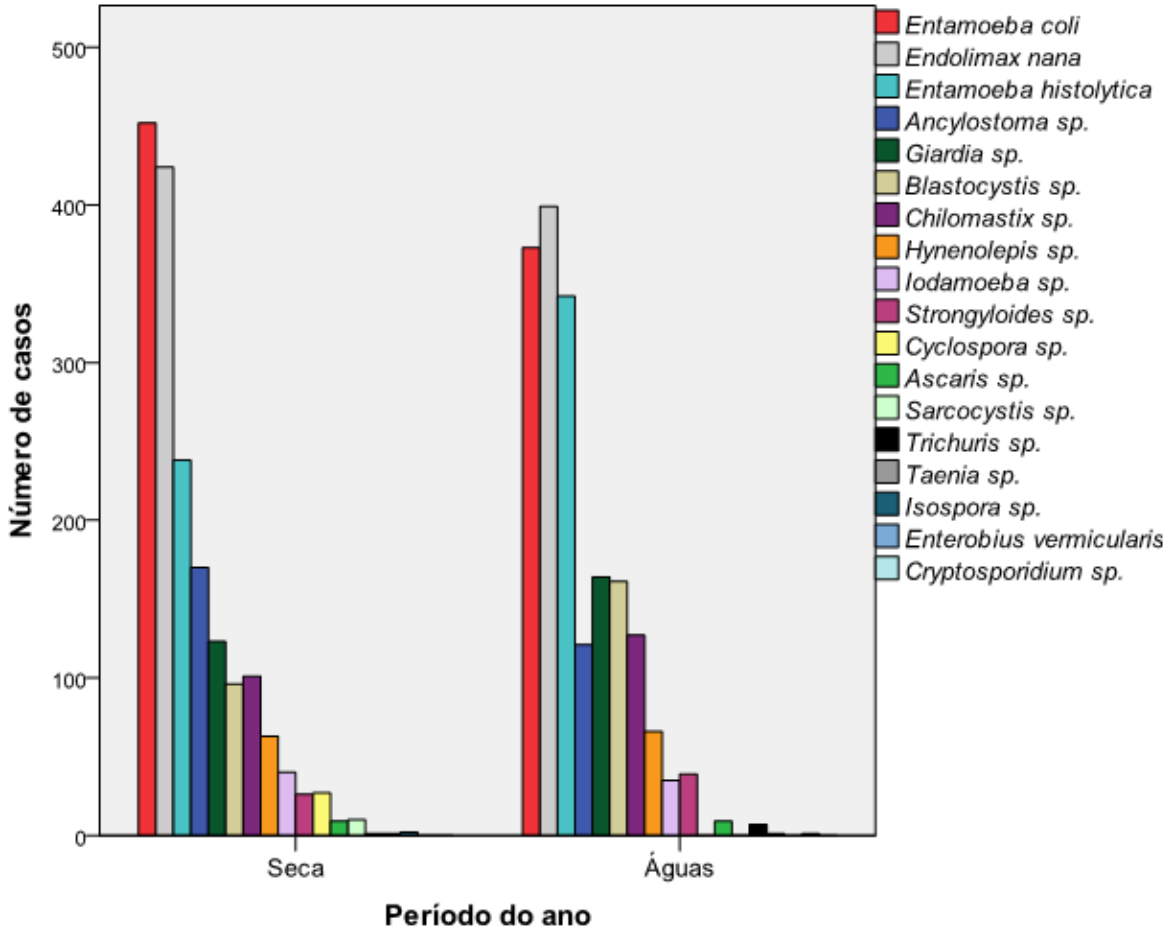


FONTE: Malheiros (2011)

Na análise realizada relacionando a presença dos parasitas intestinais com a época do ano envolvendo todas as coletas (figura 20), observou-se associação entre o aumento da incidência dos helmintos *Ancylostoma* spp ($p<0,02$) e *Trichuris trichiura* ($p=0,037$) com a estação chuvosa na região e, dos protozoários,

Blastocystis spp. (p<0,001), *Chilomastix* spp (p=0,046), *E. coli* e *E. histolytica*/*E. dispar* (p<0,001), *Giardia intestinalis* (p<0,004), *Sarcocystis* spp. (p<0,002), com a época da seca.

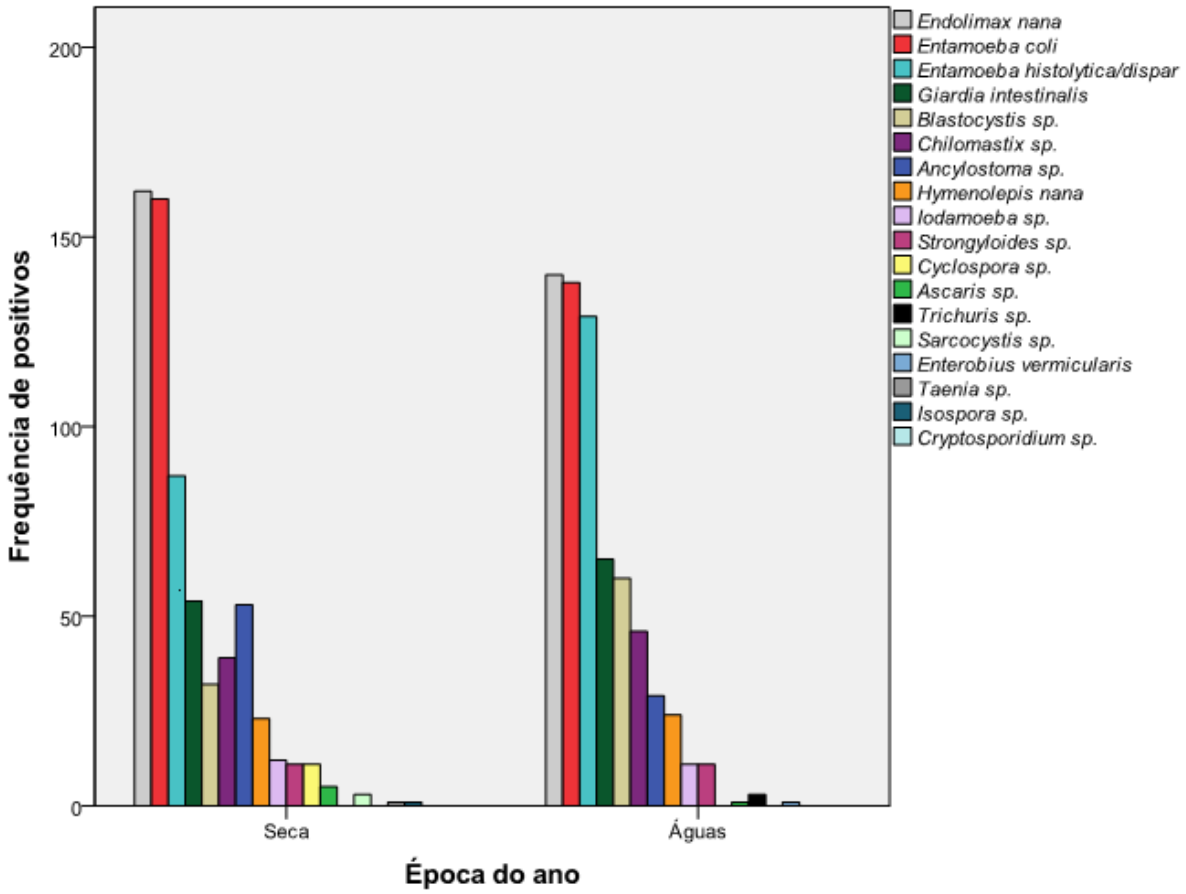
Figura 20 – Relação parasita intestinal com época do ano nas quatro coletas



FONTE: Malheiros (2011)

Na análise envolvendo os indivíduos que participaram de todas as quatro coletas, *Blastocystis* spp. e *E. histolytica*/*E. dispar* foram mais freqüentes no período chuvoso (p<0,001). Já na época da seca os mais prevalentes foram *Ancylostma* spp. (p=0,003) e *Chilomastix* spp. (p<0,001) conforme apresentado na figura 21.

Figura 21 – Relação parasita intestinal com época do ano nos participantes das quatro coletas



FONTE: Malheiros (2011)

Nas análises macroscópicas de fezes durante as quatro coletas realizadas, os itens consistência fecal (tabela 5) e aspecto fecal (tabela 6) foram considerados durante os exames. As fezes que apresentaram consistência pastosa foram as mais comuns com 48,49% do total das amostras analisadas nas quatro coletas com esta consistência.

Tabela 5 – Relação da consistência fecal observada nas amostras em todas as coletas

Coleta	Formada N (%)	Pastosa N (%)	Cíbalos N (%)	Diarréica N (%)	Total N (%)
1ª coleta	88 (24,31)	211 (58,29)	12 (3,31)	51 (14,09)	**362 (100)**
2ª coleta	105 (28)	175 (46,67)	10 (2,66)	85 (22,67)	**375 (100)**
3ª coleta	106 (26,05)	174 (42,75)	22 (5,40)	105 (25,80)	**407 (100)**
4ª coleta	141 (36,91)	180 (47,12)	6 (1,57)	55 (14,40)	**382 (100)**
Total N (%)	**440 (28,83)**	**740 (48,49)**	**50 (3,28)**	**296 (19,40)**	**1526 (100)**

FONTE: Malheiros (2011)

Para a característica macroscópica aspecto fecal, as fezes normais obtiveram uma porcentagem bem superior aos demais aspectos analisados dentre as 1526 amostras em todas as coletas.

Tabela 6 – Distribuição das amostras em relação ao aspecto fecal analisado em todas as coletas

Coleta	Normal N (%)	Mucoso N (%)	Sanguinolento N (%)	Muco-sanguinolento N (%)	Total N (%)
1ª coleta	342 (94,48)	16 (4,42)	1 (0,28)	3 (0,82)	**362 (100)**
2ª coleta	311 (82,94)	48 (12,80)	14 (3,73)	2 (0,53)	**375 (100)**
3ª coleta	382 (93,86)	16 (3,93)	7 (1,72)	2 (0,49)	**407 (100)**
4ª coleta	356 (93,19)	26 (6,81)	0	0	**382 (100)**
Total N (%)	**1391 (91,15)**	**106 (6,95)**	**22 (1,44)**	**7 (0,46)**	**1526 (100)**

FONTE: Malheiros (2011)

Dentre os indivíduos analisados 65% apresentaram dois ou mais diferentes espécies de parasitas intestinais nos exames coproparasitológicos, sendo oito a maior diversidade de parasitas albergados por um indivíduo durante todo estudo.

A tabela 7 apresenta a distribuição dos casos de poliparasitismo envolvendo apenas os parasitas intestinais patogênicos: *E. histolytica/E. dispar*, *Giardia intestinalis, Cyclospora cayetanensis, Isospora belli, Ancylostoma* spp., *Ascaris lumbricoides, Hymenolepis nana, Strongyloides stercoralis, Tenia solium* e *Trichuris trichiura* observados neste estudo.

Tabela 7 – Freqüência do número de parasitas intestinais observados nas quatro coletas

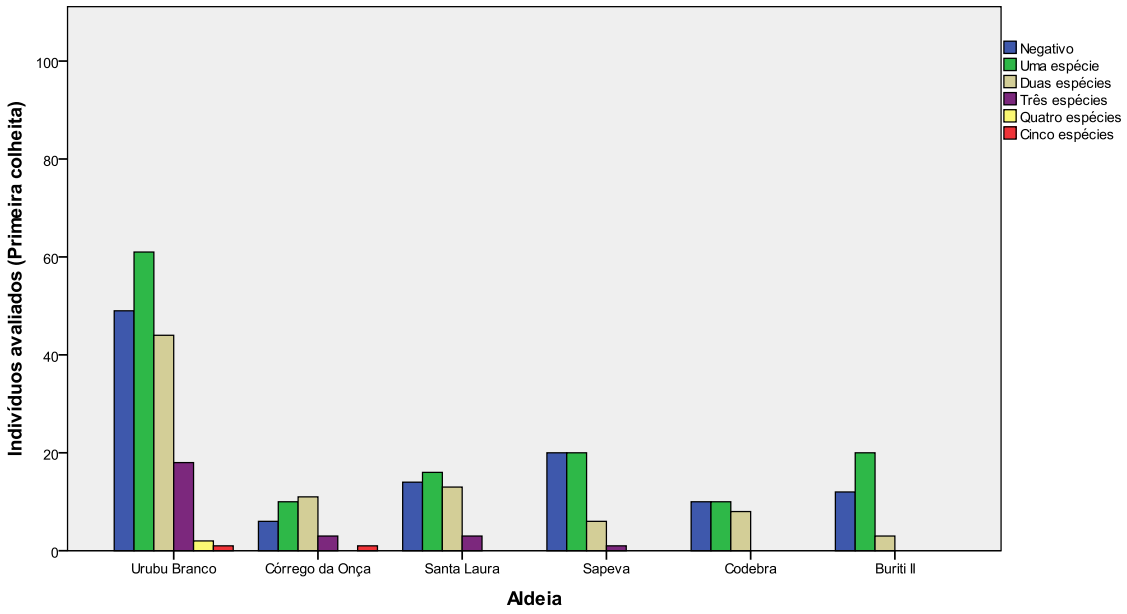
	Nº de Espécies (%)						
Aldeia	**N (%)**	**1 (%)**	**2 (%)**	**3 (%)**	**4 (%)**	**5 (%)**	**Total (%)**
Urubu Branco	255 (34,3)	299 (40,2)	141 (19)	43 (5,8)	5 (0,7)	1 (0,1)	744 (100)
Córrego da Onça	47 (26,7)	69 (39,2)	39 (22,2)	17 (9,7)	3 (1,7)	1 (0,6)	176 (100)
Sapeva	85 (51,5)	61 (37)	17 (10,3)	2 (1,2)	0 (0)	0 (0)	165 (100)
Codebra	58 (36,7)	71 (44,9)	25 (15,2)	4 (2,5)	1 (0,6)	0 (0)	159 (100)
Santa Laura	59 (39,7)	58 (37,7)	27 (17,9)	7 (4,6)	0 (0)	0 (0)	151 (100)
Buriti II	54 (41,2)	54 (41,2)	19 (14,5)	4 (3,1)	0 (0)	0 (0)	131 (100)
Total	**558 (36,6)**	**612 (40,1)**	**268 (17,6)**	**77 (5)**	**9 (0,6)**	**2 (0,1)**	**1526 (100)**

N = Negativos
FONTE: Malheiros (2011)

Nas figuras 22 a 25 estão dispostas a quantidade de parasitas intestinais patogênicos por coleta.

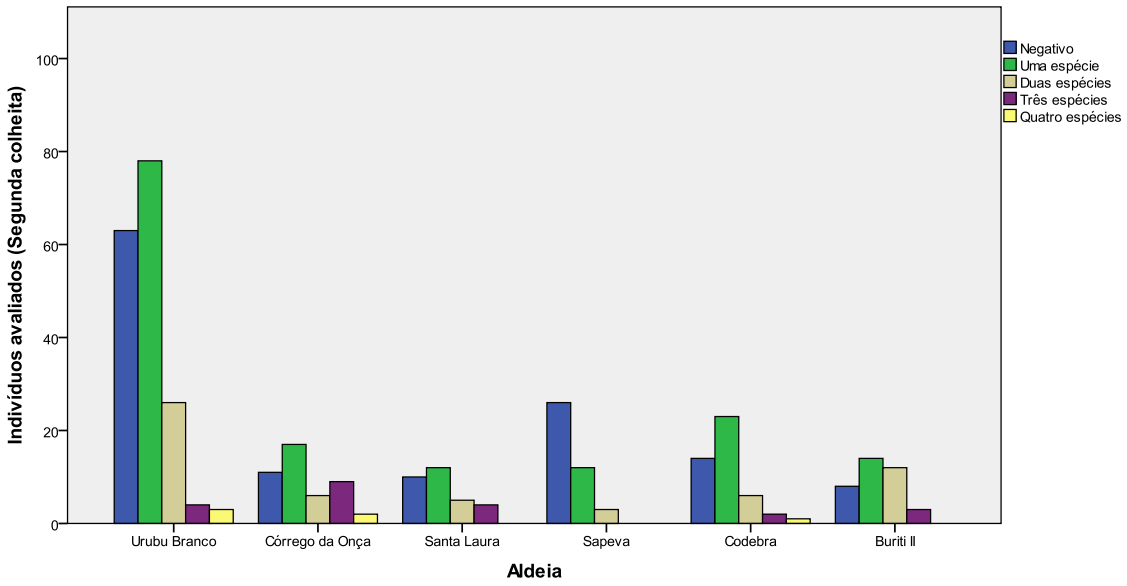
Da 1ª para a 2ª coleta verifica-se aumento no número de amostras que apresentaram uma única espécie.

Figura 22 – Distribuição da quantidade de parasitas intestinais na primeira coleta em todas as aldeias



FONTE: Malheiros (2011)

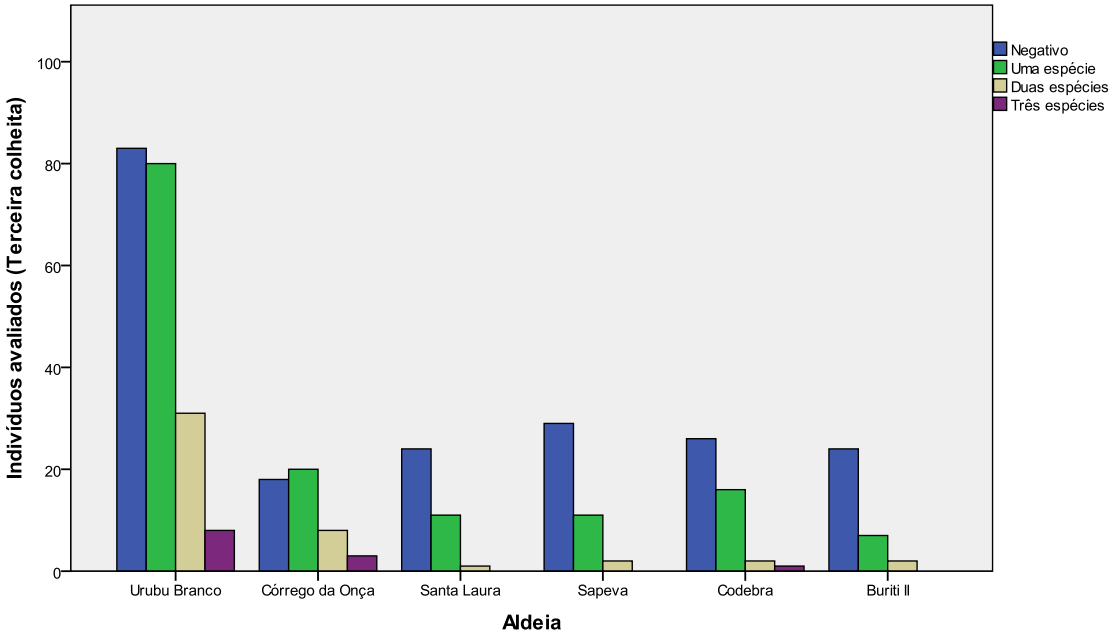
Figura 23 - Distribuição da quantidade de parasitas intestinais na segunda coleta em todas as aldeias



FONTE: Malheiros (2011).

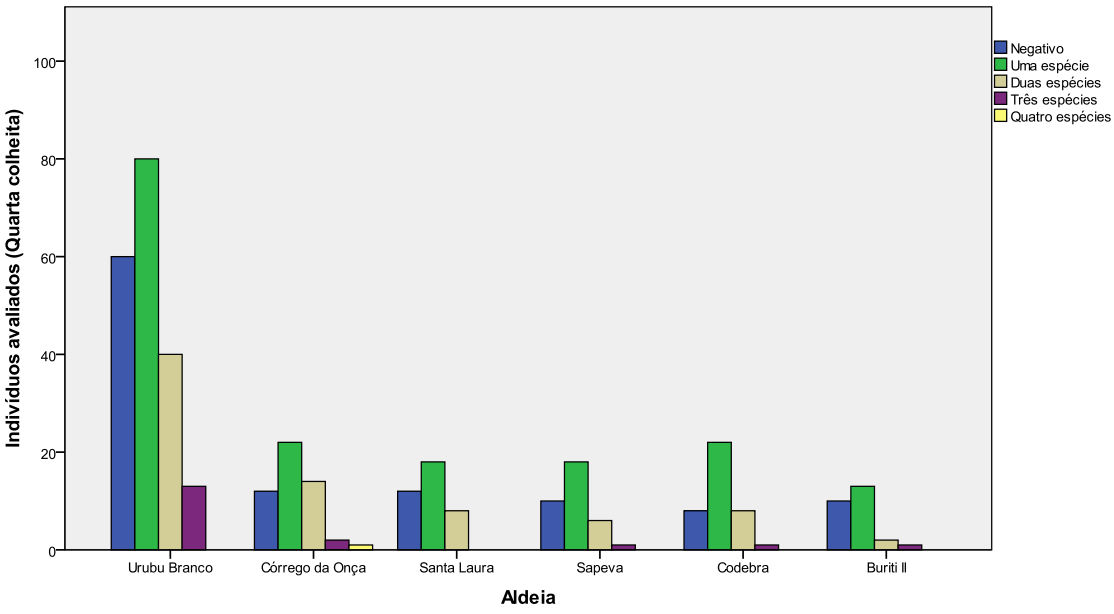
Da 2ª para a 3ª coleta o número de casos negativos foi superior em cinco das seis aldeias pesquisadas. Já da 3ª para a 4ª coleta casos com uma espécie foram superiores em todas as aldeias e, aumentou o número de amostras positivas que apresentaram duas espécies.

