



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

Thainá Valente Bertozzo

**Detecção e caracterização molecular de isolados de
Blastocystis sp., *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon
bieneusi* em amostras fecais humanas encaminhadas para
laboratório clínico de Bauru, São Paulo.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Semíramis Guimarães Ferraz Viana
Coorientadora: Profa. Dra. Érica Boarato David

**Botucatu
2020**

THAINÁ VALENTE BERTOZZO

**Detecção e caracterização molecular de isolados de *Blastocystis* sp.,
Dientamoeba fragilis e *Enterocytozoon bieneusi* em amostras fecais
humanas encaminhadas para laboratório clínico de Bauru, São Paulo.**

Orientadora: Profa. Dra. Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Co-orientadora: Profa. Dra. Érica Boarato David

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de Botucatu,
Unesp, para obtenção do título de
mestre em Doenças Tropicais.**

Botucatu - SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bertoazzo, Thainá Valente.

Detecção e caracterização molecular de isolados de *Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi* em amostras fecais humanas encaminhadas para laboratório clínico de Bauru, São Paulo / Thainá Valente Bertoazzo. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Coorientador: Érica Boarato David

Capes: 40101096

1. Técnicas de laboratório clínico. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. Fezes - Exame. 4. Parasitologia molecular.

Palavras-chave: *Blastocystis* spp.; Caracterização molecular; *Dientamoeba fragilis*; *Enterocytozoon bieneusi*; Laboratório clínico.

Thainá Valente Bertozzo

Caracterização molecular de isolados de *Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi* em amostras fecais humanas encaminhadas para laboratório clínico de Bauru, São Paulo.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Comissão examinadora

Prof(a). Dr(a) Ronalda Silva Araújo, CETESB

Prof(a). Dr(a) Simone Baldini Lucheis , APTA

Botucatu, 21 de fevereiro de 2020

Dedicatória

Aos meus pais, Lúcia Helena e José Luiz,

Pelo amor incondicional a mim dedicado, pelas sábias conversas, por todo apoio e compreensão. Por terem me dado a chance de estudar e por sempre alimentarem essa minha curiosidade que hoje se tornou amor pelo conhecimento. Por permitirem seguir meu sonho e mostrar que sempre tenho um lugar para qual retornar se preciso for.

À minha irmã Thaís,

Por ficar sempre ao meu lado, sempre me apoiar e me encorajar. Por me dar alguns choques de realidade de vez em quando. Por me ensinar que muitas vezes a maturidade não precisa vir acompanhada da idade.

Ao meu companheiro Víctor,

Por sempre me incentivar, por estar ao meu lado sempre. Pela paciência e pelo carinho e principalmente por acreditar em mim quando nem mesmo eu acredito. Por me ensinar que para todo trabalho bem feito são necessários momentos de diversão e de descanso.

Agradecimento especial

À Doutora Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Que confiou em mim para executar este projeto. Por ter me dado apoio, por me ensinar algo diferente todos os dias. Por todo conhecimento científico, pelas conversas incentivadoras e também pelas conversas descontraídas. Por me mostrar que uma orientadora pode desempenhar sua função com extrema competência e ética sem deixar de ser alegre e amiga. Mais que uma orientadora, tenho-te como exemplo.

Agradecimentos

Agradeço à Deus, pois sei que sem ele este trabalho não teria sido possível. Pela proteção que me deu durante esses dois anos todos os dias na estrada para poder realizar este sonho. Por me mostrar mais uma vez que toda ajuda sempre chega, basta ter fé.

À minha co-orientadora Érica Boarato por me acompanhar desde a graduação. Por confiar em mim e por me inserir no mundo acadêmico. Além de conhecimento, me ensinou valiosas lições, sempre mostrando uma generosidade imensurável. Tenho um sentimento de admiração e gratidão eterno por você.

À querida amiga de laboratório Ana Paula Oliveira Arbex, por me ensinar praticamente tudo em relação à prática laboratorial do meu projeto. Por ser tão doce e ser gentil, e por sempre me ajudar se fosse preciso. Sem dúvidas, foi essencial na execução deste trabalho.

Agradeço à minha família e amigos, que sempre estão por perto me fazendo sorrir, por me incentivarem e por torcerem por mim. Quero agradecer os colegas de carona, especialmente aos amigos Alan Baio, Seiji Fujimori e William Mendes por fazerem as viagens serem tão prazerosas e divertidas e por muitas vezes me proporcionar os melhores 'brainstormings' durante duas horas diárias; a companhia de vocês será definitivamente algo que

*sentirei muita falta. Obrigada ao **Luíz Sérgio Moura**, “Sérgião”, pelo apoio e companhia no início de minha trajetória.*

*Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, em especial à **Olga, Lucinete** “Dona Luci” e **Valdir** pela ajuda prestada e companhia.*

*À **UNESP** e à **Faculdade de Medicina de Botucatu** pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais. À seção técnica de Pós Graduação, em especial à **Bruna Quirino**. À biblioteca do campus pelo suporte técnico. À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxílio financeiro concedido. Ao núcleo de apoio à pesquisa da UNESP, ao professor **José Eduardo** pelo apoio estatístico e **Cassiano Victória** pelo georreferenciamento. Ao pessoal do **Laboratório de Análises Clínicas da Fundação Veritas**, da **Universidade do Sagrado Coração** pelo apoio na coleta e dados das amostras.*

*À todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho,
meu muito obrigada!*



“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo, nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos... E a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos. Siga em frente.”

Walt Disney 

RESUMO

A prevalência dos parasitas gastrointestinais *Blastocystis* sp, *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi* na população humana ainda é subestimada, já que frequentemente, a pesquisa desses parasitas não é incluída na rotina dos laboratórios clínicos. No presente estudo, objetivou-se detectar, caracterizar geneticamente e georreferenciar os isolados presentes em amostras de fezes submetidas para exame parasitológico em um laboratório clínico de Bauru. Amostras obtidas de indivíduos de ambos os sexos, com idades variando de 0 a ≥ 55 anos e procedentes de 16 municípios do estado de São Paulo foram submetidas à PCR e sequenciamento com base nos genes SSU rRNA de *Blastocystis* sp. e *D. fragilis* e ITS para *E. bieneusi*. Além da PCR/sequenciamento, o diagnóstico de *Blastocystis* sp. incluiu o exame microscópico de fezes. De 348 amostras, 8 (2,3%), 16 (4,6%) e 108 (31%) foram positivas para *D. fragilis*, *E. bieneusi* e *Blastocystis* sp., respectivamente. Maior frequência de amostras positivas para *Blastocystis* foi observada entre crianças com idade de cinco a nove anos ($p < 0,0001$) e mais densamente distribuídas em áreas residenciais mais populosas. Quanto à genotipagem, entre os isolados de *Blastocystis* sp., sete subtipos distintos foram identificados, a saber ST1 (n=44), ST2 (n=10), ST3 (n=49), ST4 (n=1), ST6 (n=2), ST7 (n=1) e ST9 (n=1). Todos os isolados de *D. fragilis* foram classificados como genótipo 1 e os isolados de *E. bieneusi* incluíram os genótipos D (n =15) e A (n =1). A partir dessas observações ressalta-se que (1) a detecção de *Blastocystis* sp., *D. fragilis* e *E. bieneusi* em amostras de indivíduos de ambos os sexos e de diferentes faixas etárias, submetidas ao exame parasitológico em um laboratório clínico, aponta para a necessidade de inclusão da pesquisa nos exames de rotina; (2) a variabilidade genética dos isolados sugere a exposição a diferentes fontes de contaminação e (3) a maior densidade de amostras de fezes positivas para *Blastocystis* sp. em áreas mais populosas sugere um risco maior de disseminação e transmissão do parasita.

Palavras-chave: *Blastocystis* sp, *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi*, parasitas intestinais, laboratório clínico, PCR, genotipagem

ABSTRACT

The prevalence of the gastrointestinal parasites *Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis* and *Enterocytosoon bieneusi* in the human population is still underestimated, since these organisms are not diagnosed in the routine of clinical laboratories. The aim of the present study was to detect these parasites and to assess their genetic characteristics and distribution status in stool samples submitted for routine examination in a clinical laboratory in Bauru, SP. Stool samples from female and male individuals from 16 cities and with age ranging from zero to ≥ 55 years were analyzed by PCR amplifying and sequencing based on the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) genes of *Blastocystis* sp. and *D. fragilis* and the internal transcribed spacer (ITS) of *E. bieneusi*. Of the 348 samples examined, eight (2.3%), 16 (4.6%) and 108 (31%) were positive for *D. fragilis*, *E. bieneusi* and *Blastocystis* sp., respectively. By age, the highest frequency of positive samples was for *Blastocystis* and detected in children aged 5-9 years ($p < 0.0001$). In addition, these positive samples were densely concentrated in more populated areas. Regarding genotyping, seven distinct subtypes of *Blastocystis* were identified, namely ST1 ($n = 44$), ST2 ($n = 10$), ST3 ($n = 49$), ST4 ($n = 1$), ST6 ($n = 2$), ST7 ($n = 1$) and ST9 ($n = 1$). All *D. fragilis* isolates were classified as genotype 1 and *E. bieneusi* isolates included genotypes D ($n = 16$) and A ($n = 1$). Here, it is relevant to emphasize that (1) the presence of *Blastocystis* sp., *D. fragilis* and *E. bieneusi* in stool samples of referred individuals to the clinical laboratory of both genders and different age ranges points to the need for the diagnosis of these parasites in routine examinations; (2) the genetic variability of the isolates suggests exposure to different sources of contamination and (3) the highest density of fecal samples positive for *Blastocystis* sp. in most populated areas suggests a greater risk of spreading and transmitting the parasite.

Key words: *Blastocystis* sp, *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytosoon bieneusi*, intestinal parasites, clinical laboratory, PCR, genotyping

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CAAE - Certificado de apresentação para Avaliação Ética

CID – Classificação Internacional de Doenças

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DRS – Departamento Regional de Saúde

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

ITS – *Internal Transcribed Spacer*

LAC – Laboratório de Análises Clínicas

mg – Miligramas

min – Minuto

ng – Nanogramas

nPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Nested

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico

SIG – Sistema de Informação Geográfica

SII – Síndrome do Intestino Irritável

SSU – rRNA – Menor Sub-unidade Ribossomal do Ácido Ribonucleico

STs – Subtipos

SUS – Sistema Único de Saúde

UNESP – Universidade Estadual Paulista

USC – Universidade do Sagrado Coração

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Blastocystis</i> sp.	17
1.2. <i>Dientamoeba fragilis</i>	21
1.3. <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	27
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Aspectos éticos da pesquisa	35
3.2. Local de estudo	35
3.3. Amostragem	35
3.4. Obtenção e processamento das amostras de fezes e pesquisa direta de <i>Blastocystis</i>	38
3.5. Extração do DNA genômico	40
3.6. Detecção e caracterização molecular dos isolados de <i>Blastocystis</i> sp, <i>D. fragilis</i> e <i>E. bieneusi</i>	40
3.6.1. Amplificação do DNA genômico	40
3.6.2. Sequenciamento dos produtos de PCR e análises filogenéticas	41
3.7. Georreferenciamento	43
3.8. Análise estatística	44
4. RESULTADOS	46
4.1. Amostras de fezes encaminhadas ao LAC	46
4.2. Pesquisa de <i>Blastocystis</i> sp, <i>D. fragilis</i> e <i>E. bieneusi</i>	47
4.2.1. Identificação microscópica e detecção molecular de <i>Blastocystis</i> sp	48
4.2.1.1. Diversidade genética dos isolados de <i>Blastocystis</i> sp	51
4.2.2. Detecção molecular de <i>D. fragilis</i> e <i>E. bieneusi</i>	54
4.3. Georreferenciamento	58
4.3.1. <i>Blastocystis</i> sp	58
4.3.2. <i>Dientamoeba fragilis</i> e <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	62
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS	82
8. APÊNDICE	97
9. ANEXOS	103

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias contribuem para o aumento das doenças infecciosas no mundo, principalmente aquelas causadas por parasitas entéricos, conhecidas como parasitoses intestinais ou enteroparasitoses. Embora as parasitoses intestinais representem um agravo à saúde humana, ainda são consideradas doenças negligenciadas, uma vez que acometem populações de baixa renda desprovidas de saneamento básico em países em desenvolvimento (STEPHENSON et. al., 2000). Nessas populações, a disseminação das parasitoses intestinais está associada à ingestão de água e alimentos contaminados ou ao contato direto pessoa-pessoa por meio das mãos sujas.

As enteroparasitoses que acometem milhões de pessoas em todo o mundo têm como agentes etiológicos alguma espécie de helminto e/ou protozoário gastrointestinal. Entre os protozoários, as infecções causadas por espécies reconhecidas como patogênicas que são responsáveis por causar grande morbidade, principalmente na infância, o que faz com que haja necessidade de atendimento médico, uma vez que podem estar relacionadas a diarreias e quadros debilitantes graves, comprometendo assim a qualidade de vida dos indivíduos e exercendo um impacto negativo sobre a produtividade das populações (FLETCHER et. al., 2012). Além disso, várias espécies de parasitas entéricos estão associadas a doenças diarreicas em populações imunossuprimidas.

Segundo FLETCHER e colaboradores (2012) e STARK e colaboradores (2009), *Blastocystis* sp, *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi* incluem-se entre as espécies de parasitas intestinais que frequentemente infectam a população humana, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. No entanto, a prevalência desses parasitas varia entre as regiões mundiais, e dentro de cada país, pois o risco de se adquirir essas infecções é diretamente influenciado por

fatores demográficos, socioeconômicos, culturais e climáticos aliados às condições de saneamento básico em que vivem as populações (ALUM et. al., 2010).

Muito embora seja crescente o interesse dos pesquisadores em ampliar o conhecimento sobre esses parasitas, ainda persistem muitas discussões em relação à relevância clínica das infecções. No que diz respeito a *Blastocystis* e *D. fragilis*, destaca-se a possível participação desses organismos na etiologia de desordens intestinais, particularmente em crianças e indivíduos imunocomprometidos (FLETCHER et al., 2012). Além disso, nos últimos anos, as investigações têm reunido evidências de que as infecções por esses parasitas podem ter implicações na progressão e exacerbação de distúrbios gastrointestinais crônicos, como a síndrome do intestino irritável (ROSTAMI et al., 2017; SHARIATI et al., 2019). Quanto à *E. bienewisi*, embora as investigações iniciais tenham revelado que este parasita é uma das principais causas de diarreia crônica em pacientes com AIDS, também pode infectar pacientes imunocompetentes, especialmente crianças (THELLIER; BRETON, 2008).

Mesmo assim, a prevalência das infecções na população humana ainda é subestimada, já que a pesquisa desses parasitas não está incluída na rotina dos laboratórios clínicos e em muitos estudos epidemiológicos. Portanto, quer sejam patogênicos ou não, dados sobre a prevalência, distribuição e diversidade genética dos isolados de *Blastocystis*, *D. fragilis* e *E. bienewisi* em diferentes grupos da população são necessários para reforçar a relevância desses parasitas, ainda equivocadamente ignorados por muitos profissionais da área médica.