Figura 24 - Distribuição da quantidade de parasitas intestinais na terceira coleta em todas as aldeias



FONTE: Malheiros (2011)

Figura 25 - Distribuição da quantidade de parasitas intestinais na quarta coleta em todas as aldeias

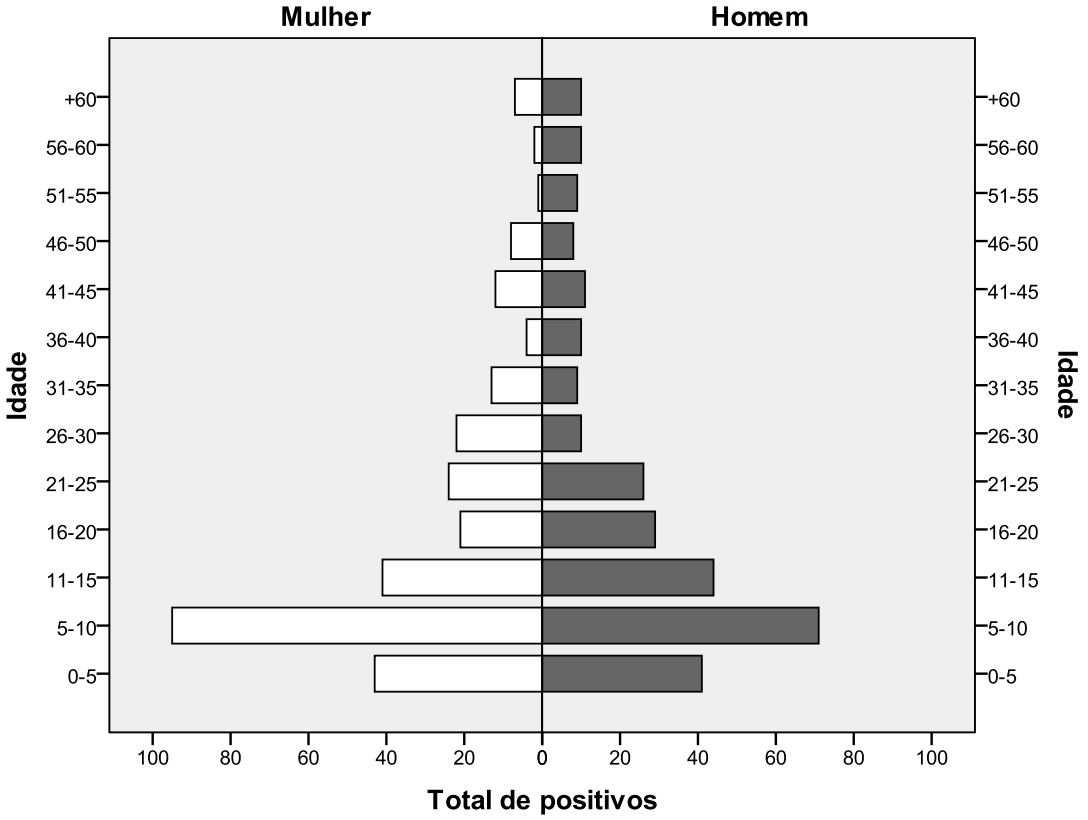


FONTE: Malheiros (2011)

Dados demográficos foram testados, contudo foram selecionados apenas *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* e *Giardia intestinalis* que representaram os enteroparasitas patogênicos diagnosticados neste estudo.

A figura 26 apresenta a distribuição de *E. histolytica/E. dispar* por sexo e idade. Não houve diferença na ocorrência desses parasitas entre os dados demográficos analisados (p>0,05).

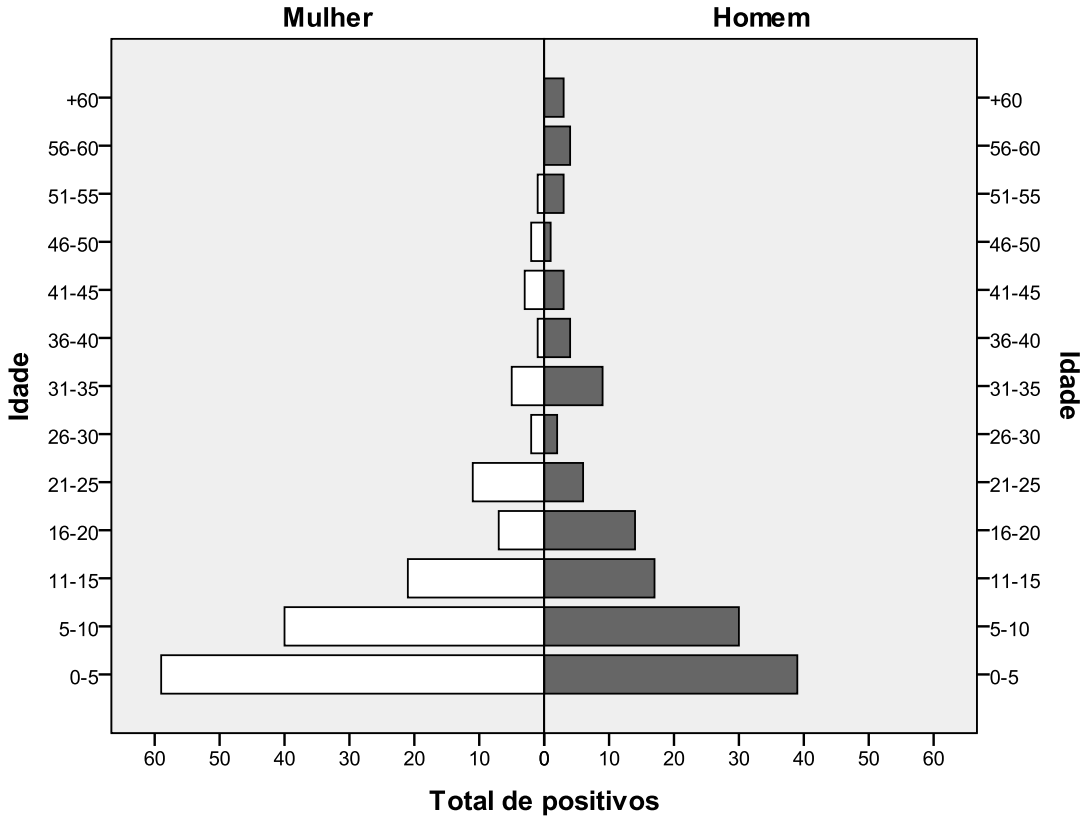
Figura 26 – Distribuição por sexo e idade das amostras positivas para *E. histolytica/dispar* nas quatro coletas realizadas entre os Tapirapé



FONTE: Malheiros (2011)

Para *Giardia intestinalis* a pirâmide etária (figura 27) mostra que não houve diferença de prevalência entre homens e mulheres (p=0,798). Porém, entre as prevalências por faixa etária, os indivíduos entre 0 e 15 anos apresentaram maior positividade do que os indivíduos mais velhos (p<0,05).

Figura 27 - Distribuição por sexo e idade das amostras positivas para *Giardia intestinalis* nas quatro coletas realizadas entre os Tapirapé



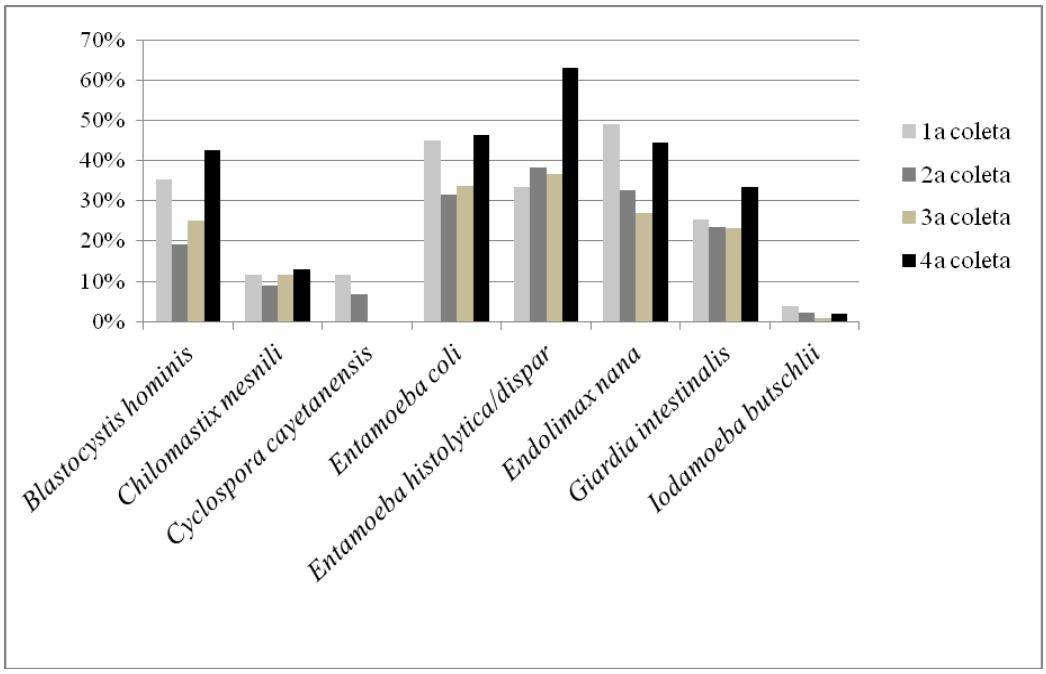
FONTE: Malheiros (2011)

A comparação entre os métodos de diagnósticos (técnicas de Hoffman e Ritchie) foram analisadas pelo teste de concordância (Kappa). Para o protozoário *E. histolytica/E. dispar* e *G. intestinalis* o teste Kappa foi de 0,86 ($p<0,05$) e 0,91 ($p<0,05$), respectivamente, considerados o valor de um nível de concordância bom. O valor Para o teste também foi considerado bom com Kappa = 0,91 ($p<0,05$).

Além dessas duas técnicas microscópicas, *G. intestinalis* também foi analisado por meio da técnica de Sheather modificado (sacarose). O teste Kappa indicou um valor de 0,73 ($p<0,05$) na comparação com a técnica de Hoffman e de Ritchie.

Neste estudo foi analisado também a presença de protozoário intestinal com diarréia (figura 28). Percebe-se que houve um aumento no número de amostras diarréicas das três primeiras coletas em relação a última.

Figura 28 – Protozoários intestinais diagnosticados em fezes diarréicas nas quatro coletas

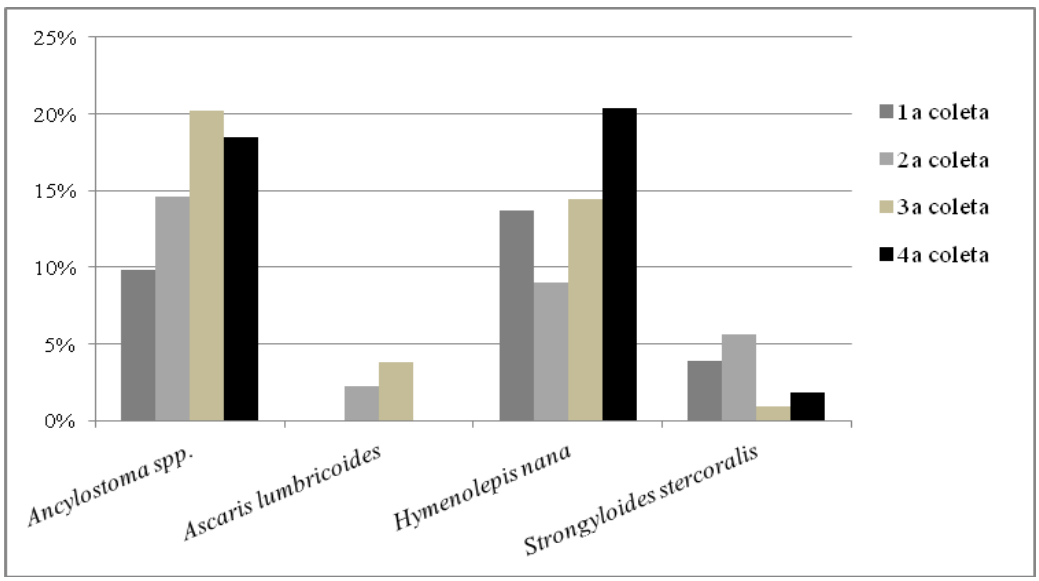


FONTE: Malheiros (2011)

Nas amostras positivas para helmintos os dados mostram que *Ancylostoma* spp. e *Hymenolepis nana* foram os parasitas que apresentaram maior prevalência em amostras fecais diarréicas (figura 29).

De todos os parasitas intestinais analisados apenas *Hymenolepis nana* apresentou associação (p<0,001) com fezes diarréicas.

Figura 29 – Helmintos diagnosticados em fezes diarréicas nas quatro coletas



FONTE: Malheiros (2011)

4.2 Teste imunocromatográfico

As amostras fecais em todas as coletas foram analisadas com kit comercial para verificar a presença de Rotavírus e Adenovírus nas fezes. Na 3ª e 4ª coletas as amostras foram testadas por esta metodologia para diagnosticar oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes por meio de kit comercial.

4.2.1 Rotavírus e Adenovírus

Durante as quatro coletas nenhuma das amostras foi diagnosticada como positiva para Rotavírus e Adenovírus.

4.2.2 *Cryptosporidium* spp.

Nas 1ª. e 2ª. coletas não foi diagnosticada nenhuma amostra positiva para *Cryptosporidium,* utilizando o método de coloração de Kinyoun a frio. O mesmo ocorreu com as amostras da 3ª. e 4ª. coletas, com as quais utilizou-se o teste imunocromatográfico.

4.2 Ensaio Imunoenzimático – ELISA

4.3.1 *Entamoeba histolytica/E. dispar*

Das 60 amostras analisadas por meio do ELISA, apenas quatro foram positivas e uma diagnosticada como indeterminada na pesquisa de antígeno de *E. histolytica*/*E. dispar*.

As amostras positivas no ELISA foram negativas no exame microscópico de fezes.

4.4. Diagnóstico Molecular

4.4.1 *Giardia intestinalis*

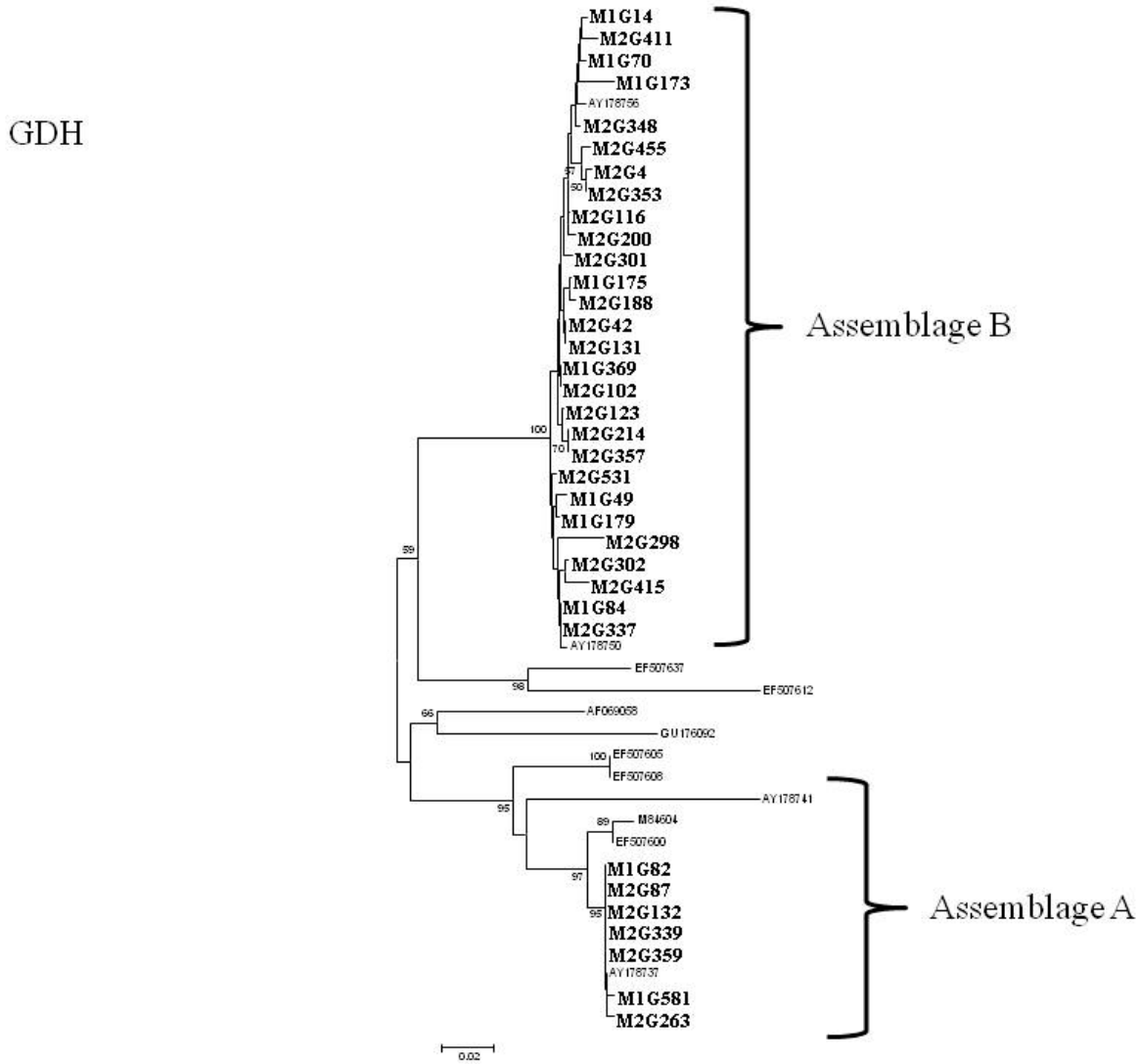
A extração de DNA foi realizada nas 102 amostras diagnosticadas positivamente para *Giardia intestinalis* na técnica de Sheather modificado (sacarose).

4.4.1.1 Glutamato Desidrogenase – *gdh*

Das 102 amostras analisadas, 42 foram positivas na PCR por meio do gene *gdh*. Deste total, 35 amostras foram seqüenciadas, sendo 28 pertencentes ao assemblage A e sete caracterizados molecularmente como assemblage B, quando foram comparadas com sequências depositadas no GenBank (2010), como mostra a árvore filogenética (figura 30).

Não foi encontrada nenhuma associação entre os assemblages e as variáveis sexo, idade e diarréia.