1.1. *Blastocystis* sp.

Blastocystis sp. é um organismo unicelular, eucarioto, anaeróbico, pertencente ao grupo dos Stramenopiles. O gênero foi criado por Alexeieff em 1911, sob a denominação *Blastocystis enterocola*, mas foi modificado em 1912 por Brumpt, que atribuiu o nome *Blastocystis hominis* aos organismos isolados em fezes. No entanto, ainda hoje, a identificação do organismo em nível de espécie ainda é um desafio não resolvido, sendo que estudos filogenéticos recentes indicam a limitação do nome apenas à *Blastocystis*, devido à grande diversidade genética revelada no gênero. (STENSVOLD et al., 2007).

Ao longo da sua história taxonômica, este organismo foi classificado erroneamente durante anos como a forma cística do protozoário *Trichomonas* spp ou como um fungo ou um esporozoário, até que depois de muitos anos foi colocado entre os Stramenopiles, um dos maiores grupos dos eucariotas (STENSVOLD; CLARK, 2016).

O gênero *Blastocystis* é considerado polimórfico, uma vez que possui formas distintas encontradas, como a vacuolar, granular, ameboide e cística. Este polimorfismo está relacionado a fatores biológicos e físico-químicos, como o estado metabólico do hospedeiro e mudanças osmóticas (STENZEL E BOREHAM, 1996).

Quanto ao ciclo de vida (Figura 1), a transmissão parece ser por via fecal-oral, sendo a forma cística considerada a principal forma infectante. Os cistos podem ser ingeridos através de água e alimentos contaminados, ou até mesmo através do contato de pessoa a pessoa. Seu ciclo evolutivo não está totalmente elucidado, entretanto considera-se o mecanismo de divisão binária o mais provável (PARIJAH E JEREMIAH, 2013; STENSVOLD et. al., 2007).

Após a ingestão, a forma cística se rompe no trato digestivo, perdendo sua camada fibrilar e eliminando formas vacuolares. Após isso, essas formas podem se multiplicar ou se transformar em novas formas: ameboides ou multivacuolares. As formas ameboides passam por esquizogonia e se desenvolvem em pré-cistos de camada grossa, que serão eliminados nas fezes. Já as formas multivacuolares passam por esquizogonia e se desenvolvem em pré-cistos de camada fina, mantendo a autoinfecção no hospedeiro (TAN, 2008).

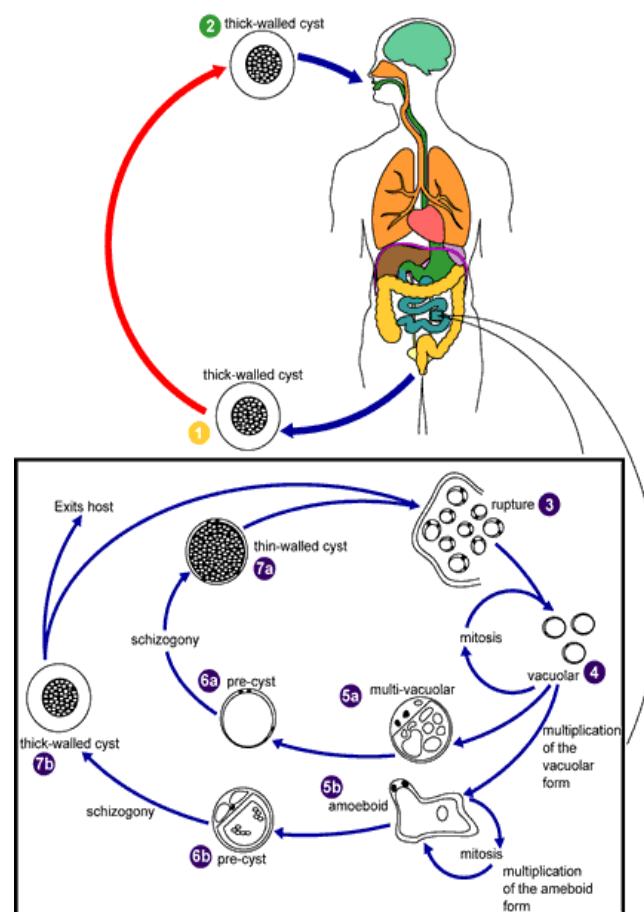


Figura 1. Ciclo biológico de *Blastocystis* sp. Cisto de parede grossa ingerido pelo hospedeiro (1 e 2), posterior ruptura do cisto (3) e liberação da forma vacuolar (4). Multiplicação da forma vacuolar através da mitose (4). Diferenciação em forma multivacuolar (5a) que dará origem à um pré-cisto (6a) que por esquizogonia se transformará em cisto de parede fina (7a). Diferenciação em forma amebóide (5b) que pode se multiplicar por mitose ou gerar novos pré-cistos (6b) que por esquizogonia se transformarão em cistos de parede grossa (7b), eliminados nas fezes e reiniciando o ciclo. FONTE: CDC (www.cdpx.cdc.gov/html).

A maioria dos indivíduos portadores de *Blastocystis* é assintomática. Quando a infecção é sintomática, há presença de diarreias agudas ou crônicas que podem ser acompanhadas de dores abdominais e flatulência, náuseas e vômitos. Normalmente a infecção é resolvida espontaneamente. Os quadros mais graves e crônicos são frequentemente associados a indivíduos imunocomprometidos. Estudos recentes estão relacionados à ocorrência de *Blastocystis* em indivíduos que possuem a síndrome do intestino irritável (SII), posto que a mudança na microbiota intestinal em indivíduos portadores da síndrome poderia proporcionar condições favoráveis à colonização do protozoário (POIRIER et. al., 2012).

O tratamento da infecção por *Blastocystis* ainda é uma questão complicada, especialmente porque ainda não está bem definido o potencial patogênico desse parasita. Sendo assim, debate-se muito sobre a real necessidade de tratamento. Em um paciente sintomático, o isolamento de cistos nas amostras de fezes deve desencadear uma avaliação completa de outras causas das queixas gastrointestinais do paciente, dada a possibilidade de coinfeção com outros patógenos. Pacientes com *Blastocystis* isolados nas fezes podem estar parasitados com outros patógenos, como *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* e *D. fragilis* (COYLE et al., 2012). É bem possível que os pacientes que respondem ao tratamento para *Blastocystis* com metronidazol ou sulfametoxazol - trimetoprima (SMX-TMP) possam realmente ter melhora clínica devido ao tratamento de um patógeno secundário. (BASYONI et al., 2018).

A distribuição geográfica de *Blastocystis* ainda é pouco conhecida, mas os estudos têm revelado uma ampla distribuição em todo o mundo, com prevalências altas, alcançando 62% de infecção. Nos países desenvolvidos, essas taxas geralmente são inferiores, podendo variar de aproximadamente 1% a 20%, como por exemplo, 0,5% no Japão a mais de 20% nos Estados Unidos. (CLARK et al., 2013). Nos últimos anos, levantamentos epidemiológicos realizados na América do Sul,

inclusive no Brasil, avaliaram a frequência de infecção por este parasita em diferentes grupos populacionais como crianças (DIB et al., 2015; REBOLLA et al., 2016; RAMIREZ et al., 2017; SANCHEZ et al., 2017), população residentes em favelas (FARIA et al., 2017; GIL et al., 2013), comunidades indígenas (MALHEIROS et al., 2011; SANCHEZ et al., 2017), comunidades rurais (INCANI et al., 2017; MACCHIONI et al., 2016; MACHICADO et al., 2012), moradores de aldeias de pescadores (DAVID et al., 2015) e indivíduos atendidos em hospitais (CASERO et al., 2015; MELO et al., 2017). Em todos estes grupos, inclusive no Brasil, *Blastocystis* tem sido diagnosticado com taxas de infecção <15% até 50%.

Com relação à variabilidade genética de *Blastocystis*, nos últimos 20 anos, estudos de caracterização molecular baseados na análise do gene SSUr-RNA têm demonstrado, até o momento, que este gênero compreende 17 subtipos, dos quais nove (ST1-ST9) são encontrados na população humana e também em animais. Os subtipos ST1-ST4 são encontrados em 90% dos isolados humano, enquanto apenas 10% dos demais isolados humanos são pertencentes aos subtipos ST5-ST9. Todos estes STs, exceto o ST9 também têm sido encontrados em vários hospedeiros não humanos, o que tem reforçado o potencial zoonótico deste parasita. Em 2009, oito novos STs (ST10-ST17) foram detectados em hospedeiros não humanos (ALFELLANI, et al., 2013 a).

No que se refere aos subtipos e possíveis relações com fenótipos, a observação de vários estudos realizados no mundo, ainda não encontraram quaisquer correlações. No entanto, ALFELLANI e colaboradores (2013 b) após compilarem os dados referentes a 3.000 isolados obtidos de diferentes regiões geográficas, observaram que a prevalência dos subtipos varia de um país para outro. O subtipo ST4 é quase tão comum quanto ST1 e ST3 em alguns países da Europa, porém parece ser praticamente inexistente na maioria das outras regiões como nos países da América do Sul. Por outro lado, ST6 é muito raro entre os europeus e norte-americanos, enquanto em alguns países da Ásia e do Oriente Médio, como no Egito, Nepal, Japão e Malásia a ocorrência desse subtipo em

isolados humanos tem sido frequentemente relatada. Já ST3 e ST1 são os subtipos mais prevalentes na maioria das investigações realizadas (MOOSAVI et al., 2012; EROGLU et al., 2009; LEE et al., 2012; YAKOOB et al., 2010; THATHAISONG et al., 2003).

No Brasil há poucas informações sobre a diversidade genética de isolados de *Blastocystis* associados a infecções humanas, e até o presente, poucos estudos foram publicados, a saber, um realizado em uma comunidade indígena na Amazônia (MALHEIROS et al., 2011), dois realizados em comunidades rurais e urbana do estado do Rio de Janeiro (BARBOSA et al., 2017; BARBOSA et al., 2018), um estudo desenvolvido no Estado do Paraná em comunidades urbanas, periurbanas e insulares (SEGUÍ et al., 2018) e três estudos no Estado de São Paulo realizados em colônias de pescadores do Rio Tietê (DAVID et al., 2015), em crianças de creche do município de Botucatu (OLIVEIRA-ARBEX et al., 2018) e pacientes atendidos em um hospital universitário (MELO et al., 2017). Nesses estudos, após o sequenciamento de fragmento referente ao gene SSU rRNA foram identificados, principalmente os subtipos ST1, ST2 e ST3.

1.2. *Dientamoeba fragilis*

A espécie inicialmente classificada como uma ameba comensal (JEEPS e DOBBEL, 1918), recentemente foi incluída na ordem Trichomonadida (MARITZ et al., 2014). É um organismo ameboide, que em sua maioria possui dois núcleos, e a única forma evolutiva conhecida é o trofozoíto (JOHNSON et. al., 2004). Seu mecanismo de transmissão não está claro, mas estudos têm sugerido a via fecal-oral como mais plausível, porém ao contrário da maioria dos protozoários intestinais, sua forma infectante é o trofozoíto (MIGUEL et. al., 2018).

Atualmente são aceitas duas hipóteses conflitantes para explicar a transmissão de *Dientamoeba fragilis*: a primeira é de que ovos dos helmintos *Ascaris lumbricoides*,

Enterobius vermicularis e *Trichuris trichiura* seriam vetores para a transmissão do parasita (OGREN et. al., 2013; ROSER et. al., 2013a); a segunda é a identificação de formas pré-císticas e císticas em fezes de camundongos contaminados com *Dientamoeba fragilis* que sugerem que esse organismo se assemelham a outros protozoários que apresentam o cisto como forma infectante (MUNASINGHEA et. al., 2013).

Diversas espécies já foram investigadas como hospedeiras potenciais de *D. fragilis*. Apesar disso, somente um pequeno número de animais foram confirmados como hospedeiros: macacos (HELENBROOK et. al., 2015), ovelhas (NOBLE & NOBLE, 1952), porcos e gorilas (LANKESTER et. al., 2010, CACCIÒ et. al., 2012) e em ratos selvagens (OGUNNIYI et. al., 2014). A figura 2 mostra o possível ciclo deste protozoário de acordo com STARK e colaboradores (2016), evidenciando que diferentes formas do parasita podem ser ingeridas (1) do ambiente externo para humanos ou para os outros hospedeiros já citados (2). Uma vez ingerida, *D. fragilis* se instala no intestino grosso, onde se multiplica por divisão binária (3). Logo em seguida, os pré cistos, cistos e trofozoítos formados serão eliminados através das fezes (4) podendo então contaminar água e alimentos. O número (5) demonstra a via alternativa de transmissão através de ovos de helmintos.

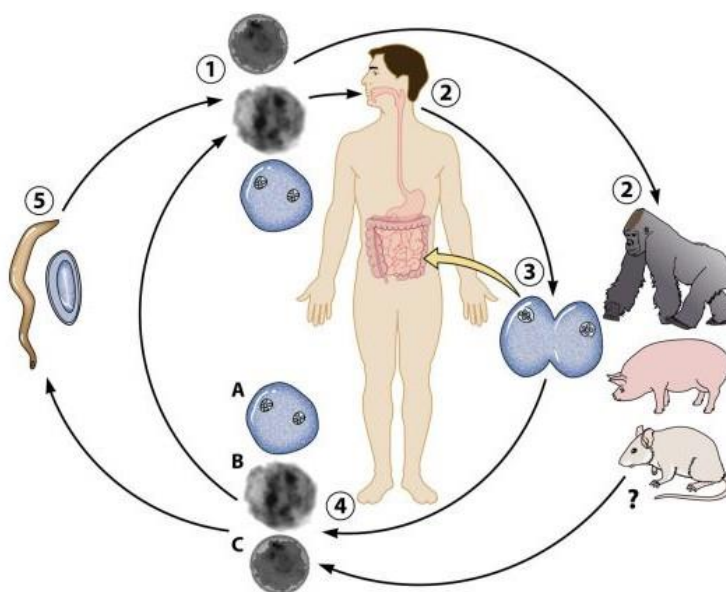


Figura 2. Ciclo evolutivo de *Dientamoeba fragilis*. Formas variadas do parasita sendo ingeridas (1) do ambiente externo para o hospedeiro humano ou animais como porcos, primatas não-humanos e possivelmente ratos (2). *D. fragilis* se instala no intestino grosso e lá se multiplica por divisão binária (3). Formação de diferentes formas: pré-cistos, cistos e trofozoítos. Via alternativa de veiculação das formas infectantes, através de ovos do helminto *Enterobius vermicularis*(5). FONTE: STARK et. al., 2016

Os estudos envolvendo a patogênese do micro-organismo são mínimos e não chegam a um consenso quanto sua patogenicidade. A primeira evidência de que *Dientamoeba fragilis* poderia ser patogênica surge quando HAKANSSON (1936) observou sintomatologia em pacientes infectados pelo protozoário. Quando há sintomatologia, a diarreia é o aspecto mais presente, seguido de dores abdominais, perda de peso, anorexia e náuseas, porém a maioria dos portadores é assintomática (STARK et. al., 2010). Um estudo retrospectivo com pacientes positivos para *D. fragilis* (2009-2014) avaliou 108 indivíduos infectados, sendo que destes, 34 (31,5%) apresentavam os sintomas característicos da infecção, chamando atenção para a patogenia do micro-organismo (MIGUEL et. al., 2018).