Figura 30 – Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene *gdh* provenientes de isolados de *Giardia intestinalis*



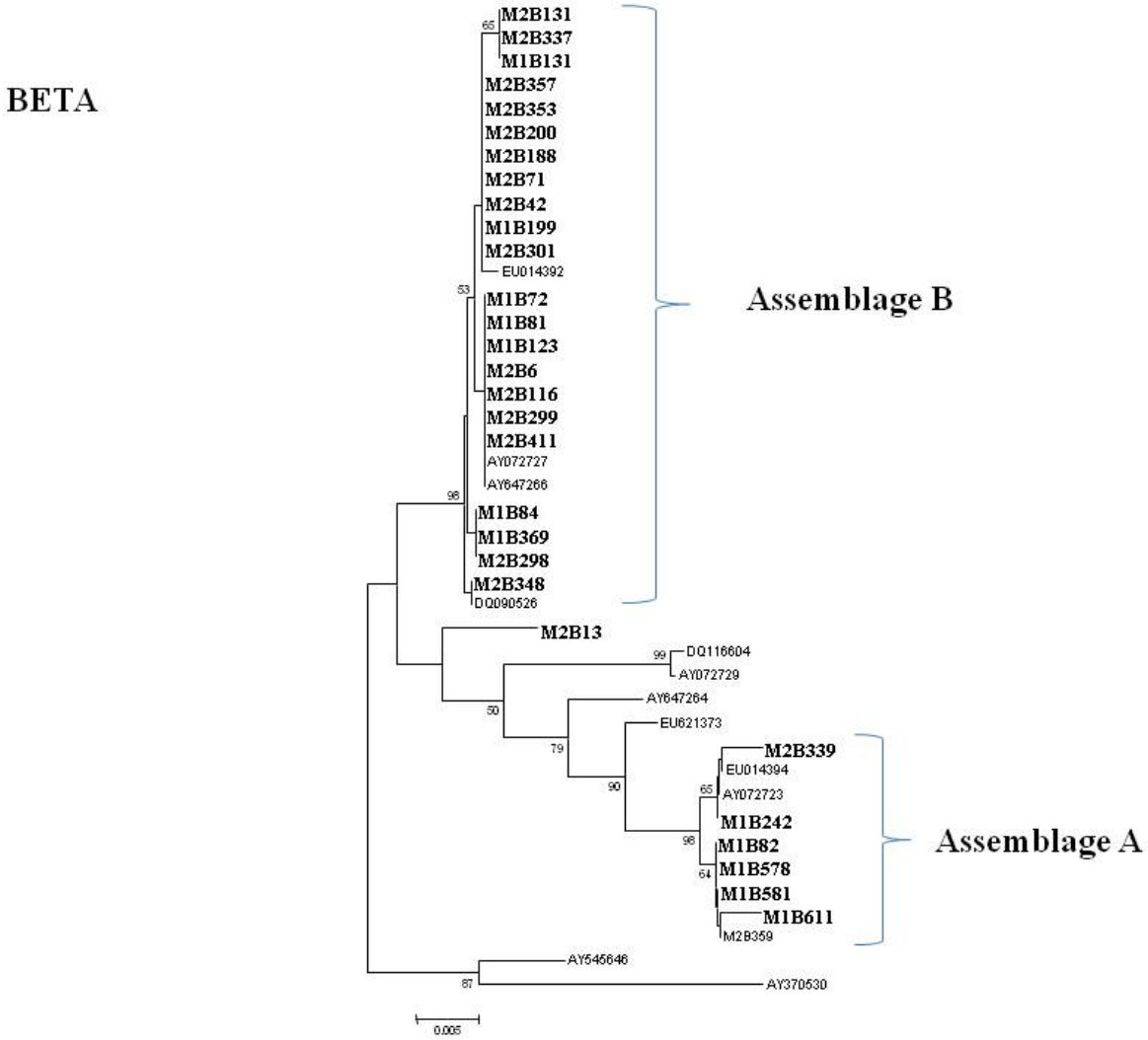
Com base no alinhamento 1001 a 1372 (Número acesso GenBank M84604). Reconstrução inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, considerando bootstrap >50%. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 5.
FONTE: Malheiros (2011)

4.4.1.2 β-Giardina - *bg*

Do total de 102 amostras pela técnica de Sheather, 45 amostras foram amplificadas por meio do gene *bg* e, 30 foram seqüenciadas, sendo 23 pertencentes ao assemblage B e sete identificados como assemblage A, após comparação com sequencias depositadas no GenBank (2010), de acordo com a árvore filogenética (figura 31).

Houve associação entre os resultados de PCR *gdh* e gênero, apontando o sexo masculino como o mais prevalente (p=0,037). Porém, não houve associação estatística entre as *assamblages* oriundas do *gdh* e as variáveis sexo, idade e diarréia.

Figura 31 – Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene β-*giardina* provenientes de isolados de *Giardia intestinalis*



Com base no alinhamento 250 a 606 (Número acesso GenBank EU014394). Reconstrução inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, considerando bootstrap >50%. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 5.
FONTE: Malheiros (2011)

4.4.2 *Blastocystis* spp.

Das 382 amostras fecais analisadas microscopicamente durante a 4ª coleta nas seis aldeias Tapirapé, 80 indivíduos (21%) foram positivos para *Blastocystis* spp. e, destes 66 foram confirmados pela PCR.

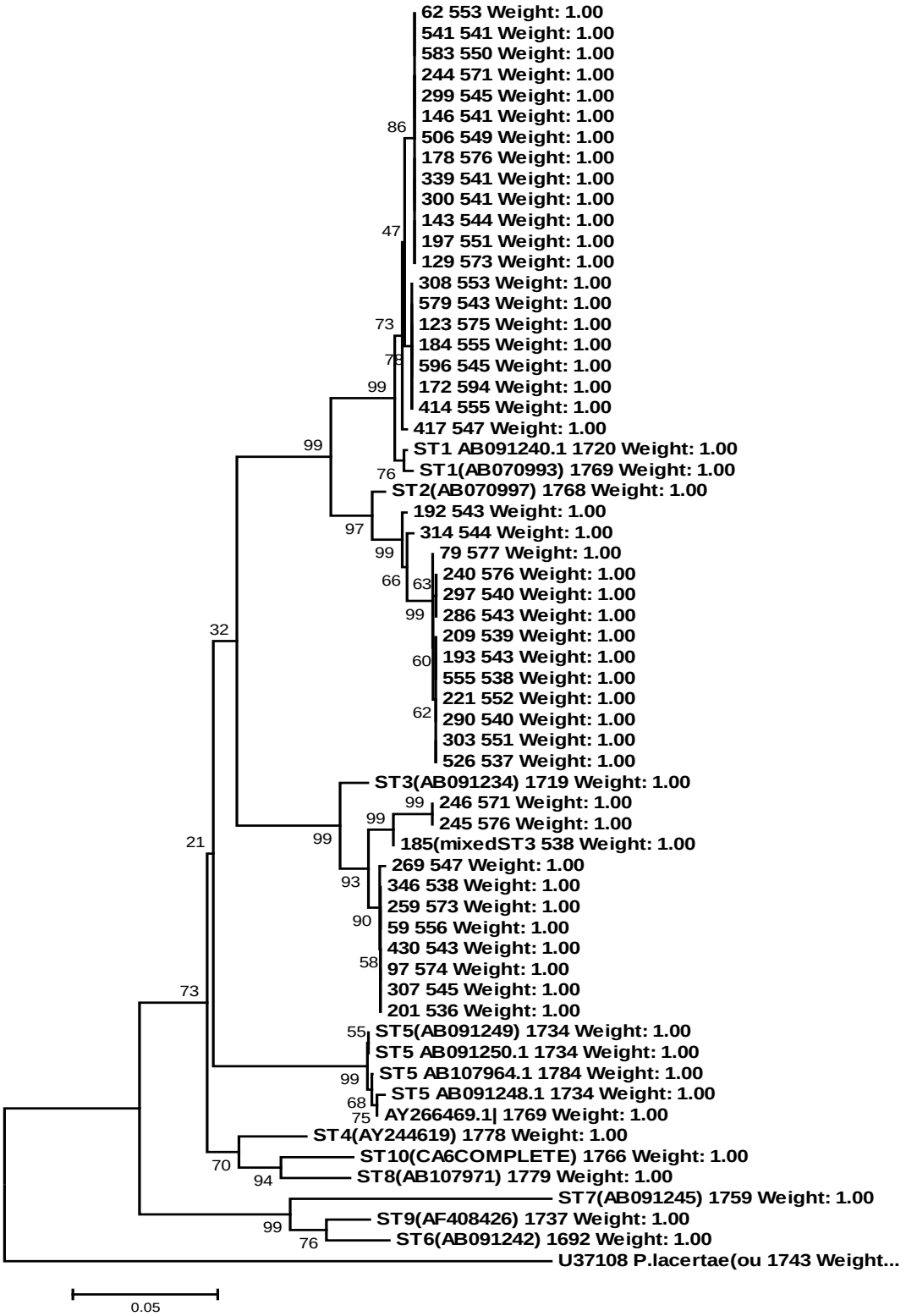
Todas as 66 amostras foram seqüenciadas, sendo 27 pertencentes ao subtipo (ST) 1, seguido de 21 pertencentes aos ST2 e 11 ao ST3, quando foram comparadas com sequências depositadas no GenBank (2010), como mostra a árvore filogenética (figura 32).

A partir da análise filogenética observou-se o diagnóstico de sete mix de subtipos, sendo cinco entre o ST1 e ST2, um entre o ST1 e ST3 e um entre ST2 e ST3.

Nas amostras positivas para *Blastocytis* spp verificamos concomitantemente a presença de outros parasitas, como *Ancylostoma* spp., *Ascaris lumbricoides*, *Chilomastix mesnili*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Endolimax nana*, *Giardia intestinalis*, *Hymenolepis nana*, *Iodamoeba butschlii*, *Strongyloides stercoralis* e *Trichuris trichiura*. No entanto, apenas *Ancylostoma* spp. ($p<0,003$), *Ascaris lumbricoides* ($p<0,05$), *E. coli* ($p<0,04$), e *E. histolytica/E. dispar* ($p<0,03$) apresentaram associação com a presença de *Blastocystis* spp.

Demais informações acerca do estudo sobre *Blastocystis* spp. encontram-se no anexo E.

Figura 32 – Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene SSU-rRNA provenientes de isolados de *Blastocystis* spp.



Com base na seqüência completa (Número acesso GenBank AY244619). Reconstrução inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, considerando bootstrap >50%. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 5.

FONTE: Malheiros (2011)

5 DISCUSSÃO

5.4 Pesquisa coproparasitológica

A alta prevalência de parasitose intestinal diagnosticada neste trabalho (83,35%) corrobora com a maioria dos estudos realizados na Amazônia brasileira, como os de Hinke (2009) na população ribeirinha do baixo rio Machado em Rondônia, no qual a positividade foi de 86,6% numa população de 268 habitantes da região.

Além das populações ribeirinhas os dados deste estudo também confirmam a alta prevalência entre indígenas habitantes da região Amazônica brasileira. No Alto rio Negro houve 100% de positividade entre 49 índios da etnia Nadëb-Maku habitantes dessa região do Amazonas (GENARO; FERRARONI, 1984), seguido por 81,7% de prevalência entre 93 índios da aldeia Tembé no Pará (MIRANDA et al., 1999) e de 70,7% de positividade entre os 519 indígenas da etnia Suruí moradores da reserva Sete de Setembro em Rondônia (PALHANO-SILVA et al., 2009).

Apesar das 1526 amostras fecais examinadas durante as quatro coletas, verificamos que 574 índios Tapirapé participaram pelo menos uma vez das quatro coletas, número este superior aos de outros estudos realizados com os 333 índios Terena do Mato Grosso do Sul (AGUIAR et al., 2007), com os 313 indígenas da etnia Hüpda no Amazonas (BÓIA et al., 2009) e com os 447 índios Kaingáng do Paraná (TOLEDO et al., 2009).

Vale ressaltar que em todos os trabalhos acima, mesmo sendo índios habitantes de regiões e/ou biomas distintos brasileiros, a prevalência de parasitas intestinais foi acima dos 73%. Tal feito aponta uma similaridade entre as populações no que tange as questões básicas de saúde, desde a carência de acesso aos serviços de saúde, condições precárias de sobrevida, infra-estrutura de saneamento, água tratada e peculiares hábitos de vida.

Não obstante, essa realidade também é observada entre outros índios sul-americanos habitantes de países como a Venezuela, onde a população de aproximadamente 314.000 indígenas vive em más condições de vida contribuindo para a alta prevalência de enteroparasitas, confirmada em cinco etnias do país, com frequencias variando de 60% a 92% nessas populações (DEVERA; BLANCO; CABELLO, 2005; DÍAZ et al., 2006; VELASCO et al., 2011). Na Bolívia estudo realizado entre os índios da etnia Quechua registrou que 100% da população estudada encontrava-se acometida por algum enteroparasita (BASSET;

GAUMERAIS; BASSET-POUGNET, 1986). Entre os indígenas da Amazônia peruana a prevalência também é bastante elevada, como mostra a pesquisa de Zevallos et al. (2010) que observaram ocorrência de helmintos intestinais de 98%. A alta frequência também foi verificada entre os índios da etnia Cashibo, também no bioma amazônico do país, nos quais 92% da comunidade estavam infectados por algum parasita intestinal (BOURÉE et al., 1984).

Na Argentina, seis etnias de origem Mbyá-Guaraní habitantes da Província de Misiones, apresentaram prevalência de parasitas gastrointestinais superior a 82% (NAVONE et al., 2006; ZONTA; OYHENART; NAVONE, 2010) e, entre uma etnia indígena da província de Salta, Argentina, a prevalência de parasitoses intestinais chegou a 95% (MENGHI et al., 2007). Curiosamente, os dados apresentados acima são bastante similares aos achados entre os Tapirapé, mesmo não sendo na mesma eco-região, reforçando mais uma vez que as enteroparasitoses são importantes problemas para a saúde de comunidades indígenas sul-americanas. Já no México, os indígenas habitantes das regiões de Jalisco e Chiapas, apresentaram um índice de prevalência abaixo dos estudos com os indígenas sul-americanos, com freqüência média 60% de positividade (GALVÁN-RAMIREZ; MADRIZ-ELISANDRA; BERNAL-REDONDO, 2007; MORALEZ-ESPINOZA et al., 2003).

Desde o primeiro trabalho envolvendo parasitas intestinais em comunidades indígenas brasileiras, mas especificamente na etnia Xavante do Mato Grosso realizado por Neel et al. (1968), alta prevalência de *E. histolytica* (48,3%) e *Ancylostoma* spp. (96,7%) foram observados na população indígena brasileira.

Neste estudo *E. coli, E. nana, E. histolytica/E. dispar* e *G. intestinalis* foram os protozoários intestinais mais prevalentes entre os Tapirapé, resultados que corroboram com todos os estudos realizados com outras etnias indígenas do Mato Grosso, como os Zoró, Iaulapiti, Xavante, Pavuru, Moygu, Tuiararé, Diauarum, Capivara e Ngojwere (COIMBRA JÚNIOR; SANTOS, 1991, ESCOBAR-PARDO et al., 2010; FERREIRA et al., 1991; LANELLI; SILVA; AGOSTINI, 1995; SANTOS et al., 1995).

A ausência de oocistos de *Ciclospora cayetanensis*, *Sarcocystis* spp. e *Isospora belli* nas três últimas coletas pode ter ocorrido devido a eliminação desses parasitas durante a primeira medicação.

Este resultado difere dos achados de Devera, Blanco e Cabello (2005), que também utilizaram a mesma técnica diagnóstica em amostras de índios Mapuera, do

Pará. Nesse estudo obtiveram 11,9% de prevalência para *Ciclospora cayetanensis* e 0,6% para *Isospora belli*. Borges et al. (2009) também obteve êxito nas análises coproparasitológicas, com 10,8% de positividade para *Ciclospora cayetanensis* entre os índios Mapuera no Pará por meio da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen.

Em relação aos helmintos destaca-se neste trabalho a maior prevalência de *Ancylostoma* spp. entre os habitantes Tapirapé.; fato este que se repete aos estudos de Borges et al. (2009), exceto com a pesquisa realizada com seis etnias do Parque Indígena do Xingu (ESCOBAR-PARDO et al., 2010), no qual *Hymenolepis nana* o helminto foi o mais freqüente nas amostras fecais de 304 índios da região. Nos Tapirapé este parasita foi o segundo mais frequente.

A baixa prevalência de *Ascaris lumbricoides* entre os Tapirapé corroborou com os estudos envolvendo outros indígenas da Amazônia brasileira (BÓIA et al., 2009; MIRANDA et al., 1998; MIRANDA et al., 1999). Em contrapartida, os índios que habitam a Caatinga e a Mata Atlântica apresentaram alta prevalência para o nematóide (MOURA et al., 2010; SCOLARI et al., 2000; TOLEDO et al., 2009). Fatos estes que podem estar relacionado a distância das comunidades indígenas amazônicas das áreas urbanas, dimunuindo assim a ocorrência desse parasita.

O helminto *Enterobius vermicularis* não foi diagnosticado pela simples razão da não utilização da pesquisa de ovos na região perianal e anal (*Swab)* nas quatro coletas nas aldeias, ou pela ausência do parasita entre as crianças Tapirapé.

Taenia spp. foi observada em apenas dois indígenas durante as duas primeiras coletas, que em seguida foram tratados com medicamentos específicos para o platelminto, não sendo mais diagnosticado nas duas últimas coletas. Todavia, a presença, mesmo que mínima do parasita serve de alerta para os cuidados com a alimentação, pois há Tapirapé que criam alguns poucos porcos nas aldeias.

O teste de Kappa utilizado neste trabalho demonstrou que as técnicas coproparasitológicas de Hoffman e Ritchie, utilizadas nos exames das amostras, tiveram uma boa concordância para a detecção de cistos e ovos dos enteroparasitas.

O teste de Sheather utilizado para confirmar a presença de cistos de *Giardia intestinalis* também obteve uma boa concordância, demonstrando a eficácia dos três métodos testados neste trabalho.

Com a alta prevalência observada desde a primeira coleta, todos os índios participantes dos exames coproparasitológicos receberam medicação no final de

cada etapa, porém, a prevalência se mantinha elevada nas coletas subseqüentes. Sendo assim, uma experiência foi realizada durante a quarta coleta, com o intuito de verificar se havia resistência parasitológica frente aos medicamentos administrados. Para tanto, 21 indivíduos que apresentaram ao menos uma espécie de parasita, foram selecionados para a realização de uma nova coleta após 10 dias da medicação. Do total, metade (11/21) apresentou resultado negativo, dois indígenas apresentaram as mesmas espécies de parasitas observadas anteriormente e, em oito índios foram diagnosticados outros parasitas intestinais diferentes dos observados no primeiro exame. Diante disso, verificou-se que os medicamentos estavam sendo eficazes no combate temporário aos parasitas, porém, o controle dos mesmos, por medicamentos, não foi suficiente no combate ou diminuição da prevalência.

Portanto, verifica-se que a re-infecção, é ainda a maior causa de contaminação entre os Tapirapé, fato este observado também entre outros indígenas da Amazônia (BÓIA et al., 2006; MIRANDA; XAVIER; MENEZES, 1998).

A re-infecção enteroparasitária é um problema que assola a comunidade Tapirapé, graças a fatores intrínsecos como hábitos e comportamento de vida, ausência de educação profilática e, a fatores extrínsecos como a falta de água tratada, saneamento básico e melhor assistência à saúde indígena.

É notório que a manifestação parasitária pode estar acompanhada pelos quadros assintomáticos ou sintomáticos dificultando possíveis intervenções quanto a melhoria da saúde da população.

Entre os Tapirapé alguns sintomas de natureza gastrointestinal, como dor abdominal e diarréia constatada na comunidade, não tiveram influência na prevalência das parasitoses intestinais, exceto na ocorrência de *Hymenolepis nana* que apresentou associação ($p<0,001$) com presença de diarréia.

Quanto ao aspecto fecal observou-se que não houve associação estatística ($p>0,05$), uma vez que mais de 90% das amostras analisadas foram diagnosticadas como normal.

5.2 Teste imunocromatográfico

Rotavírus não foi diagnosticado durante as quatro coletas entre os Tapirapé, resultado este que corrobora com o estudo realizado com os índios das etnias

Guazábaras, Quinaroes e Quinanoques na Venezuela (VELASCO et al., 2011). Os resultados deste estudo podem estar relacionados a campanha de vacinação empregada pela FUNASA, imunizando todas os menores de cinco anos de idade, indicando eficácia desse método no controle desse vírus.

Outra possível razão para o não dignóstico desses vírus nas amostras fecais diarréicas e não-diarréicas dos Tapirapé foi o emprego de apenas uma técnica, o que pode ter comprometido na eficácia dos resultados. O ELISA, teste imunoenzimático não utilizado para detecção de rotavírus e adenovírus, é um teste bastante usado no diagnóstico de vírus cuasadores de diarréia (MAGALHÃES et al., 2007; ORLANDI et al., 2006).

Oocistos de *Cryptosporidium* também não foram encontrados nas amostras fecais diarréicas e não-diarréicas dos Tapirapé, por meio de nenhuma das técnicas coproparasitológicas - Hoffman, Ritchie e Sheather - apesar das duas primeiras não serem eficazes para o parasita, nem pela técnica de coloração de Kinyoun modificada, assim como não foram diagnosticados pelo teste imunocromatográfico.