Assim como na infecção por *Blastocystis*, *D. fragilis* se faz presente em pacientes com a síndrome do intestino irritável (YAKOOB et al., 2010). Além disso, outros estudos sugerem que alguns protozoários, dentre eles *Dientamoeba fragilis*, são capazes de influenciar na etiologia desta doença (STARK et al., 2007). O fato de que muitas pessoas diagnosticadas com a síndrome do intestino irritável apresentam altas taxas de infecção por protozoários pode ser uma possível explicação para essa relação (YAKOOB et al., 2010). Além do mais, a síndrome provoca mudanças na microbiota intestinal, podendo proporcionar condições favoráveis para a colonização de protozoários.

O diagnóstico tradicional de *D. fragilis* depende da detecção microscópica de trofozoítos em esfregaços corados. Apesar de várias limitações como curto tempo de sobrevivência e perda de características morfológicas do trofozoíto fora do hospedeiro, preservação adequada das amostras de fezes e pessoal técnico

treinado, esse método ainda tem sido útil para a identificação de rotina e pesquisas epidemiológicas (INTRA et al., 2019). Os ensaios moleculares, incluindo PCR convencional e em tempo real (qPCR) foram desenvolvidos como uma alternativa diagnóstica ao exame microscópico (STARK et al., 2016, CACCIÒ, 2018). Além disso, recentemente, a técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI-TOF MS) foi aplicada com sucesso pela primeira vez, a fim de substituir o ensaio de PCR para a identificação de cepas de *D. fragilis* isoladas de amostras clínicas (CALDERARO et al., 2018). Entretanto nos países de baixa renda, a inclusão de todas essas técnicas no diagnóstico de rotina ainda não é factível, devido ao alto custo das técnicas.

Quanto ao tratamento, uma variedade de medicamentos antiparasitários e esquemas já foram empregados, mas o metronidazol e a paromomicina são os mais comumente administrados. Em estudo recente, tratamento com paromomicina apresentou maiores taxas de eliminação de *D. fragilis* do que o metronidazol, exceto em indivíduos com menos de seis anos de idade (BURGAÑA et al., 2019).

A distribuição mundial de *D. fragilis* na população humana é ampla, tendo destaque em áreas de baixas condições de higiene, principalmente em países em desenvolvimento (BARRATT et al., 2011). A frequência de infecções observadas na população humana é muito variável, o que vai depender da população estudada, da região e, particularmente, dos procedimentos de diagnóstico empregados (STARK et al., 2016, CACCIÒ, 2018). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência de infecção por *D. fragilis* pode variar de 0,2% a 80% (STARK et al., 2016; CACCIÒ, 2018). Taxas de infecção mais altas têm sido observadas em populações que vivem em países desenvolvidos, particularmente na Europa (STARK et al., 2016; CACCIÒ, 2018). No entanto, dados de prevalência também foram relatados em regiões em desenvolvimento onde o saneamento adequado não está disponível para todos (BARRATT et al., 2011).

Em um estudo realizado na Itália, CALDERARO e colaboradores (2010)

analisaram as fezes de 491 pacientes com suspeita de infecção parasitária e evidenciaram 21% de positividade para *D. fragilis*. Outro estudo, na Holanda, desenvolvido por MASS e colaboradores (2013), empregando a técnica da PCR–multiplex, o parasita foi detectado em 89% das amostras de fezes obtidas de pacientes pediátricos com sintomas gastrointestinais.

Na Dinamarca, um estudo desenvolvido por ROSER e colaboradores (2013b), com 9945 amostras de fezes mostrou positividade em 43% dos indivíduos, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Outro estudo realizado também na Dinamarca no ano seguinte incluiu pacientes adultos que apresentavam a síndrome do intestino irritável. *D. fragilis* foi detectado em 34,8% das amostras, enquanto no grupo controle foi diagnosticado em 23,4% dos indivíduos (KROGSGAARD et al., 2014). Em contrapartida, um estudo com pacientes suecos apresentando sintomas e um grupo controle demonstrou apenas 3% e 2% de positividade, respectivamente (OGREM et al., 2015). Mais recentemente, HOLTMAN e colaboradores (2017) na Holanda, analisaram 107 amostras de crianças com sintomas gastrointestinais através de PCR em tempo real e identificaram uma prevalência de 55% de *D. fragilis* nos indivíduos estudados.

Nas regiões mais pobres, recentemente, levantamentos epidemiológicos baseados em microscopia e/ou ensaios moleculares foram realizados em comunidades de baixa renda na Ásia, com taxas de infecção menores que 5% (ANUAR et al., 2015; ÖGREN et al., 2016; WONG et al., 2016), Oriente Médio, com taxas variando de 0,19% à 60,6% (OSMAN et al., 2016; SARKARI et al., 2016; ABU-MADI et al., 2017) e África, com taxas variando de 8% à 16,7% (SEHATA; HASSANEIN, 2015; FORSELL et al., 2016; GREIGERT et al., 2018). Na América Latina, as informações ainda são limitadas, porém estudos mostram taxas do parasita variando entre 1,2% à 40,4% (LAINSON; SILVA, 1999; GARCIA; CIMERMAN, 2012; JIMENEZ-GONZALEZ et al., 2012; DAVID et al., 2015; INCANI et al., 2017). Até onde sabemos, três estudos foram realizados no Brasil, dois com envolvendo pacientes com

HIV com prevalência de 3% e 1,2% de *Dientamoeba fragilis* (LAINSON; SILVA, 1999; GARCIA; CIMERMAN, 2012) e um em crianças e adultos saudáveis vivendo em duas comunidades de baixa renda, com 13,6% e 18,4% de prevalência (DAVID et al., 2015).

Como muitos protozoários, *D. fragilis* apresenta diversidade genética e com base em estudos na literatura atual, existem dois grupos genéticos principais, os genótipos 1 e 2, sendo o primeiro predominante (CACCIÓ, 2018). Além desses genótipos estarem associados às infecções humanas, isolados detectados em fezes de suínos e primatas não humanos foram caracterizados como os mesmos genótipos que infectam os humanos (CACCIÒ et al., 2012;). No entanto, até o momento, não há um consenso sobre o caráter zoonótico da infecção por *D. fragilis*, deixando sem respostas questões referentes à via de transmissão e os possíveis hospedeiros naturais.

A distinção entre esses genótipos tem se baseado nas diferenças entre as sequências de 18S rRNA, embora essas diferenças sejam muito pequenas (2 a 4%) entre os dois grupos (CACCIÓ, 2018). Em um estudo realizado por STENSVOLD e colaboradores (2013) ao se comparar outros marcadores genéticos (genes da actina e do fator de alongamento 1 α), os pesquisadores verificaram que as diferenças nesses genes também eram extremamente pequenas ($\pm 3\%$), sugerindo que os dois genótipos não divergiram muito. Sendo assim, diferentemente de outros protistas como *Blastocystis* sp., *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp., a diversidade genética parece ser limitada em *D. fragilis*, embora até o presente, poucos genes e isolados tenham sido analisados. Por outro lado, a relação do genótipo com a sintomatologia ainda é uma questão que precisa ser elucidada.

Diferenças quanto à apresentação clínica das infecções por *D. fragilis* podem estar relacionadas à diversidade genética do parasita. A presença de *D. fragilis* em indivíduos assintomáticos certamente aumenta a possibilidade de múltiplas linhagens, algumas das quais podem não ser patogênicas para os seres humanos (STARK et al., 2016).

1.3. *Enterocytozoon bieneusi*

Os microsporídeos são um grupo de eucariotas parasitas intracelulares obrigatórios que compreendem mais de 200 gêneros. Desses, 17 espécies pertencentes a 10 gêneros já foram relatadas em humanos. *Enterocytozoon bieneusi* e espécies do gênero *Encephalitozoon* (*Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis* e *Encephalitozoon hellem*) são os principais microsporídeos associados às infecções humanas, sendo *E. bieneusi* a espécie mais frequentemente detectada na população humana (STANTIFORD et. al., 2016). No entanto este parasita também pode infectar animais selvagens, animais de rebanho e de companhia, o que é forte indicativo do seu potencial zoonótico (KARIM et. al., 2015; SANTÍN; FAYER, 2009), além da rã-touro, comestível na Ásia (DING et al., 2020).

DESPORTES et. al. (1985) foi quem nomeou a espécie, a partir da primeira observação de *E. bieneusi* nos enterócitos de um paciente com AIDS no Haiti, através de microscopia eletrônica. Desde então, foram relatados vários casos de pacientes com diarreia crônica atribuída a esse organismo. Além disso, cada vez mais, casos de microsporidiose intestinal devido a *E. bieneusi* têm sido cada vez mais relatados em outros indivíduos imunocomprometidos, como receptores de transplante de órgãos, viajantes, crianças e idosos (MATOS et al., 2012), assim como em alguns grupos étnicos minoritários na China (GONG et al., 2019).

Alguns estudos têm demonstrado ainda que *E. bieneusi* também pode infectar pacientes imunocompetentes, especialmente crianças, embora a doença seja menos grave e a infecção seja autolimitante na ausência de anormalidades imunológicas (MATOS et al., 2012). Caso os sintomas se manifestem e seja necessário um tratamento, as opções terapêuticas mais comuns para esse microsporídeo são o albendazol ou a fumagilina, sendo o primeiro o medicamento mais comumente escolhido para o tratamento (HAN; WEISS; 2018).

As infecções por *E. bieneusi* na população humana são detectadas

principalmente por microscopia óptica de amostras fecais, microscopia eletrônica e métodos baseados em PCR. A diferença entre as taxas de prevalência é muito grande devido às diferenças consideráveis nos métodos de diagnóstico utilizados, nos dados analisados, nas localizações geográficas, nos grupos de pacientes e nas características dos pacientes (sexo, idade, condições socioeconômicas, status imunológico e características clínicas) (MATOS et al., 2012).

Nos países desenvolvidos como Estados Unidos, Europa (Alemanha, França, Inglaterra e Portugal) e Austrália, estudos envolvendo pessoas soropositivas para o HIV com diarreia têm demonstrado taxas entre 2% e 78% (MATOS et al., 2012). Já nos países em desenvolvimento, as taxas de prevalência observadas variam entre 2,5% e 51% em pacientes adultos soropositivos para o HIV com diarreia e de apenas 4,6% nos pacientes sem diarreia (MATOS et al., 2012). Inclusive no Brasil, *E. bieneusi* já foi identificado em pacientes HIV positivos e em indivíduos transplantados (COSTA et al., 2013). Além disso, nesses mesmos países, *E. bieneusi* tem sido detectado em 5,35% a 58,1% de amostras de fezes provenientes de indivíduos soronegativos para o HIV com e sem diarreia (MATOS et al., 2012). Atualmente, em diferentes regiões, com o aumento do acesso à terapia antirretroviral, as taxas de infecção em pacientes com HIV/AIDS diminuíram significativamente, com prevalências variando de 0 a 42% (FLETCHER et al., 2012).

A epidemiologia e vias de transmissão de *E. bieneusi* ainda não estão claras, porém seu mecanismo de infecção parece ocorrer via fecal-oral, pela ingestão de água e alimentos contaminados (FAYER; SANTÍN, 2014). Segundo LI e colaboradores (2019), a forma infectante de *E. bieneusi* é o esporo, que é resistente e pode persistir no ambiente por meses. Quando ingerido, o esporo germina liberando seu túbulo polar, que entra em contato com a célula hospedeira (enterócitos) e injeta o esporoplasma infeccioso na mesma. Dentro da célula hospedeira, especificamente no citosol, o esporoplasma entra em fase proliferativa por merogonia dando origem aos merontes. Esses por sua vez, passam por esporogonia, desenvolvendo uma parede

espessa e seu aparato de invasão, criando esporontes e esporos maduros. Quando aumentam em número, rompem a membrana da célula hospedeira, podendo infectar novas células ou serem liberados nas fezes (Figura 3).

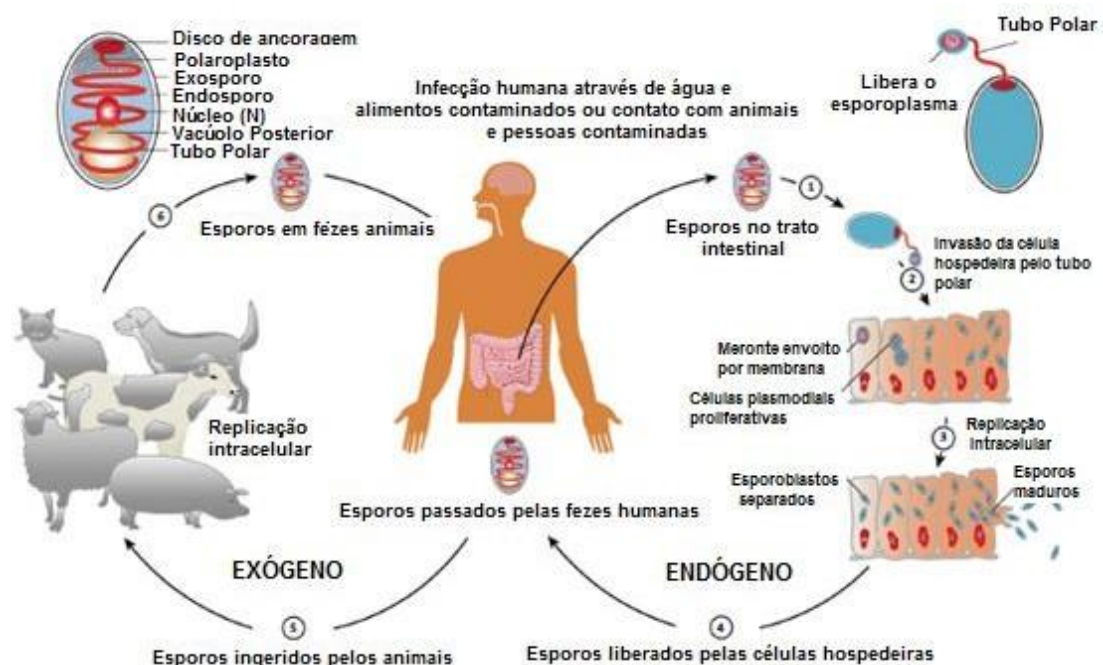


Figura 3. Ciclo evolutivo de *Enterocytozoon bieneusi*. A infecção ocorre através de água ou alimentos contaminados e os esporos se instalam no trato intestinal (1). A invasão da célula do hospedeiro ocorre através da liberação do túbulo polar para dentro do enterócito (2). Dentro da célula o túbulo se transforma em meronte inicia replicação intracelular (3) em esporoblastos. Após se tornarem esporos maduros, os esporos destroem as células hospedeiras (4) e são liberados nas fezes humanas. Estes esporos são ingeridos por animais (5) e começam uma nova replicação intracelular, até serem liberados nas fezes (6) e darem continuidade ao ciclo. FONTE: LI; FENG; SANTIN, 2019

Quanto às manifestações clínicas, os sintomas gastrointestinais incluem diarreia persistente, dor abdominal e perda de peso, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (FLETCHER et al., 2012; MATOS et al., 2012). Nesses indivíduos, o parasita pode causar diarreia crônica, presente em indivíduos com AIDS em até 70% dos casos (FIELD & MINER JR, 2015). Em indivíduos saudáveis, a infecção por *E. bieneusi* pode determinar problemas de má absorção e diarreia auto limitante de aproximadamente 1 mês (FLETCHER et al., 2012; MATOS et al., 2012).