Este resultado pode estar relacionado ao fato de que quadros diarréicos, comumente associados a presença de *Cryptosporidium*, também estão associados a ocorrência de outros parasitas como *G. intestinalis, E. histolytica, Blastocystis* spp e *Ancylostoma* spp. e, estes enteroparasitas foram diagnosticados entre os Tapirapé.

Outro fato que merece destaque em relação a ausência do coccídio é a possibilidade de que os Tapirapé não estarem expostos a presença de *Cryptosporidium*, dado também observado entre os índios da etnia Yukpa na Venezuela (DÍAZ et al., 2006).

5.3 Ensaio imunoenzimático

A técnica utilizada para diferenciação de *E. histolytica* de *E. dispar* foi eficaz em apenas quatro amostras, sendo estas negativas nos exames coproparasitológicos, o que nos faz acreditar que o dicromato de potássio 2,5% não é recomendado para a conservação de cistos de *Entamoeba,* podendo ocasionar lise da membrana do parasita dificultando o diagnóstico imunológico.

Além da possível interferência do conservante, outro fator preponderante nos resultados negativos é o número reduzido de amostras analisadas nesta técnica. Portanto, se faz necessário em pesquisa futura aumentar a quantidade de amostras

tanto positivas quanto negativas para o protozoário no sentido de verificar a eficácia do teste de ELISA comumente utilizado em outros trabalhos (SILVA et al., 2005).

PCR também é uma ferramenta que deve ser utilizada para distinguir *E. histolytica* de *E. dispar*, uma vez que já demonstrou eficácia em trabalhos aqui no Brasil (SANTOS et al., 2010; SANTOS, GONÇALVES; SOARES, 2011; VIANNA et al., 2009).

5.4 Caracterização molecular

5.4.1 *Giardia intestinalis*

Este é o primeiro estudo acerca da caracterização molecular de *Giardia intestinalis* envolvendo comunidades indígenas brasileiras, no qual destacou prevalência do parasita superior entre os Tapirapé da faixa etária abaixo dos 15 anos de idade do que nos adultos, destacando que o protozoário se manifesta principalmente até a fase infantil, diminuindo sua prevalência entre os mais velhos.

No presente estudo associação estatística foi observada apenas nos resultados de PCR para *gdh*, porém nenhuma associação foi verificada entre as *assemblages A* e *B* oriundas dos genes *bg* e *gdh* e as variáveis como sexo, e quadro diarréico.

Em relação aos assemblages para *gdh* 83% (35/42) pertencem a *assemblage A* contra apenas 17% (7/42) pertencente a *assemblage B* quando comparadas com sequências depositadas no GenBank (2010).

Dentre essas sequências verificamos que as *assemblage A* diagnosticadas nas fezes dos indígenas foram similares as amostras de seres humanos de regiões geográficas completamente distintas, a exemplo do trabalho realizado na Austrália e nos Estados Unidos, ambos utilizados como sequências comparativas (EY; DARBY, 2002; YEE; DENNIS,1992).

A *assemblage A* para este gene foi também similar aos achados observados em amostras fecais de gato no Brasil (SOUZA et al., 2007).

Em relação aos resultados quanto as *assemblages B* diagnosticadas neste estudo, observamos que os mesmos foram similares aos achado em fezes humanas orindas do México, bem como em fezes de cães provenientes do Canadá (EY; DARBY, 2002).

Para o gene *bg* o assemblage A também foi superior ao assemblage B*,* com 76,7% (23/35) e 23,7% (7/35), respectivamente. Aparentemente, o assemblage A ocorre com maior freqüência do que o assemblage B, porém, fortes relações não podem ser assinaladas (CACCIÒ; RYAN, 2008). No Brasil, mas precisamente em São Paulo, o assemblage B foi identificado em apenas oito amostras fecais humanas (SOUZA et al., 2007) e, no Rio de Janeiro este agrupamento não foi encontrado em nenhuma das 62 amostras caracterizadas (VOLOTÃO et al., 2007).

O assemblage A do gene *bg* foram também observadas em peixes da Austrália (YANG et al., 2010), em seres humanos na Itália (CACCIÓ; DE GIACOMO; POZIO, 2002) e da Austrália (CACCIÓ; DE GIACOMO; POZIO, 2002) e, em bovinos na Itália (LALLE et al., 2005).

Diante do exposto, verificamos que os resultados deste estudo para os genes *gdh* e *bg* corroboram com os demais estudos, nos quais confirmam o potencial zoonótico dos assemblages A e B, mesmo em localizações geográficas distintas. (FENG; XIAO, 2011), sendo, portanto, os animais das seis aldeias, prováveis fontes de infecção para *Giardia intestinalis,* principalmente os cães nos quais há uma abundância deles na comunidade Tapirapé.

As subdivisões intra assemblage A e B não foram realizadas por meio da análise a partir de SNPs nestes agrupamentos. Embora alguns autores dividam o assemblage A em três grupos AI, AII e AII (FENG; XIAO, 2011) e o assemblage B em dois grupos, BIII e BIV (MONIS et al., 1999; MONIS; THOMPSON, 2003; THOMPSON, 2004).

As seqüências de nucleotídeos revelaram um elevado nível de similaridade como as descritas em estudos anteriores e, nenhum novo genótipo foi encontrado. Estes resultados sugerem que parasitas dos genótipos zoonóticos são importantes na epidemiologia da giardíase entre os Tapirapé.

5.4.2 *Blastocystis* spp.

Ao contrário de quase todos os estudos realizados pelo mundo, nos quais apontam o subtipo 3 como o mais comum entre os seres humanos, entre os Tapirapé o subtipo 1 foi mais prevalente (41%), seguido pelo ST2 (32%) e ST3 (17%), corroborando com os estudos realizados na maioria dos países asiáticos (LEELAYOOVA et al., 2008; TAN et al., 2008; YOSHIKAWA et al., 2009).

Nossos resultados também corroboram com estudos realizados em outros países tropicais em desenvolvimento. Em escolares tailandeses 77,9% estavam infectados com o ST1 e ST2 com 22,1% (LEELAYOOVA et al., 2008). Nem sempre tratamento de água elimina cistos de *Blastocystis* spp., caso este observado nas Filipinas no qual foi diagnosticado o parasita em 23% da água usada na irrigação de plantas (BANATICLA; RIVERA, 2011), sendo o ST1 mais prevalente nas amostras de água.

Fato este preocupante quando se comparado ao estudo com os Tapirapé, uma vez que não há água tratada na comunidade indígena, e levanta a questão de saber se alguns subtipos são mais resistentes à água.

O resultado da análise filogenética de *Blastocystis* spp. diagnosticados entre os Tapirapé, pode estar ligado à origem étnica da população infectada, porque há pouco contato entre o grupo indígena com os moradores da região circunzinha. Somado a isso, a etnia Tapirapé tem comportamento e hábitos peculiares, como um grande número de pessoas na mesma casa, saneamento precário e casamento apenas entre a mesma etnia.

Vale ressaltar que este é o segundo trabalho publicado com amostras humanas provenientes da América do Sul, sendo que o primeiro foi publicado recentemente por pesquisadores americanos e espanhóis, no qual utilizaram amostras da Espanha, Estados Unidos e de 12 isolados oriundos da Colômbia (SANTÍN et al., 2011) e, diagnosticaram o ST1 e ST2 como os mais ocorrentes no estudo. O terceiro trabalho realizado na América Latina, ainda mais recentemente (JIMENEZ-GONZALEZ et al., 2011), no qual utilizaram amostras fecais humanas provenientes do México, diagnosticou que o ST1 foi o mais freqüente, demonstrando que este foi o subtipo mais comum nos três estudos latino-americanos, sendo necessário, então, demais estudos que contemplem o quadro real dos subtipos circulantes na América Latina.

O ST4, que foi observado nos estudos da Europa, América do Norte e, em algumas regiões da Ásia, não foi detectada nas amostras Tapirapé. Aliás, ST4 não foi relatado também num estudo que envolveu amostras colombianas (SANTIN et al., 2011). Isto nos mostra a importância de ampliar as áreas de coleta no país, com vistas a buscar respostas quanto à epidemiologia de *Blastocystis* spp. na América do Sul.

Mais dados de outros grupos étnicos no Brasil que vivem em diferentes biomas são necessários para investigar se o domínio do ST1 é um fenômeno regional ou está ligada a populações com antecedentes étnicos.

Compreender a prevalência e estrutura genética de parasitas intestinais, tais como *Blastocystis* spp., em áreas endêmicas pode contribuir para uma melhor compreensão dos fatores de risco para a infecção envolvido em diferentes situações ecológicas. Estudos como este chamam a atenção para as dificuldades que as pessoas que vivem em áreas remotas, como a Amazônia, face ao lidar com os problemas mais simples de saúde devido à falta de infra-estruturas adequadas de diagnóstico e tratamento.

Demais informações acerca do estudo sobre *Blastocystis* spp. encontram-se no anexo E.

5.5 Fatores eco-epidemiológicos

Os fatores ambientais interferem na prevalência dos parasitas intestinais aos seres humanos (Chieff, 2002), e a influência da sazonalidade foi observada neste trabalho, demonstrando que na época das chuvas protozoários como *E. histolytica/E. dispar* e *Blastocystis* spp. mantêm elevada prevalência, justificando que a veiculação hídrica é uma das maiores fontes de contaminação desses enteroparasitas.

Reforça-se, nesta situação, aumento significativo desses dois parasitas na última coleta realizada no mês de janeiro, época das chuvas, demonstrando que nesse período os protozoários intestinais foram mais abundantes.

Em contrapartida, *Ancylostoma* spp. foi o mais freqüente na época da seca, dado este que vai ao encontro do ciclo reprodutivo dos geohelmintos, uma vez que o solo é um local primordial na participação do ciclo de vida do parasita, apesar do seu ciclo ser mais eficaz em solo úmido.

As altas prevalências de protozoários intestinais e helmintos, nas respectivas épocas do ano, chuva e seca, torna-se uma ameaça para a população indígena, via de regra marcada pelo hábito de vida peculiar, como viver aldeados em um número superior a seis pessoas por habitação, e hábitos higiênicos contribuindo para a transmissão pessoa-pessoa.

A contaminação do solo por meio de depósito de fezes, principalmente pelas crianças, que permanecem fixas no solo na época da seca, tornam o ambiente favorável a proliferação dos geohelmintos.

Em contrapartida, os períodos chuvosos favorecem o espalhamento dos parasitas pelas águas pluviais, resultando em terreiros altamente contaminados. Nesse período, as águas das chuvas podem “lavar” o solo, deslocando os resíduos fecais para os córregos mais próximos das aldeias e/ou para o subterrâneo, afetando o lençol freático, podendo contaminar os poços utilizados pelas famílias Tapirapé.

Não obstante, as fezes humanas a céu-aberto somado a presença de animais como porcos, gatos, alguns animais silvestres, mas, sobretudo o grande número de cães que defecam por toda parte nas seis aldeias indígenas, são um agravante para a disseminação e transmissão zoonótica das parasitoses intestinais, a exemplo de protozoários como *Giardia* intestinalis e *Blastocystis* spp. e, helmintos como *Ancylostoma* spp e *Strongyloides stercoralis*.

Singh et al. (2010) revisaram a prevalência das zoonoses parasitárias e concluíram que, além de outros fatores, a falta de higiene pessoal, a alta densidade populacional e água não tratada são os maiores responsáveis pela alta prevalência na Índia. É sabido que a realidade vivida por nossas populações faveladas, ribeirinhas e indígenas é bastante similar àquele país e, ações públicas e educacionais são primordiais para estancar esse flagelo que afeta a saúde coletiva.

No mundo todo, tanto em países industrializados, quanto em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, a situação da estrutura básica de saneamento das populações indígenas é notoriamente pior que da população em geral (WHO, 2011).

Neste sentido, num outro continente bem distante da América do Sul, os indígenas australianos também sofrem com a alta prevalência de parasitas intestinais. Naquele país essas comunidades indígenas têm assistência à saúde de qualidade inferior, em comparação aos não-índios e é sabido que melhorias tanto na disponibilidade de recursos quanto na entrega de serviços de saúde são fundamentais. Entretanto esses aspectos devem ser considerados num contexto amplo, que contemplem fatores ambientais interdependentes que afetam a saúde, tais como aglomeração, abastecimento de água adequado e seguro, higiene e saneamento (CURRIE; BREWSTER, 2001).

Bailie et al. (2005) pesquisaram três comunidades remotas na Austrália e, demonstraram que os moradores, pertencentes a uma mesma comunidade, mas habitantes de casas que tinham instalações para a remoção de fezes e piso de cerâmica tiveram taxas muito mais baixas de infecção da pele que os moradores de casas sem essas facilidades. Tais melhorias em infra-estrutura e higiene também podem ser consideradas quando objetiva-se reduzir a transmissão de patógenos entéricos.

Outro fator que merece atenção é a ausência de políticas públicas focadas na assistência aos cuidados com a terra devastada, uma vez que os Tapirapé vêm sofrendo com os desmandes de grileiros e posseiros que resistem em permanecer em terras indígenas, para criação de gado, mesmo após determinação da FUNAI e interferência da polícia federal nas negociações entre fazendeiros e os índios para desocupação imeditada de suas terras.

Este fato interfere diretamente no hábito de vida dos Tapirapé, especialmente das crianças que são obrigadas a defecar no peridomicílio (terreiro), contaminando o ambiente por falta de mata nativa mais próxima as aldeias. Soma-se a isso a falta de banheiro nas seis aldeias da Terra indígena Urubu Branco, fato que contribui sobremaneira na proliferação de geohelmintos como o *Ancylostoma* spp. Esses nematóides, comumente associados a quadros de anemia, principalmente entre as crianças (BRITO et al., 2006; BROOKER et al., 2007), permanecem por um longo tempo no solo, onde completa o seu ciclo biológico e torna-se infectante, fazendo com que o ambiente constitua uma verdadeira fonte de infecção desse parasita.

A contaminação fecal nas aldeias Tapirapé só não é maior porque 76,5% dos índios ainda mantêm o hábito tradicional, principalmente os adultos, pois procuram a mata mais distante para defecar, contra 14% que defecam no terreiro e apenas 9,5% nos poucos vasos sanitários existentes na aldeia Urubu Branco.

Os Tapirapé têm hábitos de vida seminômade, assim como a maioria dos índios da Amazônia. Porém, esse comportamento, no qual os índios culturalmente mudavam de ambiente num determinado período antes do desgaste total da terra, sofreu uma adaptação obrigatória com a chegada dos não-índios, influenciada pelos programas de colonização na região estimulados pelo governo federal na década de 1970. Nesse período colonos de várias partes do país ocuparam de várias formas, sobretudo desordenadamente, a região Araguaia, estabelecendo-se em locais antes habitados por comunidades indígenas de diversas etnias, especialmente os

Tapirapé. Tal migração levou os índios a habitar um espaço restrito, que impede movimentos migratórios, concentrando a população nessas áreas demarcadas.

Diante do exposto, densidade populacional somada a ausência de sistema de saneamento básico, que gera contaminação ambiental por resíduos alimentares e material fecal, contribuiram para a intensificação da transmissão de patógenos entéricos (COIMBRA JÚNIOR; MELLO, 1981; VIEIRA, 2003).

Além disso, essa situação pode acarretar o poliparasitismo entre os indígenas. Isto é fato entre os Tapirapé, uma vez que a ocorrência de coinfecção foi em torno de 65%, isto é de individuos que apresentaram dois ou mais parasitas intestinais em suas amostras fecais.

Quadro bastante similar foi verificado na maioria dos estudos envolvendo comunidades indígenas da Amazônia brasileira, onde foram registradas, por exemplo, prevalências para poliparasitismo superiores a 46,2% entre os Suruí (PALHANO-SILVA et al., 2009), assim como, entre indígenas de outros biomas brasileiros, como os Kaingáng no sudeste brasileiro, onde 68,3% dos índios apresentaram poliparasitismo (TOLEDO et al., 2009).

Os resultados observados entre os Tapirapé também foram superiores aos achados num estudo com os índios da etnia Xavante habitantes do Cerrado mato-grossense, onde 41,5% da população estudada apresentaram dois ou mais enteroparasitas (SANTOS et al., 1995).

Em outros países latino-americanos, como o México o poliparasitismo é também uma problemática as comunidades indígenas, com prevalência superior a 56% em índios acometidos por dois ou mais enteroparasitas (GÁLVAN-RAMÍREZ; MADRIZ-ELISONDO; BERNAL-REDONDO, 2007; MORALES-ESPINOZA et al., 2003).

Nos vizinhos indígenas sul-americanos o poliparasitismo também é uma preocupação aos órgãos de assistência aos indígenas, a exemplo da Argentina, onde foi registrado que 41,5% dos índios da comunidade Salta apresentaram quatro ou mais parasitas em suas amostras fecais (MENGHI et al., 2007). Porém, o mais alto índice de poliparasitismo argentino foi registrado em quatro etnias – Kaaguy, Poty, Yuy Pytá, Takuapí e Aristóbulo del Valle onde foi diagnosticado no estudo que 84% dos índios apresentaram mais de dois parasitas intestinais, seguido por 81% levantados por Zonta, Oyhenart e Navone (2010).

Nos casos de poliparasitismo envolvendo apenas os parasitas patogênicos, os resultados deste estudo foram de apenas 23,26%, corroborando com os achados dos índios da Amazônia venezuelana nos quais apresentaram 29,3% de prevalência para poliparasitismo (VELASCO et al., 2011) e, ocorrência de poliparasitismo superior aos índios da Amazônia boliviana, que apresentaram 15% no estudo realizado por Tanner et al. (2009) entre os indígenas da região. Destaca-se aqui que os resultados dos estudos da Venezuela e Bolívia englobaram todos os patogênicos e comensais, sendo assim, os nossos resultados foram muito superiores em comparação a esses achados.

De acordo com McDonald et al. (2008) programas de desparasitação são estratégias primordiais no sentido de impedir a proliferação das enteroparasitoses, principalmente em crianças indígenas que vivem em comunidades remotas. Destaca-se ainda que tais ações devam ser usadas em conjunto com as intervenções ambientais que, provavelmente, reduziria a taxa de re-infecção, tais como lavar as mãos e implantação de sistema de saneamento básico.

Porém, se faz necessário incentivo por parte das agências de fomento quanto a pesquisa básica envolvendo estudos acerca dos patógenos nas comunidades indígenas brasileiras, contribuindo sobremaneira na elucidação das doenças infecto-parasitárias. Atividade esta corroborada por Bóia et al. (2006) nos quais indicam que mais estudos, com grandes amostras, incluindo as comunidades ribeirinhas e intensa avaliação das infecções, são necessários para melhor avaliar o impacto de tais intervenções. No entanto, informações gerais sobre o estado atual de saúde das populações indígenas na América Latina são limitadas (MONTENEGRO; STEPHENS, 2006).

Com a implementação do Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena (SIASI) no Brasil, esperava-se que as principais barreiras ao acesso dos povos indígenas para Sistema Único de Saúde (SUS) teriam sido superadas, já que não havia investimento maciço na estruturação de locais serviços de saúde em Terras Indígenas em todo o país (CARDOSO et al., 2010).

Além disso, projetos de educação em saúde devem ser melhor gerenciados pelos órgãos que assistem a saúde do índio brasileiro em conjunto com os órgãos educacionais. Esta ação contribuirá para compreensão, por parte do índio, sobre a importância de se prevenir contra os protozoários intestinais, helmintos, sobretudo os geohelmintos que assolam o povo Tapirapé.

Todos os programas ou ações implantados ou a serem implementados, com vistas à melhoria dos povos indígenas brasileiros, devem ocorrer com participação efetiva dos índios. Os agentes de saúde (AIS), em especial, são os principais autores na luta por melhores condições de saúde à comunidade e, portanto são primordiais na participação dos índios nos serviços de saúde, seja no planejamento, na gestão, na avaliação e no controle social (LANGDON et al., 2006).

5.6 Recomendação

Diante dos resultados preocupantes obtidos nestes quatro anos de trabalho, incluindo campo e laboratório, salientamos a necessidade de ações efetivas no combate aos problemas relacionados à alta taxa de parasitoses intestinais entre os Tapirapé, visando minimizar a contaminação do peridomicílio e a transmissão pessoa-pessoa.