Morfologicamente, os esporos de diferentes isolados de *E. bieneusi* são indistinguíveis. Desse modo, os mesmos só podem ser identificados através de métodos moleculares. A maioria dos estudos genéticos empregados para a pesquisa do parasita são baseados no fragmento ITS (*internal transcribed spacer*), uma sequência rRNA. (SANTÍN & FAYER, 2011). Atualmente, considerando os resultados de diferentes estudos de caracterização genética de *E. bieneusi*, LI e colaboradores (2019) apresentaram uma lista atualizada que inclui 474 genótipos distintos, os quais são divididos em 11 grandes grupos (1-11).

O Grupo 1 é o maior deles e compreende 314 genótipos, a maioria identificada em infecções humanas. Os genótipos D, EbpC e tipo IV são encontrados tanto em animais quanto em humanos, demonstrando um potencial zoonótico (LI; FENG; SANTÍN, 2019). O genótipo B parece ser específico da espécie humana, como demonstra estudos na África (BRETON et. al., 2007; OJUROMI et. al., 2012), na Europa (LIGUORY et. al. 1998; SADLER et. al., 2002) e Oceania (STARK et. al., 2009b) que encontraram esse genótipo em humanos, porém em nenhum animal.

Os trabalhos com *Enterocytozoon bieneusi* no Brasil são escassos, e a maioria estuda o parasita em animais. Em 2015, *E. bieneusi* foi detectado em suínos e quatro genótipos já descritos, O, EbpA, CS-1 e H; além de dezessete novos genótipos nomeados de PigEb-1-PigEb-17 foram identificados nesses hospedeiros (FIUZA et. al., 2015). Posteriormente, SILVA-FIUZA e colaboradores (2016) realizaram a detecção molecular do parasita em bovinos e identificaram genótipos previamente observados em outros estudos como BEB4, BEB8, D EbpA e I, e 17 genótipos que até então não tinham sido descritos BEB11-BEB17).

No mesmo ano, outro estudo foi realizado com ovinos, e os genótipos já descritos BEB 6, BEB 7, I e LW1 foram detectados, além de dois novos genótipos, BEB 18 e BEB 19 (FIUZA et. al., 2016).

Além dos animais de produção, ainda há estudos de detecção molecular de *E. bieneusi* em aves exóticas, que revelaram os genótipos D e Peru6 (CUNHA et. al., 2017; GONG et al., 2019) e Ebp4 (LALLO et. al., 2012) e um estudo com galinhas, com 24 amostras positivas de genótipos Peru6, Peru11, tipo IV e D (CUNHA et. al., 2016). Mais recentemente, PRADO e colaboradores (2019) realizaram um estudo com gatos, que identificou o genótipo D em duas amostras positivas. Além de amostras de animais hospedeiros, a pesquisa do parasita já foi realizada em amostras ambientais, incluindo água de esgoto e em um efluente tratado, quando foi possível a identificação de mais um novo genótipo denominado EbRB (YAMASHIRO et al., 2017).

Embora nos últimos anos o interesse crescente dos pesquisadores tenha motivado a ampliação das pesquisas, ainda são muitas as lacunas no conhecimento sobre esses parasitas, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a determinação precisa das infecções na população humana ainda é limitada. Sendo assim, conhecer sobre a ocorrência e distribuição na população humana, bem como sobre a variação genética dos isolados que circulam em diferentes regiões é determinante no estudo desses parasitas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Detectar e caracterizar geneticamente isolados de *Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi* em amostras de fezes encaminhadas para exame de rotina em um laboratório clínico de referência no município de Bauru, São Paulo.

Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência de *Blastocystis* sp., *D. fragilis* e *E. bieneusi* em amostras de fezes descartadas após exames coproparasitológicos de rotina;
- Verificar a existência de associações entre a frequência de *Blastocystis* sp., *D. fragilis* e *E. bieneusi* e sexo, idade e procedência dos usuários atendidos no laboratório clínico
- Verificar a diversidade genética dos isolados de *Blastocystis* sp, *D. fragilis* e *E. bieneusi* detectados nas amostras clínicas;
- Determinar a distribuição geográfica, pelo georreferenciamento, dos isolados e respectivos genótipos de *Blastocystis* sp.

Materiais e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos da pesquisa

Todos os procedimentos propostos para a realização do presente estudo foram formalmente apresentados e receberam a anuência da administração do Laboratório Clínico da Universidade do Sagrado Coração (USC), previamente à submissão para apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/Unesp/Botucatu (CAAE 90078218.0.0000.5411) (ANEXOS 1 e 2).

3.2. Local de estudo

O presente estudo foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Fundação Véritas da Universidade do Sagrado Coração (USC), localizado no município de Bauru, (22° 18' 54" S 49° 03' 39" O) na região centro-oeste do estado de São Paulo (Figura 4). O LAC foi criado em 1985 e é um laboratório clínico de referência que presta serviço principalmente aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), atendendo a 35 municípios de um total de 68 que integram a área de abrangência do Departamento Regional de Saúde de Bauru (DRS VI) (Quadro 1 e Figura 5). Neste laboratório, aproximadamente 5.000 pacientes são atendidos por mês para a realização de exames hematológicos, bioquímicos, microbiológicos, parasitológicos, imunológicos e demais procedimentos auxiliares de diagnóstico.

3.3. Amostragem

Foram incluídas no estudo amostras de fezes enviadas para serviço de diagnóstico de parasitas intestinais do LAC. Dentro de um fluxo semanal de

recebimento de amostras, exceto Bauru e Agudos, o envio por outros municípios é feito em dias específicos da semana.



Figura 4 – Laboratório de análises clínicas da Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP.

Quadro 1. Municípios atendidos pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC/ Bauru)

Municípios	
Agudos	Jaú
Arealva	Lençóis Paulista
Avaí	Lucianópolis
Balbinos	Macatuba
Barra Bonita	Mineiros do Tietê
Boraceia	Paulistânia
Borebi	Pederneiras
Brotas	Pirajuí
Bauru	Piratininga
Cabrália Paulista	Pongaí
Cafelândia	Presidente Alves
Dois Córregos	Promissão
Duartina	Reginópolis
Getulina	Sabino
Guaíçara	Torrinha
Iacanga	Ubirajara
Igaraçu do Tietê	Uru
Itapuí	

Diante dessa informação, foi realizado junto ao sistema interno de registro do LAC, um levantamento do fluxo de amostras de fezes durante os anos de 2016, 2017 e 2018 (até o mês de agosto), a fim de estabelecer um esquema de coleta que garantisse a representatividade dos municípios atendidos pelo laboratório. A partir dessa análise, as coletas foram realizadas uma ou duas vezes na semana, dependendo da quantidade recebida, de modo que, em cada semana, os dias diferiam entre si (ex: na primeira semana, amostras coletadas na segunda-feira, na segunda semana, na terça-feira, etc.), de acordo com o fluxo de atendimento dos municípios pelo laboratório.