Para tanto, algumas medidas são aqui sugeridas:

1. Necessidade primordial de melhorias na infra-estrutura sanitária das aldeias da Terra Indígena Urubu Branco por parte da FUNASA;
2. Melhoria no tratamento da água dos poços artesianos implantados pela FUNASA;
3. Implantação de programas de educação em saúde envolvendo a escola indígena Tapirapé, agentes indígenas de saúde, agentes indígenas sanitários, liderança indígena, secretarias estaduais e municipais de saúde e, de educação e FUNASA;
4. Melhoria das condições voltadas a Atenção à Saúde Indígena, com participação efetiva da liderança indígena e, profissionais indígenas envolvidos na saúde, apoiando o SIASI;
5. Exames coproparasitológicos de rotina para atender a demanda da comunidade Tapirapé;
6. Exame e tratamento imediato dos animais domésticos, incluindo cães, gatos, suínos e aves;
7. Intervenção dos órgãos competentes no que tange a garantia da retomada das terras ao povo Tapirapé, com vistas a recuperação das áreas

degradadas pelos posseiros, grileiros e pecuaristas que agiram ilegalmente durante vários anos na região;

8. Formação de uma base de dados sobre doenças infecciosas e parasitárias, a fim de identificar o local e quais intervenções são necessárias para dirimir o problema. A falta de conhecimento básico sobre dada população, impede associar infecções parasitárias com as questões culturais, comportamentais e ambientais necessárias no auxílio no planejamento e implementação de políticas e programas de atenção à saúde dos Tapirapé, contribuindo com o SIASI.

6 CONCLUSÃO

a) As técnicas microscópicas utilizadas nos exames coproparasitológicos foram eficazes e apresentaram boa concordância no diagnóstico;

b) Alta prevalência de parasitas intestinais foi observada entre os índios Tapirapé;

c) Poliparasitismo foi observado em grande parte dos indivíduos examinados e, está entre as taxas mais altas registradas na Amazônia brasileira;

d) Os parasitas comensais estão entre os mais prevalentes neste estudo, porém, os patogênicos se mantêm na comunidade mesmo após administração medicamentosa;

e) A prevalência de *Giardia intestinalis* foi maior entre os menores de 15 anos de idade;

f) A infecção por *Hymenolepis nana* está associada à presença de diarréia;

g) Os assemblages zoonóticos A e B de *Giardia intestinalis* foram os únicos observados no estudo;

h) Os subtipos 1, 2, 3, de *Blastocystis* spp., todos zoonóticos, foram encontrados entre os índios Tapirapé. O subtipo 1 de *Blastocystis* spp. foi o de maior ocorrência.

i) Os resultados apontam para a necessidade primordial de intervenções, com vistas aos programas de educação e saúde, infra-estruturas sanitárias, água potável e investimentos no Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena.

REFERÊNCIAS*

ABE, N.; NAGOSHI, M.; TAKAMI, K.; SAWANO, Y.; YOSHIKAWA, H. A survey of *Blastocystis* spp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. **Vet. Parasitol.,** v. 106, p. 203-212, 2002.

AGUIAR, J. I. A.; GONÇALVES, A. Q.; SODRÉ, F. C.; PEREIRA, S. R.; BÓIA, M. N.; LEMOS, E. R. S.; DAHER, R. R. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis.***Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 40, p. 631-634, 2007.

ALLEN, A. V. H.; RIDLEY, D. S. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. **J. Clin. Pathol.,** v. 23, p. 545-546, 1970.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.,** v. 215, p. 403-410, 1990.

AMENTA, M.; DALLE NOGARE, E.R.; COLOMBA, C.; PRESTILEO, T. S.; DI LORENZO, F.; FUNDARO, S.; COLOMBA, A.; FERRIERI, A. Intestinal protozoa in HIV-infected patients: effect of rifaximin in *Cryptosporidium parvum* and *Blastocystis hominis* infections. **J. Chemother.,** v. 11, p. 391-395, 1999.

BAILIE, R. S.; STEVENS, M.R.; MCDONALD, E.; HALPIN, S.; BREWSTER, D.; ROBINSON, G.; GUTHRIDGE, S. Skin infection, housing and social circumstances in children living in remote Indigenous communities: testing conceptual and methodological approaches. **BMC Public Health,** v. 5, p. 128, 2005.

BALDACCI, E. R.; CANDEIAS, J. A. N.; BREVIGLIERI, J. C.; GRISI, S. J. E. Etiologia viral e bacteriana de casos de gastroenterite infantil: uma caracterização clínica. **Rev. Saúde Pública,** v. 13, p. 47-53, 1979.

BALDUS, H. **Tapirapé: tribo tupí do Brasil central.** São Paulo: Nacional/Edusp, 1970. 510 p.

BANATICLA, J. E.; RIVERA, W. L. Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines. **J. Water Health,** v. 9, p. 128-137, 2011.

BASSET, D.; GAUMERAIS, H.; BASSET-POUGNET, A. Intestinal parasitoses in children of an Indian community of Bolivian altiplano. **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales,** v. 79, p. 237-246, 1986.

BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A.; SODRÉ, F. C.; PORRAS-PEDROZA, B. E.; FARIA, E. C.; MAGALHÃES, G.A.; SILVA, I. M. Tuberculosis and intestinal parasitism among indigenous people in the Brazilian Amazon region. **Rev. Saúde Pública,** v. 43, p. 176-178, 2009.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOOROM, K. F.; SMITH, H.; NIMRI, L.; VISCOGLIOSI, E.; SPANAKOS, G.; PARKAR, U.; LI, L. H.; ZHOU, X. N.; OK, U. Z.; LEELAYOOVA, S.; JONES, M. S. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. **Parasit. Vectors,** v. 1 (1), p. 40, 2008.

BORGES, J. D.; AMARCÓN, R. S. R.; AMATO NETO, V.; GAKIYA, E. Parasitoses intestinais de indígenas da comunidade Mapuera (Oriximiná, Estado do Pará, Brasil): elevada prevalência de *Blastocystis hominis* e encontro de *Cryptosporidium* sp e *Cyclospora cayetanensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** Uberaba, v. 42, p. 348-350, 2009.

BOURÉE, P.; DAVID, P.; BASSET, D.; COCO, O.; BEAUVAIS, B.; DAVID-JULIEN, M. C.; POUGNET, A. Epidemiologic survey of intestinal parasitoses in Peruvian Amazonia. **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, v. 77, p. 690-698, 1984.

BRITO, L. L.; BARRETO, M. L.; SILVA, R. De C.; ASSIS, A. M.; REIS, M. G.; PARRAGA, I. M.; BLANTON, R. E. Moderate- and low-intensity co-infections by intestinal helminths and *Schistosoma mansoni*, dietary iron intake, and anemia in Brazilian children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 75, p. 939-944, 2006.

BROOKER, S.; JARDIM-BOTELHO, A.; QUINNELL. R. J.; GEIGER, S. M.; CALDAS, I. R.; FLEMING, F.; HOTEZ, P. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; RODRIGUES, L. C.; BETHONY, J. M. Age-related changes in hookworm infection, anaemia and iron deficiency in an area of high *Necator americanus* hookworm transmission in south-eastern Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,** v. 101, p. 146-154, 2007.

BUTLER, J. C.; CRENGLE, S.; CHEEK, J. E.; LEACH, A. J.; LENNON, D.; O`BRIEN, K. L.; SANTOSHAM, M. Emerging Infectious Diseases among indigenous peoples. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 7, p. 554-555, 2001.

CACCIÒ, S. M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **Int. J. Parasitol.,** v. 32, p. 1023-1030, 2002.

CACCIÒ, S. M.; BECK, R.; LALLE, M.; MARINCULIC, A.; POZIO, E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **Int. J. Parasitol.,** v. 38, p. 1523-1531, 2008.

CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Mol. Biochem. Parasitol.,** v. 160, p. 75-80, 2008.

CARDOSO, D. das D. de P.; MARTINS, R. M. B.; KITAJIMA, E. W. Rotavirus e adenovirus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastrenterite em Goiânia - GO. Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop**. S. Paulo, v. 34, p. 433-439, 1992.

CARDOSO, A. M.; COIMBRA JÚNIOR, C. E. A.; TAVARES, F. G. Hospital Morbidity among Guarani Indians in Southeastern and Southern Brazil. **Rev. Bras. Epidemiol.,** v. 13, p. 1-13, 2010.

CARMO, E. H. Doença diarréica por Rotavírus: magnitude, introdução da vacina e desafios para a vigilância epidemiológica. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 2266-2267, 2006.

CHAPMAN, S.; THOMPSON, C.; WILCOX, A.; RUSSELL, K. What is your diagnosis? Rectal scraping from a dog with diarrhea. **Vet. Clin. Pathol.,** v. 38, p. 59-62, 2009.

CHIEFFI, P. P. Alterações ambientais e infecções parasitárias. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 47, p. 09-13, 2002.

CHOMEL, B. B. Control and prevention of emerging parasitic zoonoses. **Int. J. Parasitol**. v. 38, p. 1211-1217, 2008.

CLARK, C. G. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. **Mol. Biochem. Parasitol.,** v. 87, p. 79-83, 1997.

CLARK, C. G. Methods for the Investigation of Diversity in *Entamoeba histolytica*. **Arch. Med. Res.**, v. 37, p. 258-261, 2006.

CNOPS, L.; ESBROECK, M. V. Freezing of stool samples improves real-time PCR detection of *Entamoeba dispar* and *Entamoeba histolytica.* **J. Microbiol. Methods,** v. 80, p. 310-312, 2010.

COIMBRA JÚNIOR, C. E. A.; MELLO, D. A. Enteroparasitas e *Capillaria* sp. Entre o Grupo Suruí, Parque Indígena Aripuanã, Rondônia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 76, p. 299-302, 1981.

COIMBRA JÚNIOR, C. E. A.; SANTOS, R. V. Parasitismo Intestinal Entre o Grupo Indígena Zoró, Estado de Mato Grosso (Brasil). **Cad. Saúde Pública**, v. 7, p. 100-103, 1991.

CONFALONIERI, U. E.; ARAÚJO, A. J.; FERREIRA, L. F. Enteroparasitos em índios Yanomámi. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 111-113, 1989.

CRAWLEY, J. Reducing the burden of anemia in infants and young children in malaria-endemic countries of Africa: from evidence to action. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, p. 25-34, 2004.

CURRIE, B. J.; BREWSTER, D. R. Childhood infections in the tropical north of Australia. **J. Paediatr. Child. Health.,** v. 37, p. 326-330, 2011. Review.

DAS, B. K.; GENTSCH, J. R.; CICIRELLO, H. G.; WOODS, P. A.; RAMACHANDRAN, M.; GUPTA, A. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **J. Clin. Microbiol.;** v. 32, p. 1820-1822, 1984.

DE SOUZA, M. C.; SCATENA, J. H. G.; SANTOS, R. V. O Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena (SIASI): criação, estrutura e funcionamento. **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 23, p. 853-861, 2007.

DEVERA, R.; BLANCO, Y.; CABELLO, E. High prevalence of *Cyclospora cayetanensis* among indigenous people in Bolivar State, Venezuela. **Cad. Saúde Pública,** v. 21, p. 1778-1784, 2005.

DÍAZ, A. I.; RIVERO, R. Z.; BRACHO, M. A.; CASTELLANOS, S. M.; ACURERO, E.; CALCHI, L. M.; ATENCIO, T, R. Prevalence of intestinal parasites in children of Yukpa Ethnia in Toromo, Zulia State, Venezuela. **Rev. Med. Chil.;** v. 134, p. 72-78, 2006.

DIB, H. H.; LU, S.Q.; WEN, S.F. Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. **Parasitol. Res.,** v. 103, p. 239-251, 2008.

DOGRUMAN-AL, F.; KUSTIMUR, S.; YOSHIKAWA, H.; TUNCER, C.; SIMSEK, Z.; TANYUKSEL, M.; ARAZ, E.; BOOROM, K. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 724-727, 2009.

DOMÍNGUEZ-MÁRQUEZ, M. V.; GUNA, R.; MUÑOZ, C.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; BORRÁS, R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). **Parasitol. Res.,** v. 105, p. 949-955, 2009.

DUDA. A.; STENZEL, D. J.; BOREHAM, P. F. Detection of *Blastocystis* sp. in domestic dogs and cats. **Vet. Parasitol.;** v. 76, p. 9-17, 1998.

EKANAYAKE, D. K.; ARULKANTHAN, A.; HORADAGODA, N. U.; SANJEEVANI, G. K.; KIEFT, R.; GUNATILAKE, S.; DITTUS, W. P. Prevalence of *Cryptosporidium* and other enteric parasites among wild non-human primates in Polonnaruwa, Sri Lanka. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 74, p. 322-329, 2006.

ESCOBAR-PARDO, M. L.; DE GODOY, A. P.; MACHADO, R. S.; RODRIGUES, D.; FAGUNDES NETO, U.; KAWAKAMI, E. Prevalence of intestinal parasitoses in children at the Xingu Indian Reservation. **J. Pediatr.,** v. 86, p. 493-496, 2010.

EY, P. L.; DARBY, J. M. VSP417-6, a variant-specific surface protein encoded at a sixth locus within the vsp417 gene subfamily of *Giardia intestinalis*. **Int. J. Parasitol.,** v. 32, p. 425-436, 2002.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminth in feces**. J. Parasitol.,** v. 25, p. 241-261, 1939.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 24, p. 110-140, 2011.

FERRARI, J. O.; FERREIRA, M. U.; CAMARGO, L. M. A.; FERREIRA, C. S. Intestinal Parasites Among Karitiana Indians From Rondônia State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.,** v. 34, p. 223-225, 1992.

FERREIRA, C. S.; CAMARGO, L. M.; MOITINHO, M. L.; DE AZEVEDO, R. A. Intestinal parasites in Iaualapiti Indians from Xingu Park, Mato Grosso, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 86, p. 441-442, 1991.

FIGUEROA, G.; TRONCOSO, M.; ARAYA, M.; ESPINOZA, J.; BRUNSER, O. Enteropathogen carriage by healthy individuals living in an area with sanitation. **J. Hig.,** v. 91, p. 499-507, 1983.

FONTBONNE, A.; FREESE-DE-CARVALHO, E.; ACIOLI, M. D.; SÁ, G.A.; CESSE, E. A. P. Risk factors for multiple intestinal parasites in an indigenous community of the State of Pernambuco, Brazil. **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 17, p. 367-373, 2001.

FOTEDAR, R.; STARK, D.; BEEBE, N.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J.; HARKNESS, J. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 20, p. 511–532, 2007.

FRANZÉN, O.; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; CASTRO, E.; SHERWOOD, E.; ANKARKLEV, J.; REINER, D. S.; PALM, D.; ANDERSSON, J.O.; ANDERSSON, B.; SVÄRD, S. G. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? **PLoS Pathog**. v. 5, p. 1-14, 2009.

FREIRE, G., TILLET, A. **Salud indígena en Venezuela.** 2nd ed. Caracas: Gobierno Bolivariano de Venezuela, Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2008. 379 p. v. 1.

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO - FUNAI. **Índios do Brasil**. Disponível em: <http://www.funai.gov.br/funai/>. Acesso em: 14 jul. 2010.

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO - **FUNAI**. Disponível em: <http://mapas.funai.gov.br/>. Acesso em: 10 mai. 2011.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Saúde Indígena**. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/>. Acesso em: 14 jun. 2011.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Política Nacional de Atenção à Saúde dos Povos Indígenas**. - 2ª edição - Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 40 p., 2002.

GABBAY, Y. B.; MORAIS, M. A.; ALVES, A. S.; KLEINLEIN, K.; MASCARENHAS, J. D.; LINHARES, A.C. Detecção de rotavírus por imunocromatografia: ensaio simples e de rápida execução. **Ver. Par. Med.;** v. 19, p. 13-18, 2005.

GALVÁN-RAMÍREZ, M. L.; MADRIZ-ELISONDO, A. L.; BERNAL-REDONDO, R. Biodiversidad parasitaria entre indígenas y mestizos adultos de San Pedro Itzicán, Jalisco, México: [carta al editor]. **Salud pública Méx.,** v. 49, p. 321-322, 2007.

GENARO, O.; FERRARONI, J. J. Estudo sobre malária e parasitoses intestinais em indígenas da tribo Nadeb-Maku, estado do Amazonas, Brasil. **Rev. Saúde Pública**,

São Paulo, v. 18, p. 162-169, 1984.

GOOGLE MAPS**.** Disponível em: <maps.google.com.br/>. Acesso em: 14 jun. 2011.

GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, F.H.; FORRESTER, B. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.;** v. 28, p. 276-282, 1990.

GRANTHAM-MCGREGOR, S.; ANI, C. A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. **J. Nutr.;** v. 131, p. 649S-666S, Discussion 666S-668S, 2001.

GRENFELL, P.; FANELLO, C. I.; MAGRIS, M.; GONCALVES, J.; METZGER, W. G.; VIVAS-MARTÍNEZ, S.; CURTIS, C.; VIVAS, L. Anaemia and malaria in Yanomami communities with differing access to healthcare. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.;** v. 102, p. 645-52, 2008.

GUNZBURG, S.; GRACEY, M.; BURKE, V.; CHANG, B. Epidemiology and microbiology of diarrhoea in young Aboriginal children in the Kimberley region of Western Australia. **Epidemiol. Infect.;** v. 108, p. 67-76, 1992.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic. Acids Symp. Ser.;** v. 41, p. 95-98, 1999.

HINKE, T. M. **Perfil nosológico da população ribeirinha do baixo rio Machado em Rondônia/Amazônia Ocidental-Brasil.** 150 f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biomédicas – ICB – Universidade de São Paulo-USP, 2009.

HIRATA, T.; NAKAMURA, H.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; KINJO, F.; YAMANE, N.; FUJITA, J. Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan. **Parasitol. Res.;** v. 101, p. 1717-1719, 2007.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **J. Public Health Trop. Med.;** v. 9, p. 283-291, 1934.

HOLD, D. C.; MCCARTHY, J. S.; CARAPETIS, J.R. Parasitic diseases of remote Indigenous communities in Australia. **Int. J. Parasitol.,** v. 40, p. 1119-1126, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas_e_Mapas/Mapas_Murais/ 2010/>. Acesso em: 14 jun. 2011.

IDRIS, N.S.; DWIPOERWANTORO, P.G.; KURNIAWAN, A.; SAID, M. Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. **J. Infect. Dev. Ctries.,** v. 3, p. 309-317, 2010.

INSTITUTO SÓCIO-AMBIENTAL - ISA. **Povos Indígenas no Brasil**. Disponível em:

<http://www.socioambiental.org/>. Acesso em: 7 abr. 2010.

JIMENEZ-GONZALEZ, D.E.; MARTINEZ-FLORES, W. A.; REYES-GORDILLO, J.; RAMIREZ-MIRANDA, M. E.; ARROYO-ESCALANTE, S.; ROMERO-VALDOVINOS, M.; STARK, D.; SOUZA-SALDIVAR, V.; MARTINEZ-HERNANDEZ, F.; FLISSER, A.; OLIVO-DIAZ, A.; MARAVILLA, P. *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. **Parasitol. Res.,** v. 109, p. 1-7, 2011.

JONES, K. E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature,** v. 451, p. 990-994, 2008.

JONES, M. S.; WHIPPS, C.M.; GANAC, R.D.; HUDSON, N.R.; BOROOM, K. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. **Parasitol. Res.,** v. 104, p. 341–345, 2009.

LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIÒ, S.M. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes**. Int. J. Parasitol.,** v. 35, p. 207-213, 2005.

LANELLI, R. V.; SILVA, J. P.; AGOSTINI, S. M. Parasitoses intestinais nos índios Xavante de Parabubure, Mato Grosso, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 11, p.630-630, 1995.

LANGDON, E. J.; DIEHL, E. E.; WIIK, F. B.; DIAS-SCOPEL, R. P. A participação dos agentes indígenas de saúde nos serviços de atenção à saúde: a experiência em Santa Catarina, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 2637-2646, 2006.

LAWLESS, J. W.; LATHAM, M. C.; STEPHENSON, L. S.; KINOTI, S. N.; PERTET, A. M. Iron supplementation improves appetite and growth in anemic Kenyan primary school children. **J. Nutr.,** v. 124, p. 645-654, 1994.

LAWRENCE, D. N.; NEEL, J. V.; ABADIE, S. H.; MOORE, L. L.; ADAMS, L. J.; HEALY, G. R.; KAGAN, I. G. Estudos Epidemiológicos entre Populações Ameríndias da Amazônia. III. Parasitoses Intestinais em Povoações Recentemente Contactadas e em Aculturação. **Acta Amazônica,** v. 13, p. 393-407, 1983.

LEELAYOOVA, S.; SIRIPATTANAPIPONG, S.; THATHAISONG, U.; NAAGLOR, T.; TAAMASRI, P.; PIYARAJ, P.; MUNGTHIN, M. Drinking water: possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in centralThailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 79, p. 401-4066, 2008.

LEELAYOOVA, S.; SIRIPATTANAPIPONG, S.; NAAGLOR, T.; TAAMASRI, P.; MUNGTHIN, M. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections in Military Personnel and Military Dogs, Thailand. **J. Med. Assoc. Thai,** v. 92, p. 53-59, 2009.

LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology,** 4th ed., Washington: American Society for Microbiology, 1985. 1149 p.

LI, L. H.; ZHANG, X. P.; LV, S.; ZHANG, L.; YOSHIKAWA, H.; WU, Z.; STEINMANN, P.; UTZINGER, J.; TONG, X.M.; CHEN, S.H.; ZHOU, X.N. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. **Parasitol. Res.,** v. 102, p. 83-90, 2007.

LIMA, A. A.; SILVA, T. M.; GIFONI A, M.; BARRETT, L. J.; MCAULIFFE, I. T.; BAO. Y.; FOX, J. W.; FEDORKO, D. P.; GUERRANT, R. L. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil**. Am. J. Gastroenterol.,** v. 92, p. 1861-1866, 1997.

LIMA, A. A. Tropical diarrhoea: new developments in traveller's diarrhoea. **Curr. Opin. Infect. Dis.,** v. 14, p. 547-52, 2001.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B.; GABBAY, Y. B.; SHIRLEY, J. A.; BEARDS, G. M. An outbreak of rotavírus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian Community. **Am. J. Epidemiol.,** v. 13, p. 703-710, 1981.

LINHARES, A. C. Epidemiology of diarrhea infection among indian populations of Amazonia. **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 8, p. 121-128, 1992.

LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 16, p. 629-646, 2000.

LOZOFF, B.; JIMENEZ, E.; HAGEN, J.; MOLLEN, E.; WOLF, A. W. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. **Pediatrics,** v. 105, p. 1-11, 2000.

LUNA MONRROY, S.; JIMENEZ, S.; LOPEZ, R.; SOTO, M.; BENEFICE, E. Prevalencia de Parasitismo Intestinal en Niños y Mujeres de Comunidades Indígenas del Río Beni. **Visión Científica,** v. 1, p. 37-46, 2007.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 11, p. 121-155, 1919.

MCDONALD, E.; BAILIE, R.; BREWSTER, D.; MORRIS, P. Are hygiene and public health interventions likely to improve outcomes for Australian Aboriginal children living in remote communities? A systematic review of the literature. **BMC Public Health,** v. 8, p. 1-14, 2008. Review.

MAGALHÃES, G. F.; NOGUEIRA, P. A.; GRAVA, A. F.; PENATI, M.; SILVA, L. H.; ORLANDI P. P. Rotavirus and adenovirus in Rondônia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 102, p. 555-557, 2007.

MALHEIROS, A. F. **Ocorrência de patógenos intestinais e fatores de risco associados à infecção entre os índios Tapirapé habitantes da Amazônia mato-**

grossense, Brasil. 2011. 166 f. Tese. Doutorado em Parasitologia. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

MASCARENHAS, J. D.; GUSMÃO, R. H. P; GABBAY, Y. B; MONTEIRO, T. A. F.; GOMES, J. B.; LINHARES, A. Concomitant Rotavirus Serotypes 1 And 4 Infecctions In A Diarrhoeic Child From Belém, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.,** São Paulo. *V.* 38, p. 249-252, 1996.

MATO GROSSO. **Mato Grosso e seus municípios.** Disponível em: <http://www.mteseusmunicipios.com.br/>. Acesso em: 7 abr. 2010.

MELONI, D.; SANCIU, G.; POIRIER, P.; EL ALAOUI, H.; CHABÉ, M.; DELHAES, L.; DEI-CAS, E.; DELBAC, F.; LUIGI FIORI, P.; DI CAVE, D.; VISCOGLIOSI, E. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. **Parasitol. Res.,** v. 109, p. 613-619, 2011.

MENGHI, C. I.; IUVARO, F. R.; DELLACASA, M. A.; GATTA, C. L. Survey of intestinal parasites among an aboriginal community in Salta. **Medicina** (B Aires), v. 67, p. 705-708, 2007.

MENOUNOS, P. G.; SPANAKOS, G.; TEGOS, N.; VASSALOS, C. M.; PAPADOPOULOU, C.; VAKALIS, N. C. Direct detection of *Blastocystis* sp. In human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. **Mol. Cell. Probes,** v. 22, p. 24-29, 2008.

MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD. **Anuario de Mortalidad 2006. Dirección General de Epidemiologia. Dirección de Información y Estadística de Salud.** Disponível em: <http//:www.mpps.gob.ve/direcciones_msds/epidemiologia/estadistica/archivos/anyuarios.htm/>. Acesso em: 11 jun. 2011.

MIRANDA, R.A., XAVIER, F.B., MENEZES, R.C. Parasitismo intestinal em uma aldeia indígena Parakanã, sudeste do Estado do Pará, Brasil. **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 14, p. 507-511, 1998.

MIRANDA, R. DOS A.; XAVIER, F. B.; NASCIMENTO, J. R. L.; MENEZES, R. C. Prevalência de parasitismo intestinal nas aldeias indígenas da tribo Tembé, Amazônia Oriental Brasileira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., Uberaba, v. 32, p. 389-393,1999.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Mol. Biol. Evol.,** v. 16, p. 1135-1144, 1999.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infect. **Gen. Evol.,** v. 3, p. 29-38, 2003.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infect. Genet. Evol.,** v. 3, p. 233-244, 2003. Review.

MONTENEGRO, R. A.; STEPHENS, C. Indigenous health in Latin America and the Caribbean. **Lancet,** v. 367, p. 1859-1869, 2006.

MORALES-ESPINOZA, E. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, H. J.; GARCÍA-GIL, M. M.; VARGAS-MORALES, G.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, J. D.; PÉREZ-RAMÍREZ, M. Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico. **Salud Pública Méx.,** v. 45, p. 379-388, 2003.

MORENO, A. C. R.; FERNANDES FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; DOS SANTOS FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 66, p. 50-57, 2010.

MOTA, J. A. C. et al., In: **Pediatria Ambulatorial**. 5 ed. Belo Horizonte. COOPMED, 2004. 1034 p.

MOURA, F. T.; FALAVIGNA, D. L. M.; MOTA, L. T.; TOLEDO, M. J. O. Enteroparasite contamination in peridomiciliar soils of two indigenlus territories, State of Paraná, southern Brazil. **Rev. Panam. Salud Publica,** v. 27, p. 414-422, 2010.

MULTIPLE ALIGNMENT – **MUTALIN**. Disponível em: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>. Acesso em: 10 ago. 2011.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 8 fev. 2010.

NAVONE, G. T.; GAMBOA, M. I.; OYHENART, E. E.; ORDEN, A. B. Parasitosis intestinales en poblaciones Mbyá-Guaraní de la Provincia de Misiones, Argentina: aspectos epidemiológicos y nutricionales. **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 22, 1089-1100, 2006.

NEEL, J. V.; MIKKELSEN W. M.; RUCKNAGEL, D. L.; WEINSTEIN, E. D.; GOYER, R. A.; ABADIE, S. H. Further studies of the Xavante Indians. 8. Some observations on blood, urine, and stool specimens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 17, p. 474-85, 1968.

NISHI, L.; BERGAMASCO, R.; TOLEDO, M. J. O.; FALAVIGNA, D. L. M.; GOMES, M. L.; MOTA, L. T.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. *Giardia* Spp. and *Cryptosporidium* Spp. in the Ivaí Indigenous Land, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.,** v. 9, p. 543-547, 2009.

OPPENHEIMER, S. J. Iron and its relation to immunity and infectious disease. **J. Nutr.,** v. 131, p. 616S-633S, 2011. Discussion 633S-635S.

ORLANDI, P. P.; SILVA, T.; MAGALHÃES, G. F.; ALVES, F.; CUNHA, R. P. de A.; DURLACHER, R.; SILVA, L. H. P. da. Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 96, p. 621-625, 2001.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES G. F.; MATOS, N. B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P. A.; SILVA, L. H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.,** v. 39, p. 507-517, 2006.

OYOFO, B. A.; SUBEKTI, D.; TJANIADI, P.; MACHPUD, N.; KOMALARINI, SETIAWAN, S.; SIMANJUNTAK, C.; PUNJABI, N.; CORWIN, A. L.; WASFY, M.; CAMPBELL, J. R. E LESMANA, M. Enteropathogens associated with acute diarrhea in community and hospital patients in Jakarta, Indonesia. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.,** v. 34, p. 139-146, 2002.

PALHANO-SILVA, C. S.; ARAÚJO, J. G.; LOURENÇO, A. E. P., BASTOS, O. M. P.; SANTOS, R. V.; COIMBRA JÚNIOR, C. E. A. Intestinal Parasitic infection in the Suruí Indians, Brazilian Amazon. **Interciencia,** v. 34, p. 259-264, 2009.

PARKAR, U.; TRAUB, R. J.; KUMAR, S.; MUNGTHIN, M.; VITALI, S.; LEELAYOOVA, S.; MORRIS, K.; THOMPSON, R. C. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. **Parasitology,** v. 134, p. 359-367, 2007.

PARKAR, U.; TRAUB R. J.; VITALI S.; ELLIOT, A.; LEVECKE, B.; ROBERTSON, I.; GEURDEN, T.; STEELE, J.; DRAKE, B.; THOMPSON, R. C. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. **Vet Parasitol.,** v. 169, p. 8-17, 2010.

PÉREZ CORDÓN, G.; HITOS PRADOS, A.; ROMERO, D.; SÁNCHEZ MORENO, M.; PONTES, A.; OSUNA, A.; ROSALES, M. J. Intestinal parasitism in the animals of the zoological garden "Peña Escrita" (Almuñecar, Spain). **Vet. Parasitol.,** v. 156, p. 302-309, 2008.

REY, L. **Parasitologia:** Parasitos e doenças parasitárias do homem nas américas e na África. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 3ª ed. 2001.

RITCHIE, L. S.; PAN, C.; HUNTER, G. W. A comparison of the zinc sulfate and the MGL (formalin-ether) technics. **J. Parasitol.,** v. 38, p. 16, 1952.

ROBERTS, T.; BARRATT, J.; HARKNESS, J.; ELLIS, J.; STARK, D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 84, p. 308-312, 2011.

ROCHA, M. O.; GOMES, M. A.; COSTA, A. O.; FURST, C.; SILVA, E. F. Molecular characterization of Brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 46, p. 273-278, 2003.

ROJAS, F. Poverty determinants of acute respiratory infections among Mapuche indigenous people in Chile`s ninth region of Araucania, using GIS and spatial statistics to identify health disparities. **Int. J. Health Geog.,** v. 6, p. 1-12, 2007.

ROLDÁN, W. H.; ESPINOZA, Y. A.; HUAPAYA, P. E.; HUIZA, A. F.; SEVILLA, C. R.; JIMÉNEZ, S. Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Peru determined by DOT-ELISA test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,** v. 51, p. 67-71, 2009.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.,** v. 4, p. 406-4225, 1987.

SANTÍN, M.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; SOLANO-AGUILAR, G.; FAYER, R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. **Parasitol. Res.,** v. 109, p. 205-212, 2011.

SANTOS, R. V.; COIMBRA JÚNIOR, C. E. A.; OTT, A. M. T. Estudos epidemiológicos entre grupos indígenas de Rondônia. III. Parasitoses intestinais nas populações dos vales dos rios Guaporé e Mamoré. **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 1, p. 467-477, 1985.

SANTOS, R. V.; LINHARES A. C.; COIMBRA JÚNIOR, C. E. A. Estudos epidemiológicos entre grupos indígenas de Rondônia. IV. Inquérito sorológico para rotavírus entre os Suruí e Karitiána. **Ver. Saúde Públ.,** São Paulo, v. 25, p. 230-232, 1991.

SANTOS, R. V.; COIMBRA JÚNIOR, C. E. A.; FLOWERS, N. M.; SILVA, J. P. Intestinal parasitism in the Xavante Indians, Central Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo,** v. 37, p. 145-148, 1995.

SANTOS, H. L.; BANDEA, R.; MARTINS, L. A.; DE MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H.; PERALTA, J. M.; NDUBUISI, M. I.; DA SILVA, A. J. Differential identification of *Entamoeba* spp. based on the analysis of 18S rRNA. **Parasitol. Res.,** v. 106, p. 883-888, 2010.

SANTOS, F. L.; GONÇALVES, M. de S.; SOARES, N. M. Validation and utilization of PCR for differential diagnosis and prevalence determination of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in Salvador City, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.,** v. 15, p. 119-125, 2011.

SANTOSHAM, M.; YOLKEN, R. H.; WYATT, R. G.; BERTRANDO, R.; BLACK, R. E.; SPIRA, W. M.; SACK, R. B. Epidemiology of rotavirus diarrhea in a prospectively monitored American Indian population. **J. Infect. Dis.,** v. 152, p. 778-783, 1985.

SANTOSHAM, M.; SACK, R. B.; REID, R.; BLACK, R.; CROLL, J.; YOLKEN, R.; AURELIAN, L.; WOLFF, M.; CHAN, E.; GARRETT, S.; FROEHLICH, J. Diarrhoeal diseases in the White Mountain Apaches: epidemiologic studies. **J. Diarrhoeal Dis. Res.,** v. 13, p. 18-28, 1995.

SCHELLENBERG, D.; SCHELLENBERG, J. R.; MUSHI, A.; SAVIGNY, D.; MGALULA, L.; MBUYA, C.; VICTORA, C. G. The silent burden of anaemia in Tanzanian children: a community-based study. Bull. **World Health Organ.,** v. 81, p. 581-590, 2003.

SCHNACK, F. J.; FONTANA, L. de M.; BARBOSA, SILVA, P. R.; L. S. M. da.; BAILLARGEON, C. M. M.; BARICHELLO, T. Povoa, M. M.; CAVASINI, MACHADO C. E.; R. L. D. Enteropatógenos associados com diarréia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 19, p. 1205-1208, 2003.

SCICLUNA, S. M.; TAWARI, B.; CLARK, C. G. DNA barcoding of *Blastocystis*. **Protist.,** v. 157, p. 77-85, 2006.

SCOLARI, C.; TORTI, C.; BELTRAME, A.; MATTEELLI, A.; CASTELLI, F.; GULLETTA, M.; RIBAS, M.; MORANA, S.; URBANI, C. Prevalence and distribution of soil-transmitted helminth (STH) infections in urban and indigenous schoolchildren in Ortigueira, State of Paraná, Brasil: implications for control. **Trop. Med. and Int. Health,** v. 5, p. 302-307, 2000.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. **J. Comp. Pathol,** v. 36, p. 266-275, 1923.

SILVA, M. C. M.; MONTEIRO, C. S. P.; ARAÚJO, B. A. V.; SILVA, J. V.; PÓVOA, M. M. Determinação da infecção por *Entamoeba histolytica* em residentes da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos. **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 21, p. 969-973, 2005.

SINGH, B. B.; SHARMA, R.; SHARMA, J. K.; JUYAL, P. D. Parasitic zoonoses in India: an overview. **Rev. Sci. Tech.,** v. 29, p. 629-637, 2010. Review.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends Parasitol.,** v. 22, p. 160-167, 2006.

SOARES, R. M.; DE SOUZA, S. L.; SILVEIRA, L. H.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; GENNARI, S. M. Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil. **Vet. Parasitol.,** v. 180, p. 344-348, 2011.

SOUPPART, L.; MOUSSA, H.; CIAN, A.; SANCIU, G.; POIRIER, P.; EL ALAOUI, H.; DELBAC, F.; BOOROM, K.; DELHAES, L.; DEI-CAS, E.; VISCOGLIOSI, E. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. **Parasitol. Res.,** v. 106, p. 505-511, 2010.

SOUZA, S. L. P. **Caracterização genética de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana e animal**. 2007. 91 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; PENA, H. F. J.; FUNADA, M. R.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R. M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São

Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. **Vet. Parasitol.,** v. 149, p. 258-264, 2007.

STATISTICAL PACKAGE FOR SOCIAL SCIENCES. Disponível em: <http//:www.spss.com/statistics/>. Acesso em: 10 set. 2010. Versão 13.0 para Windows.

STARK, D.; VAN HAL S.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J.; HARKNESS, J. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. **Int. J. Parasitol.,** v. 37, p. 11-20, 2007.

STENSVOLD, C. R.; SURESH, G. K.; TAN, K. S.; THOMPSON, R. C.; TRAUB, R. J.; VISCOGLIOSI, E.; YOSHIKAWA, H.; CLARK, C. G. Terminology for *Blastocystis* subtypes--a consensus. **Trends Parasitol.,** v. 23, p. 93-96, 2007a.

STENSVOLD, C. R.; ARENDRUP, M. C.; JESPERSGAARD, C.; MØLBAK, K.; NIELSEN, H. V. Detecting *Blastocystis* using parasitologic, and DNA-based methods: a comparative study. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 59, p. 303–307, 2007b.

STENSVOLD, C. R.; NIELSEN, H. V.; MØLBAK, K.; SMITH, H. V. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. **Trends Parasitol.,** v. 25, p. 23-29, 2008.

STENSVOLD, C. R.; ALFELLANI, M. A.; NØRSKOV-LAURITSEN, S.; PRIP, K.; VICTORY, E. L.; MADDOX, C.; NIELSEN, H. V.; CLARK, C. G. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic, and zoo animals, and identification of a new subtype. **Int. J. Parasitol.,** v. 39, p. 473-479, 2009a.

STENSVOLD, C. R.; LEWIS, H. C.; HAMMERUM, A. M.; PORSBO, L .J.; NIELSEN, S. S.; OLSEN, K. E. P.; ARENDRUP, M. C.; NIELSEN, H. V.; MØLBAK, K. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors, and clinical significance of a common but neglected parasite. **Epidemiol. Infect.,** v. 137, p. 1655-1663, 2009b.

STENZEL, D. J.; BOREHAM, P. F. *Blastocystis hominis* revisited. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 9, p. 563-584. 1996. Review.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.,** v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, K. S. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 21, p. 639-665. 2008. Review.

TAN, T. C.; ONG, S. C.; SURESH, K. G. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. **Parasitol. Res.,** v. 105, p. 1283-1286, 2009.

TAN, K. S.; MIRZA, H.; TEO, J. D.; WU, B.; MACARY, P. A. Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. **Curr. Infect. Dis. Rep.,** v. 12, p. 28-35, 2010.

TANNER, S.; LEONARD, W. R.; MCDADE, T. W.; REYES-GARCIA, V.; GODOY, R.; HUANCA, T. Influence of helminth infections on childhood nutritional status in lowland Bolivia. **Am J Hum Biol,** 21(5):651-6, 2009.

TAPIRAPÉ, K. E. **A Importância das palmeiras na confecção e arte para o povo Tapirapé.** 2006. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) (3.º Grau Indígena), Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT. Barra do Bugres-MT. 2006.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOODHOUSE, M. E. Risk factors for human disease emergence. **Philos. Trans. R. Soc. London. B. Biol. Sci.,** v. 356, p. 983-989, 2001.

THOMPSON R. C. The zoonotic significance and molecular epidemiology *Giardia* and giardiasis. **Vet. Parasitol.,** v. 126, p. 15-35, 2004.

THOMPSON, R. C.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. **Vet. Parasitol.,** v. 182, p. 70-78, 2011.

TOLEDO, M. J. O.; PALUDETTO, A. W.; MOURA, F. T.; NASCIMENTO, E. S.; CHAVES, M.; ARAÚJO, S. M.; MOTA, L. T. Evaluation of enteroparasite control activities in a Kaingáng community of Southern Brazil. **Rev, Saúde Pública,** v. 43, p. 981-990, 2009.

TORGERSON, P. R.; MACPHERSON, C. N. L. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. **Vet. Parasitol.,** v. 182, p. 79-95, 2011.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **State of the World's Children Report,** New York, p. 8, 2007.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; MARTI, H. P.; TANNER, M.; LENGELER, C. Intestinal amoebiasis, giardiasis and geohelminthiases: their association with other intestinal parasites and reported intestinal symptoms. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,** v. 93, p. 137-141, 1999.

VELASCO, J.; GONZÁLEZ, F.; DÍAZ, T.; PEÑA-GUILLÉN, J.; ARAQUE, M. Profiles of enteropathogens in asymptomatic children from indigenous communities of Mérida, Venezuela**. J. Infect. Dev. Ctries.,** v. 5, p. 278-285, 2011.

VERONESI, F.; PASSAMONTI, F.; CACCIÒ, S.; DIAFERIA, M.; PIERGILI FIORETTI, D. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. **Zoonoses Public Health,** v. 57, p. 510-517, 2010.

VIANNA, E. N.; COSTA, J. O.; SANTOS, C. K.; CURY, M. C.; SILVA, E. F.; COSTA, A. O.; GOMES, M. A. An alternative method for DNA extraction and PCR identification of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. **Parasitology,** v. 136, p. 765-769, 2009.

VIEIRA, G. O. **Enteroparasitoses em Populações Indígenas no Brasil: Uma Revisão Sistemática da Literatura Científica.** 2003. 75 f. Dissertação (Mestrado

em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

VOLOTÃO, A. C.; COSTA-MACEDO, L. M.; HADDAD, F. S.; BRANDÃO, A.; PERALTA, J. M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Trop.,** v. 102, p. 10-19, 2007.

VOLOTÃO, A. C.; RAMOS, N. M.; FANTINATTI, M.; DE MORAES, M. V.; NETTO, H.A.; STORTI-MELO, L. M.; DE GODOY, E. A.; ROSSIT, A. R.; FERNANDES, O.; MACHADO, R. L. Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.,** v. 15, p. 382-383, 2011.

WAGLEY, C. **Lágrimas de boas vindas:** os índios Tapirapé do Brasil Central. Belo Horizonte/São Paulo, Itatiaia/Edusp (Reconquista do Brasil, 2. série, vol. 137), 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Iron deficiency anaemia:** assessment, prevention, and control. A Guide for Programme Managers. Geneva. WHO. 2001. p. 114.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Generic protocols. (i) hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis in children and (ii) a community-based survey on utilization of health care services for gastroenteritis in children. Field test version, WHO. 2002. p. 67.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Geneva.** Disponível em: <http://www.who.int/hhr/activities/indigenous_peoples/en/index.html/>. Acesso em: 23 set. 2011.

WHIPPS, C. M.; BOOROM, K.; BERMUDEZ, L. E.; KENT, M. L. Molecular characterization of *Blastocystis* species in Oregon identifies multiple subtypes. **Parasitol. Res.,** v. 106, p. 827-832, 2010.

WONG, K. H. S.; NG, G. C.; LIN, R. T. P.; YOSHIKAWA, H.; TAYLOR, M. B.; TAN, K. S. W. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. **Parasitol. Res.,** v. 102, p. 663-670, 2008.

YANG, R.; REID, A.; LYMBERY, A.; RYAN, U. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish. **Int. J. Parasitol.,** v. 40, p. 779-785, 2010.

YEE, J.; DENNIS, P. P. Isolation and characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **J. Biol. Chem.,** v. 267, p. 7539-7544, 1992.

YOSHIKAWA, H.; WU, Z.; KIMATA, I.; ISEKI, M.; HOSSAIN, I. K. M. D. A. M. B.; ZAMAN, V.; HAQUE, R.; TAKAHASHI, Y. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. **Parasitol. Res.,** v. 92, p. 22-29, 2004.

YOSHIKAWA, H.; WU, Z.; PANDEY, K.; PANDEY, B. D.; SHERCHAND, J. B.; YANAGI, T.; KANBARA, H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. **Vet. Parasitol.,** v. 160, p. 295-300, 2009.

ZEVALLOS, K.; VERGARA, K. C.; VERGARA, A.; VIDAL, C.; GARCIA. H. H.; EVANS, C. A. Tuberculin skin-test reactions are unaffected by the severity of hyperendemic intestinal helminth infections and co-infections. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 83, p. 319-325, 2010.

ZONTA, M. L.; OYHENART, E. E.; NAVONE, G. T. Nutritional status, body composition, and intestinal parasitism among the Mbyá-Guaraní communities of Misiones, Argentina. **Am. J. Hum. Biol.,** v. 22, p. 193-200, 2010.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Por favor, leia as informações e discuta com quem desejar. Pergunte-me se houver algo que não esteja claro ou caso queira mais informações.

PROJETO "OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS INTESTINAIS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO ENTRE OS ÍNDIOS TAPIRAPÉ HABITANTES DA AMAZÔNIA MATO-GROSSENSE, BRASIL".

Coordenador: Prof. Antonio Francisco Malheiros – Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT (Departamento de Ciências Biológicas), Av. São João, S/Nº – Bairro Cavalhada – CEP: 78200-000 – Cáceres-MT. Tels: 065-3221-0507 e (65) 9903-5001 (Celular).

Data:

1. Qual é o objetivo da pesquisa?

É conhecer melhor os problemas de saúde da comunidade Tapirapé e assim contribuir para a melhoria da saúde a diagnosticar, tratar e evitar surtos de diarréia.

2. Por que eu fui escolhido?

Escolhi a aldeia Tapi'itãwa porque além de conhecer os professores e moradores através dos cursos 3º Grau indígena e do ensino médio, foi para atender um pedido de alguns professores e agentes de saúde Tapirapé em relação aos problemas diarréicos na comunidade.

3. No projeto haverá participação de algum membro da comunidade Tapirapé?

Sim! O Prof. Kamoriwa'i Elber Tapirapé é um dos autores da pesquisa. Haverá também a participação dos agentes, auxiliares indígenas durante a pesquisa.

4. Quais doenças vocês estão pesquisando?

Doenças que sem tratamento podem ser graves e que surgem nas fezes:

4.1. Transmitidas pela água poluída e alimentos contaminados:

- Verminoses (pessoa fica mal nutrida e com dor de barriga).
- Diarréia aguda (fezes líquidas ou meio líquidas com pelo menos três evacuações num só dia).

5. Sou obrigado a participar da pesquisa?

Não! Você é livre para decidir e para retirar seu consentimento a qualquer tempo, sem se justificar e sem que isso afete os cuidados dos pesquisadores com sua saúde ou seu relacionamento com eles.

6. Se eu aceitar, o que tenho que fazer?

Realizaremos exame de fezes nos velhos, adultos e crianças.

7. Quais os riscos para quem participar?

Você terá apenas o desconforto de colocar um pouco de fezes num potinho, lavar as mãos e entregar o potinho para os profissionais da saúde. Além disso, precisará responder algumas

perguntas, mas caso não se sinta bem respondendo poderá desistir sem a necessidade de dar explicações e sem que isso afete o seu bom relacionamento com os pesquisadores. O trabalho será feito por pessoas experientes.

8. Quais benefícios para quem participar?

Os exames servem para você saber qual doença você tem e assim fazer o tratamento correto. Os treinamentos e oficinas servirão para levar aos índios as informações necessárias para evitar diarréia. Se algum índio ficar doente vamos tentar diagnosticar, mesmo que não seja um caso de diarréia.

9. E se eu quiser fazer alguma reclamação?

Na improvável situação de você ou suas crianças se sentirem prejudicados poderão protestar. O coordenador da pesquisa – Prof. Malheiros - pode dar informações sobre o projeto. A FUNAI e FUNASA poderão auxiliá-los a manifestar alguma reclamação, caso tiverem.

10. Minha participação nesse estudo será confidencial?

Sim. Todas as informações sobre você ou seus familiares nesta pesquisa serão confidenciais e usadas apenas para análise dos resultados. Seu nome ou de seus familiares não serão revelados fora das instituições de pesquisa.

11. Quem está coordenando e quem financia a pesquisa?

O professor Malheiros é coordenador do projeto de pesquisa juntamente com uma equipe formada por diversos profissionais da saúde. O recurso é de um órgão do Estado de Mato Grosso chamado FAPEMAT que incentiva profissionais a colaborarem e fortalecerem com a pesquisa em diversas regiões do estado.

12. O que será feito com o material (fezes) coletado na aldeia?

As amostras de fezes frescas serão examinadas em Confresa. As fezes conservadas serão analisadas pelo Instituto Evandro Chagas – IEC, SVS, na cidade de Belém no Estado do Pará, pois possui laboratório de referência. As amostras de fezes coletadas na pesquisa ficarão depositadas no Instituto Evandro Chagas - IEC.

13. Será feito outro exame além do de fezes?

Somente quando o médico diagnosticar doentes na aldeia.

14. Qual (ais) poderá (ão) ser?

Exame de sangue ou pele se a pessoa tiver uma ferida.

15. Como obter mais informações?

Com o professor Malheiros (0-XX-65-9903-5001).

Nome completo: Antonio Francisco Malheiros

Endereço: Rua Porto Carreiro, 1013 – Bairro Cohab Velha – Cáceres-MT. CEP: 78200-000

16. Se eu concordar em participar ou que minhas crianças participem, o que devo fazer?

Neste caso lhe será pedido que assine este termo de consentimento livre e esclarecido. Você também será convidado a assinar um termo para cada menor sob a sua responsabilidade que você concorde que participe do estudo. Leia abaixo!

Nome / sexo / idade:

Aldeia:

Para autorizar a SUA PARTICIPAÇÃO marque com um "X" se concordar com os termos

1. **PARTICIPAÇÃO DE ADULTO:** Confirmo que li e/ou entendi as informações sobre o estudo no **termo de consentimento livre e esclarecido**. Tive oportunidade de fazer perguntas, por isso concordo em participar da pesquisa. ☐

2. **PARTICIPAÇÃO DE CRIANÇA:** Confirmo que li e/ou entendi as informações sobre o estudo no **termo de consentimento livre e esclarecido** e tive oportunidade de fazer perguntas, por isso concordo que o menor, cujo nome está citado acima, participe da pesquisa. ☐

Nome da pessoa que consente	Assinatura
Nome da pessoa que obteve o consentimento	Assinatura

Testemunhas (quando o indivíduo não puder assinar seu nome ou usar digital):

Testemunha 1 (nome/assinatura)	Testemunha 2 (nome/assinatura)

ANEXO B

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
PROGRAMA "BIOLOGIA DA RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO"
PROJETO "OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS INTESTINAIS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO ENTRE OS ÍNDIOS TAPIRAPÉ HABITANTES DA AMAZÔNIA MATO-GROSSENSE, BRASIL".

Ficha Preliminar de Inquérito-clínico*

Etnia: Tapirapé – Terra Indígena Tapí'itãwa – Município de Confresa-MT

Data de entrada: _____/_____/_____ (dia/mês/ano)

Informações do paciente
Nome da família: _____ Primeiro nome: _____
Terra Indígena:_____ Aldeia: _____
Cidade: _____ Estado: _____
Idade (incluindo o mês): _____
Data de nascimento____/____/____ (dia/mês/ano) Sexo: M F ☐ ☐

Informações Clínicas
Dor abdominal _____ (Sim/Não) _____ Duração (dias):_____
Diarréia: _____ (Sim/Não) Quantas vezes no dia: _____ Duração (dias): _____

Informações laboratoriais
Data da coleta: _____/_____/_____ (dia/mês/ano)

Parasitas identificados na amostra? _____ (Sim/Não)
Se "Sim", Quais Parasitas? _____

Para Rotavírus, por favor, complete o que se segue:

Rotavírus identificados na amostra? _____ (Sim/Não)
Se "Sim", por qual método?_____
Qual era o G-sorotipo (se sabido)? _____

Possui animais? Quais? _____ **Quantos?** _____
De onde vem a água que vocês usam? ( ) Rio ( ) Poço
Existe tratamento de água? ( ) Sim ( ) Não **Lava os alimentos** ( ) Sim ( ) Não
Alimenta usando? ( ) Mãos ( ) Colher ( ) Garfo **Lava as mãos?** ( ) Sim ( ) Não
Local onde você defeca? ( ) Vaso ( ) Fossa ( ) Mata ( ) Rio/córrego ( ) Terreiro

Dados do entrevistador:
Nome: _____Assinatura: _____

Data do relatório: _____/_____/_____ (dia/mês/ano)

Adaptado de WHO, 2002

ANEXO C

PROJETO "OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS INTESTINAIS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO ENTRE OS ÍNDIOS TAPIRAPÉ HABITANTES DA AMAZÔNIA MATO-GROSSENSE, BRASIL".

FOLHA DE RESULTADO - PARASITOLOGIA

DATA: _____/_____/_____ **ALDEIA:**_____ **ANALISTA:**_____

Casa	Nº	Nome	Consistência	Aspecto	Hoffman	Ritchie	Crypto	Rota	Aden
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					
			( ) formada ( ) pastosa ( ) cíbalos ( ) diarreica	( ) normal ( ) sanguinol. ( ) mucosa ( )mucosang					

ANEXO D

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
PROGRAMA "BIOLOGIA DA RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO"
PROJETO "OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS INTESTINAIS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO ENTRE OS ÍNDIOS TAPIRAPÉ HABITANTES DA AMAZÔNIA MATO-GROSSENSE, BRASIL".

PROTOCOLO PARA TRATAMENTO DE PARASITOSES INTESTINAIS

Relação dos antiparasitários com as respectivas dosagens (Continua)

Parasitose	Droga	Dose
Giardïase	Metronidazol # Tinidazol Secnidazol Albendazol Furazolidona	20mg/kg/dia por 7 dias (2 doses/dia) 50mg/kg dose única 30mg/kg dose única 400mg/dia por 5 dias - dose única/dia (alto custo) 7 mg/Kg/dia por 7 dias de 12/12 horas
Isosporíase	Sulfa-trimetoprim	10 mg/Kg/dia de trimetroprim (4 doses/dia) por 21 dias
Amebíase	Metronidazol# Tinidazol Secnidazol	30 mg/Kg/dia, por 7 dias 50mg/kg/dia (por 2-5 dias - 1 dose/dia) (30mg/kg/dia dose única)
Balantidíase	Metronidazol	30-50 mg/Kg/dia por 7 a 10 dias
Ascaridíase	Mebendazol Albendazol Levamisol Ivermectina# Pamoato de pirantel Piperazina	100 mg de 12 em 12 horas, por 3 dias (primeira escolha) 400 mg , dose única (em maiores de 2 anos) 80 mg (< 7 anos) e 150 mg (> 7 anos) 200 microgramas/kg (dose única) 10mg/kg - dose única 25mg/kg (até 2,5g) em 3 doses/dia por 7 dias
Estrongiloidíase	Tiabendazol Albendazol Cambendazol Ivermectina#	50 mg/kg/dia, dose única ou 20 a 30 mg/Kg/dia, por 3 dias 400 mg/dia por 3 dias 5mg/kg em dose única 150-200 microgramas/kg em dose única (200 µg = 0,2mg)
Ancilostomíase	Mebendazol Albendazol	100 mg de 12/12 dias, por 3 dias (primeira escolha) 400 mg/dose única
Teníase	Prazinquantel* Albendazol# Mebendazol# Niclosamida	10 a 20 mg/Kg em 1 dose/dia, por 4 dias 400 mg/dia por 3 dias 200 mg de 12/12 h, por 3 dias < 35 Kg – 1 g (em jejum), em dose única > 35 Kg – 2 g (primeira escolha)

Relação dos antiparasitários com as respectivas dosagens (Conclusão)

Parasitose	Droga	Dose
Himenolepíase	Prazinquantel# Niclosamida	25 mg/Kg/dose única dose igual à teníase – durante 5 dias
Tricocefalíase	Mebendazol Albendazol Ivermectina (associado albendazol)#	100 mg de 12/12 h por 3 dias (primeira escolha) 400 mg/dose única 200 microgramas/kg, em dose única + (albendazol)
Oxiuríase	Mebendazol# Albendazol# Pamoato de pirvínio	100 mg em dose única. Repetir com 14 dias 400 mg/dose única 10mg/kg em dose única
Ciclosporíase (em imunossuprimidos)	Sulfametoxazol-trimetroprim	10 mg/Kg/dia de trimetroprim (4 doses/dia) durante 7 dias
Microsporíase (não auto-limitada)	Albendazol	400 mg (2 vezes/dia) por várias semanas até melhora do quadro
Blastocistose (em imussuprimidos)	Metronidazol	30-50 mg/Kg/dia por 7 a 10 dias
Criptosporidiose	Nitazoxanida, Azitomicina ou paromomicina	500 mg (2 vezes/dia) durante 3 dias.

*No tratamento de cisticercose cerebral a dose é de 15-20 mg/Kg, 3 vezes por dia, por 14 a 21 dias, associada com dexametasona.
#Consideramos com primeira escolha.
FONTE: Modificado de Mota, J.A.C. et al., In: Pediatria Ambulatorial 5 ed. Ed COOPMED, 2004.

Infecções pelos protozoários *Cryptosporidium parvum, Isospora belli, Cyclospora cayetanesis*, Microsporídeos e *Blastocystis hominis* têm sido encontrados em pacientes imunocomprometidos.

Existe uma preocupação por parte de muitos autores quanto ao tratamento do T. trichiuria devido à baixa eficácia das drogas, com uma não resposta ao tratamento com o mebendazol em alguns casos. Indicamos a associação do albendazol com a ivermectina, o que propicia um aumento da taxa de cura para 79,3% e a redução da eliminação de ovos para 93,8%.

TRATAMENTO DE PARASITOSES INTESTINAIS DURANTE A GESTAÇÃO

A validade do tratamento de enteroparasitoses durante a gravidez é questão que sempre suscita dúvidas e controvérsias. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2001), deve-se evitar tal procedimento pelo menos durante o primeiro trimestre da gestação, ocasião em que o feto seria mais suscetível à teratogênese.

Concordamos com este procedimento, todavia, julgamos ser mais prudente evitar o uso de medicamentos antiparasitários durante a gravidez, se não houver risco de ocorrência de agravos para a gestante em decorrência da infecção parasitária.

OUTROS PARASITAS INTESTINAIS NÃO-PATOGÊNICOS

Diversas outras espécies de enteroprotozoários são freqüentemente diagnosticadas quando se realizam exames parasitológicos de fezes (*Entamoeba coli, Endolimax nana, Iodamoeba butschlii, Chilomastix mesnilli, Trichomonas hominis*), não necessitando de tratamento, pois atuam como comensais, não apresentando patogenicidade.

Demonstrativo da eficácia dos antiparasitários

Infecção	Mebendazol	Albendazol	Pamoato de Pirantel	Levamisol	Tiabendazol	Praziquantel	Ivermectina
Ascaridíase	> 85%	> 85%	> 85%	> 85%	60 a 85 %	Não atua	100%
Necatoríase	>85%	>85%	60 a 85 %	60 a 85%	60 a 85%	Não atua	Não atua
Estrongiloídiase	<50%	<50%	Não atua	< 50%	> 85%	Não atua	95%
Tricuríase	60 a 85%	43 a 85%	Não atua	Não atua	< 50%	Não atua	> 79 % #
Enterobiose	>85%	>85%	> 85%	Não atua	> 85%	Não atua	Atua*
Teníase e Himenolepíase	Atua *	Atua *	Não atua	Não atua	Não atua	Atua *	Não atua

Ação, efeitos colaterais, e cuidados no uso de antiparasitários (Continua)

Antiparasitários	Ação	Efeitos colaterais	Observações
Mebendazol	Ovicida, larvicida, vermicida	Leves e transitórios: dor abdominal, náuseas, vômitos, diarréia , constipação, tontura ou vertigem, febre, prurido, exantema, graus variados de disfunção hepática quando se usam doses elevadas e neutropenia reversível.	Contra-indicado em gravidez e lactação. O uso concomitante da cimetidina leva a aumento do nível sérico. O uso simultâneo com carbamazepina e hidantoína diminui o seu efeito terapêutico.
Albendazol	Vermicida, ovicida e larvicida	Raros. Desconforto abdominal, náuseas, vômitos, diarréia, constipação, boca seca, cefaléia, exantema e prurido.	Não deve ser usado em menores de 2 anos, em grávidas ou durante lactação.
Tiabendazol	Vermicida	Freqüentes. Sonolência, fadiga, cefaléia, congestão nasal, rubor facial, prurido, anorexia, náuseas, vômitos, intolerância gástrica, linfadenomegalia, exantema e odor característico na urina. Raros: visão turva, irritabilidade, enurese, entorpecimento, hipotensão, colestase, hiperglicemia e leucopenia transitória.	Contra-indicada durante lactação e gravidez. Em pacientes com disfunção renal pode ocorrer cristalúria e hematúria.

Ação, efeitos colaterais, e cuidados no uso de antiparasitários (Conclusão)

Antiparasitários	Ação	Efeitos colaterais	Observações
Ivermectina	Paralisia dos vermes.	Pouco freqüentes. Prurido, linfadenomegalia. Raros: náuseas, vômitos, cefaléia, eosinofilia e aumento de transaminases de forma transitória. Sintomas graves, muito raros: febre, hipotensão, aumento da freqüência cardíaca.	Contra-indicada em crianças menores de 5 anos, lactantes e gestantes. Deve ser evitado em pacientes com alteração da membrana meníngea. Usar com cautela em pacientes que usem medicamentos que levam à depressão do SNC.
Levamizol	Paralização dos vermes, com conseqüente eliminação	Boa tolerância, mas pode ocorrer febre, insônia, fadiga, confusão mental, palpitações, náuseas, diarréia, vômitos, dor abdominal, cefaléia, lacrimejamento, tontura ou vertigem	Não deve ser usado em lactantes e gestantes. (Conclusão)
Cambendazol	Age nas formas imaturas dos vermes	Passageiros: tontura, cefaléia, náuseas, vômitos, diarréia e dor epigástrica.	Contra-indicações: menores de 2 anos, grávidas, lactentes, pacientes com úlceras gastroduodenais, hepatopatias e insuficiência renal.
Pamoato de Pirantel	Paralisa o verme, que conseqüentemente é eliminado.	Pouco freqüentes. Cefaléia, tonturas, sonolência, anorexia, náuseas, vômitos, diarréia, dor abdominal e exantema.	Contra-indicaçòes: menores de 2 anos, gestantes, pacientes com disfunção hepática prévia.
Piperazina	Paralisa o verme , que conseqüentemente é eliminado.	Raros. Náuseas, vômitos, diarréia, reações alérgicas. Em pacientes com insuficiência renal pode levar à fraqueza, incoordenação motora, vertigem, confusão mental e contrações mioclônicas. Em pacientes predispostos pode induzir à convulsões.	Deve ser evitado em pacientes nefropatas ou com história de convulsões prévias.
Prazinquantel	Leva à lise do parasita	Relacionadas à altas doses. Tontura, cefaléia, fraqueza, dor abdominal, náusea. Menos freqüentes: fadiga, diarréia, febre, urticária, prurido, sudorese, exantema, aumento das transaminases.	Contra-indicados em gestantes, lactantes,cardiopatas, hepatopatas, nefropatas.
Pamoato de pirvínio	vermicida	Bem tolerado. Raros: fotossensibilidade, reações alérgicas, náuseas, vômitos, dor abdominal e diarréia.	Contra-indicação: gestação e lactantes.
Niclosamida	Vermicida	Em cerca de 10%: fraqueza, dor abdominal, náuseas.	Contra-indicação: gestantes e lactantes.
Metronidazol	Parasiticida	Náuseas, cefaléia, vômitos, dor abdominal, gosto metálico, diarréia, glossite, estomatite, reação de hipersensibilidade. Raramente: encefalopatia, convulsão, a	Lactação, hipersensibilidade droga, primeira trimestre gravidez.

		incoordenação, efeitos neurológicos, ataxia.	
Secnidazol	Parasiticida	Náuseas, epigastralgia, alterações do paladar (gosto metálico), glossite, estomatites, erupções urticariformes. Menos frequente: ataxia,vertigens,parestesias, incoordenação.	Distúrbios neurológicos antecendentes de discrassanguinea.

FONTE: modificado de Cook, 1986

* apesar de ser eficaz, não está ainda estabelecida a porcentagem de cura.

Associado ao Albendazol.

Disponível em: www.smp.org.br

ANEXO E

Artigo publicado em revista científica

De: <ajtmh@hotmail.com>
Para: <malheiros@unemat.br>; <afmalheiros@usp.br>
Assunto: American Journal of Tropical Medicine & Hygiene - AJTMH-11-0481.R1
Data: domingo, 28 de agosto de 2011 18:10

28-Aug-2011
To: Dr. ANTONIO MALHEIROS
RE: AJTMH-11-0481.R1, Molecular Characterization of Blastocystis Obtained from Members of the Indigenous Tapirapé Ethnic Group from the Brazilian Amazon Region, Brazil by MALHEIROS, ANTONIO; Stensvold, Christen; Clark, Graham; Braga, Guilherme; Shaw, Jeffrey

Dear Dr. MALHEIROS:

On behalf of Dr. Joseph Vinetz I would like to thank you for submitting your manuscript to the American Journal of Tropical Medicine & Hygiene. Your manuscript has been accepted for publication.

Please be sure that you have sent in your signed copyright form, which can be located on the journal's submission site (http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh) under the link to "Instructions and Forms" and that all authors have sent in a signed statement indicating participation in the study and acceptance of the original submission and subsequent revisions submitted by you. We will NOT send your manuscript to press until these items have been received and will let you know if any of these items are missing from your file.

We will contact you if questions arise during the copyediting process. Otherwise, you can expect to receive your galley proofs by email within the next six to eight weeks. Please be sure to return your corrected galley proofs, page charge form, and reprint order form (if you wish to purchase reprints) within 48 hours of receiving your galley proofs.

Sincerely,
Laura Buckley
Editorial Assistant
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
ajtmh@hotmail.com

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

Molecular Characterization of *Blastocystis* Obtained from Members of the Indigenous Tapirapé Ethnic Group from the Brazilian Amazon Region, Brazil

Journal:	American Journal of Tropical Medicine & Hygiene
Manuscript ID:	AJTMH110481.R1
Manuscript Type:	Short Report
Date Submitted by the Author:	17Aug2011
Complete List of Authors:	MALHEIROS, ANTONIO; MATO GROSSO STATE UNIVERSITY, BIOLOGY; UNIVERSITY OF SÃO PAULO, PARASITOLOGY Stensvold, Christen; Statens Serum Institut, Department of Bacteriology, Mycology and Parasitology Clark, Graham; London School of Hygiene and Tropical Medicine, Faculty of Infectious and Tropical Diseases Braga, Guilherme; University of São Paulo, Department Medicine Veterinary Preventive and Animal Health Shaw, Jeffrey; University of Sao Paulo, Parasitology
Key Words:	Parasitology, Molecular epidemiology, Tropical Medicine, Diagnostics

For Peer Review

LRH: MALHEIROS AND OTHERS

RRH: BLASTOCYSTIS SUBTYPES IN INDIGENOUS BRAZILIANS

TITLE

Molecular Characterization of *Blastocystis* Obtained from Members of the Indigenous Tapirapé Ethnic Group from the Brazilian Amazon Region, Brazil

AUTHORS

Antonio F. Malheiros*, C. Rune Stensvold, C. Graham Clark, Guilherme B. Braga, and Jeffrey J. Shaw.

AFFILIATIONS

Department of Biology, Department of Nursing, Mato Grosso State University, Cáceres, Mato Grosso, Brazil; Department of Microbiological Diagnostics, Statens Serum Institut, Copenhagen S, Denmark; Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom; Department Medicine Veterinary Preventive and Animal Health, São Paulo University, São Paulo, Brazil; Department of Parasitology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

A total of 382 stool samples were examined during a survey of intestinal parasites in members of the Tapirapé ethnic group, who live in the Brazilian Amazon region of Mato Grosso. Fecal DNAs from *Blastocystis*-positive samples were extracted, PCR amplified using *Blastocystis*-specific primers targeting the small subunit rRNA gene, and sequenced. Three subtypes (STs) were identified: ST1 (41%), ST2 (32%), and ST3 (17%). Seven mixed infections were found (11). The subtype distribution was markedly different from that reported in Europe in that ST4 was not detected and ST3 was not the most common subtype. This study is the first to include molecular characterization of *Blastocystis* in Brazil and in indigenous communities from Latin America.

Blastocystis is a very common parasitic protist found in humans and a large variety of other animals.[1-3] Numerous epidemiological surveys carried out in different countries report *Blastocystis* as the most common eukaryotic organism in human fecal samples,[4] but the prevalence of *Blastocystis* infection in humans is still unknown in many parts of the world. The role of *Blastocystis* as a cause of diarrhea or other symptoms is controversial since it can be found in both symptomatic and asymptomatic individuals.[2]

Morphological identification of *Blastocystis* is challenging[5] and traditional diagnostic methods differ significantly in their diagnostic sensitivity.[6] PCR amplification of *Blastocystis* DNA from cultures or feces is probably the most sensitive detection method and also enables molecular characterization.[7-10]

Blastocystis exhibits extensive genetic diversity and comprises at least 13 subtypes (STs), 9 of which have been found in humans.[9, 11-13] On a global scale, ST3 appears to be the most common subtype found in humans, followed in prevalence by ST1, ST2, and ST4.[2] ST5-ST9 have a more sporadic occurrence and may be of zoonotic origin[12,14]; human infection with ST6 and ST7 appears to be more common in certain countries, such as Japan.[15,16]

The background prevalence of *Blastocystis* in Brazilian indigenous populations has been determined by direct examination of fecal samples on only two previous occasions,[17,18] and nothing is known about the subtype distribution of *Blastocystis* in these cohorts. The only published study on *Blastocystis* subtypes in Latin America, a region inhabited by >500 million people, was performed on only 12 isolates from Colombia.[19] The aim of this study was to genetically characterize *Blastocystis* from inhabitants of six indigenous Indian communities in the Brazilian Amazonia, and to compare the subtypes present with those found in other countries.

The study was carried out in the Tapirapé community, situated 30 km from the Confresa municipality, state of Mato Grosso, Brazil (Fig. 1). The indigenous reserve is located in Legal Amazonia and inhabited by 542 members of the Tapirapé ethnic group. The members of this tribe have many free roaming animals including dogs, cats, chickens, and pigs. The principal source of protein for this population is derived from fishing and hunting animals such as the paca, agouti, anteater, tortoise, capuchin monkey, deer, armadillo, tapir, mallard, and curassow. Piped water is drawn from nearby rivers and is delivered to every household, but it is neither filtered nor chlorinated. There is a general lack of adequate sanitation; only 1 public latrine is available for the entire village, and this, however, is not used by all the villagers.

A total of 382 fecal specimens (210 from females and 172 from males) were collected during January and February 2010 and examined by light microscopy (x400) of concentrates obtained by the techniques of Hoffman and Ritchie.[20-23] The consistency (formed, soft, loose, and watery) of all fecal samples was noted on collection. Demographic data and clinical information were recorded for all members of the tribe. The research was approved by the Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, and consent was obtained from all human adult participants and from parents or legal guardians of minors according to National Committee for Ethics in Research (CONEP-120/2008).

Part of each microscopy-positive stool samples was preserved in 70% ethanol for subsequent DNA extraction and molecular analysis. Samples were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) before extraction using the QIAamp™ DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the recommendations of the manufacturer, except that DNAs were eluted in 100 μL AE buffer.

PCR and sequencing were performed as previously described [7], and sequences edited with Chromas version 2.33 (Technelysium Pty. Ltd., Australia) were individually compared with *Blastocystis* SSU-rRNA gene sequences available in GenBank using the BLAST algorithm. Subtypes were identified by determining a match or closest similarity to all known *Blastocystis* subtypes.[9] Mixed subtype infections were identified by the presence of double peaks in semi-conserved gene areas.[6]

Demographic, such as age and gender, clinical, such as stool consistency and abdominal pain, and parasitological data were analysed statistically using the Pearson chi-square test, in the cases with an expected count of <20, and Fisher Exact test, when the expected count was >20 (2-sided). We considered p values lower than 0.05 to be statistically significant.

Overall, 382 individuals from six indigenous villages were enrolled of whom 80 (21%) were positive for *Blastocystis* based on microscopy of fecal concentrates, 66 of which were confirmed by PCR. *Blastocystis* was more common in males than females ($p < 0.05$), and being less than 15 y of age was associated with positivity for *Blastocystis* ($p < 0.03$).

Of 66 *Blastocystis* infections confirmed by PCR, sequences revealed single subtype infections in 59 cases and mixed subtype infections in 7 cases (Table 1). ST1 was the predominant subtype, colonizing 27 individuals (41%), followed by ST2 in 21 individuals (32%), and ST3 in 11 (17%). Mixed infections consisting of ST1 and ST2 were seen in five individuals, ST1 and ST3 in one individual, and ST2 and ST3 in another individual.

Among the 66 cases, 28 individuals had abdominal pain. 11 of the latter had ST1, 10 had ST2, five had ST3, and 2 had a mixture of ST1 and ST2; there was no

statistically significant association between *Blastocystis* STs and abdominal pain ($p > 0.05$). Likewise, no significant associations were found between infection with any of the observed *Blastocystis* subtypes and stool consistency, between gender and subtypes, or between age and subtypes (all $p > 0.05$).

An important step in understanding the geographical distribution of genetically distinct variants of *Blastocystis* was the adoption in 2007 of a standard nomenclature.[9] Since then the most common subtype has proven to be ST3, followed by ST1, ST2, and ST4.[4,12] Unlike almost all previously reported studies, the dominant subtype in the present study was ST1 (41%), followed by ST2 (32%) and ST3 (17%). However, ST4, which has been recorded in studies from Europe and North America as well as some regions of Asia, was not detected in the Tapirapé Indian samples or, incidentally, in the small study of Colombian samples.[19] Assuming the subtype distribution identified in the present study and the Colombian samples[19] is representative for Latin American *Blastocystis*, why is ST4 relatively prevalent throughout Europe and North America but absent in this and most other parts of the world? Further studies are needed to answer this and other questions involving the epidemiology of *Blastocystis* in Latin America, but the distribution of subtypes could be linked to the ethnic origin of the infected population, because there is little contact between indigenous groups and people in other communities.

Our subtyping results corroborate other studies in tropical developing countries. In Thai school children, 77.9% were infected with ST1 and 22.1% with ST2.[24] ST1 was found in the school's water supply. In water treatment plants in the Philippines *Blastocystis* was found in 23% of the influent water and 7% of the effluent water, showing that treatment was not eliminating *Blastocystis*.[25] Typing revealed ST1 and ST2 in both influent and effluent waters. As in these regions, one of the

most likely sources of infection in our Brazilian study area is the water, since there is no water treatment in the Tapirapé community, and it raises the question as to whether certain subtypes are more resistant to water. More data from other ethnic groups in Brazil living in different biomes are needed to investigate whether the dominance of ST1 is a regional phenomenon or is linked to populations with a particular ethnic/ecological background.

In our study, 11% of the infections were subtype mixtures in our study, which suggests either multiple sources of infection or one source containing multiple subtypes. This prevalence is similar to studies in China[26], Turkey[27,28], France[4], Denmark[2], and Egypt[29], and mixed infections were also seen in the Colombian samples.[19] The true prevalence of mixed infections is difficult to ascertain as detection is likely to depend on the method employed for subtyping[10].

Understanding the prevalence and genetic structure of intestinal parasites, such as *Blastocystis*, in endemic areas may contribute to a better understanding of the risk factors for infection in different ecological situations. Since *Blastocystis* is apparently transmitted fecal-orally and is very common, this parasite appears to be an appropriate indicator for the overall level of intestinal parasitism in different populations. Therefore, data on *Blastocystis* could be helpful in elaborating and evaluating intervention methods to reduce the burden of intestinal parasites.

This study of *Blastocystis* subtypes is only the second in Latin America but represents the first in Brazil and the first involving an indigenous community of Latin America.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mohammed Alfellani for his help in DNA extraction at the Department of Pathogen Molecular Biology, Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London.

Financial support: This research was financially supported by the Brazilian Ministry of Health – FUNASA, and the Brazilian Research Council - CNPq, FAPEMAT.

AUTHORS' ADDRESSES

Antonio F. Malheiros, Department of Biology, Department of Nursing, Mato Grosso State University, Cáceres, Mato Grosso, Brazil, E-mail: malheiros@unemat.br and afmalheiros@usp.br. C. Rune Stensvold, Department of Microbiological Diagnostics, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, DK-2300 Copenhagen S, Denmark, E-mail: run@ssi.dk. C. Graham Clark, Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, United Kingdom, E-mail: graham.clark@lshtm.ac.uk. Guilherme B. Braga, Department Medicine Veterinary Preventive and Animal Health, São Paulo University, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, Brazil, E-mail: guibraga@vps.fmvz.usp.br. Jeffrey J. Shaw and Antonio F. Malheiros, Department of Parasitology, São Paulo University, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, São Paulo, Brazil, E-mail: jayusp@hotmail.com.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Localization of the six indigenous villages, Confresa Mato Grosso, Brazilian Amazon, Brazil.

REFERENCES

1. Clark CG, 2000. Cryptic genetic variation in parasitic protozoa. *J Med Microbiol 49:* 489—491.
2. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KEP, Arendrup MC, Nielsen HV, Mølbak K, 2009. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors, and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect 137:* 1655—1663.
3. Tan KSW, Singh M, Yap EH, 2010. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep 12:* 28—35.
4. Souppart L, Sanciu G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E, Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E, 2009. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res 105:* 413—421.
5. Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, Chiodini PL, Edwards H, Köhler N, Gulletta M, Lebbad M, Manser M, Matthys B, N'Goran EK, Tannich E, Vounatsou P, Marti H, 2010. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. *Clin Microbiol Infect 16:* 267—273.
6. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen HV, 2007. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis 59:* 303—307.
7. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG, 2006. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist 157:* 77—85.

8. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC, 2006. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol 92:* 1081—1087.

9. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG, 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends Parasitol 23:* 93—96.

10. Meloni D, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Chabé M, Delhaes L, Dei-Cas E, Delbac F, Fiori PL, Cave DD, Viscogliosi E, 2011. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res* (in press). DOI 10.1007/s00436-011-2294-7.

11. Clark CG, 1997. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol Biochem Parasitol 87:* 79—83.

12. Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG, 2009. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol 39:* 473—479.

13. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RCA, 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol 169:* 8—17.

14. Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV, 2008. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends Parasitol 25:* 23—29.

15. Kaneda Y, Horiki N, Cheng X, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H, 2001. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *Am J Trop Med Hyg 65:* 393—396.

16. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Karim IKM, Hossain MB, Zaman V, Haque R, Takahashi Y, 2004. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res 92:* 22—29.

17. Aguiar JIA, Gonçalves AQ, Sodré FC, Pereira SR, Bóia MN, Lemos ERS, Daher RR, 2007. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev Soc Bras Med Trop 40:* 631—634.

18. Borges JD, Alarcón RSR, Neto VA, Gakiya E, 2009. Intestinal parasitosis in Indians of the Mapuera community (Oriximiná, State of Pará, Brazil): high prevalence of *Blastocystis hominis* and finding of *Cryptosporidium* sp. and *Cyclospora cayetanensis*. *Rev Soc Bras Med Trop 42:* 348—350.

19. Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R, 2010. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res 109:* 205—212.

20. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom V, Peres C, Lincicome DR, 1939. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J Parasitol 25:* 241—262.

21. Allen AVH, Ridley DS, 1970. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *J Clin Pathol 23:* 545—546.

22. Truant AL, Elliott SH, Kelly MT, Smith JH, 1981. Comparison of formalin-ethyl ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation and zinc sulfate

flotation techniques for detection of intestinal parasites. *J Clin Microbiol 13:* 882—884.

23. Zaman V, Khan KZ, 1994. A comparison of direct microscopy with culture for the diagnosis of *Blastocystis hominis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health 25:* 792—793.
24. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M, 2008. Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg 79:* 401—406.
25. Banaticla JE, Rivera WL, 2011. Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines. *J Water Health 9:* 128—137.
26. Li LH, Zhou XN, Du XW, Wang XZ, Wang LB, Jiang JY, Yoshikawa H, Steinmann P, Utzinger J, Wu Z, Chen JX, Chen SH, Zhang L, 2007. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol Int 56:* 281—286.
27. Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt Ö, Demirel M, 2008. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res 103:* 685—689.
28. Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, Araz E, Boorom K, 2009. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Mem Inst Oswaldo Cruz 104:* 724—727.
29. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, Alaoui HE, Delbac F, Boorom K, Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E, 2010. Subtype analysis of

Blastocystis isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res 106:* 505—511.

Figure 1.

51°40'0"W
51°30'0"W
51°20'0"W
51°10'0"W
51°0'0"W
10°30'0"S
10°40'0"S
10°50'0"S
11°0'0"S
CONFRESA
Santa Laura
Buriti II
Urubu Branco
SANTA TEREZINHA
Córrego da Onça
Sapeva
PORTO ALEGRE DO NORTE
Codebra
LUCIARA
Legend
Villages
Indian reservation
N
W
E
S
0 2.5 5 10 15 20
Km

Table 1. Number of infections with *Blastocystis* confirmed by PCR and *Blastocystis* subtype distribution among 382 indigenous people living in Tapirapé villages, Brazilian Amazon, Brazil.

Gender and age group	Microscopy-positive		Microscopy-negative	Total	*Blastocystis* sp. subtype						Total
	PCR-positive	PCR-negative			ST1	ST2	ST3	ST1/ST2	ST1/ST3	ST2/ST3	
Females (< 15 y old)	24	3	99	126	12	8	1	2	0	1	24
Males (<15 y old)	22	7	73	102	7	8	6	1	0	0	22
Females (>15 y old)	7	2	74	83	3	1	3	0	0	0	7
Males (>15 y old)	13	2	56	71	5	4	1	2	1	0	13
Total	66	14	302	382	27	21	11	5	1	1	66