Figura 5 – Municípios que compõem o Departamento de Saúde de Bauru (DRSVI). Em destaque (círculos vermelhos) os municípios atendidos pelo LAC/USC. (Adaptado de Secretaria de Estado da Saúde – SP).

Utilizando um número de código atribuído a cada amostra para a omissão dos nomes dos usuários, dados relativos à idade, sexo e município de residência de cada

indivíduo foram obtidos a partir de consulta no sistema interno de registro do laboratório. Além do nome, informações como CID (Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde) e o laudo do exame de fezes também não foram disponibilizados pelo laboratório. Segundo informações obtidas na seção de Parasitologia, diariamente cerca de 30 a 60 amostras são processadas pelo método de sedimentação espontânea (LUTZ, 1919). Essas são provenientes de pacientes de diferentes municípios atendidos pelo laboratório, a maioria residente nos municípios de Bauru e Agudos.

3.4. Obtenção e processamento das amostras de fezes e pesquisa direta de *Blastocystis*

Durante a coleta, realizada no período compreendido entre setembro à dezembro de 2018, o material restante de cada amostra previamente processada, examinada para a pesquisa de parasitas intestinais e colocadas para descarte foi disponibilizado para a inclusão no presente estudo. As amostras mantidas em frascos coletores sem conservante foram acondicionadas em um *cooler* e transportadas até o Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências/UNESP/Botucatu, onde foram filtradas em gaze diretamente em um copo descartável e em seguida, o material foi distribuído em tubos de fundo cônico (50 ml) e lavado duas vezes (350xg/2 minutos) com solução salina tamponada (PBS pH 7,2). O sedimento obtido foi utilizado da seguinte forma: (1) uma a duas gotas do sedimento foram transferidas para uma lâmina de microscopia, coberta com lamínula 22 x 22 mm e examinada ao microscópio óptico com aumento de 100 e 400 vezes para a pesquisa de *Blastocystis* e (2) o restante do sedimento foi dividido em alíquotas e congelado a 20°C negativos para posterior extração do DNA genômico. A partir da obtenção das amostras de fezes foi adotado o protocolo apresentado na Figura 6. A pesquisa microscópica para *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi* não foi realizada pois ambos parasitos requerem métodos de coloração permanente para visualização em microscópio.

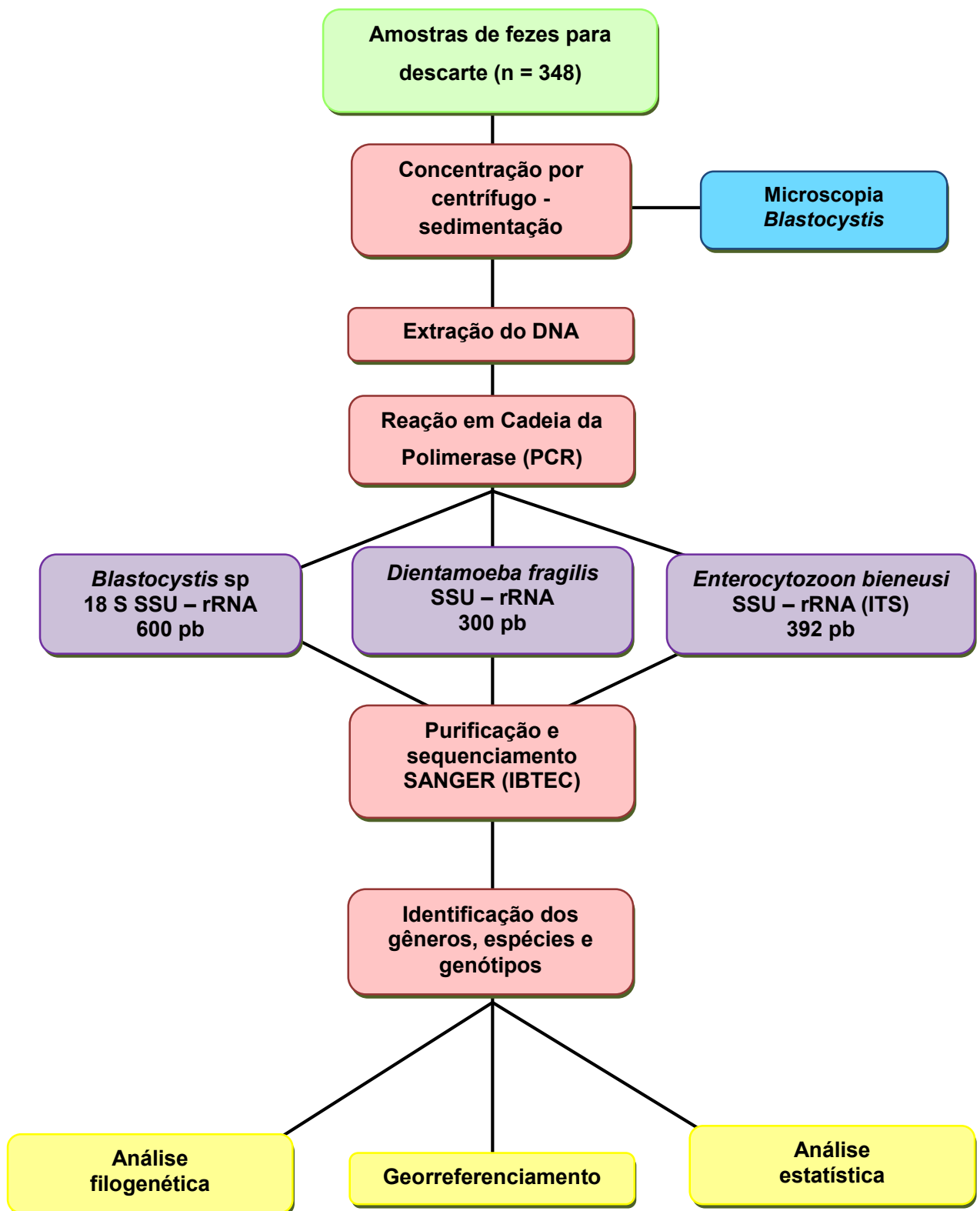


Figura 6 – Fluxograma resumido da metodologia apresentada

3.5. Extração do DNA genômico

Todas as amostras de fezes foram submetidas à extração de DNA empregando o kit QIAamp® Fast DNA (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as recomendações dos fabricantes, porém com algumas modificações na etapa de lise. Deste modo, logo após acrescentar o tampão de lise (AL Buffer), a amostra foi submetida a três ciclos de congelamento/descongelamento nas seguintes condições: incubação em nitrogênio líquido durante 1 minuto e descongelamento em banho seco à 95°C por 5 minutos. Após a extração, o DNA obtido das amostras foi mantido em freezer -20°C, até o momento do uso.

3.6. Detecção e caracterização molecular dos isolados de *Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi*

A identificação e caracterização molecular dos isolados de *Blastocystis*, *D. fragilis* e *E. bieneusi* foi realizada empregando-se técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) segundo os protocolos apresentados a seguir (Quadro 2).

3.6.1. Amplificação do DNA genômico

Assim, para os isolados de *Blastocystis* foram utilizados *primers* para a amplificação de fragmentos de DNA do gene SSUrRNA (600 pb), de acordo com o protocolo proposto por SCICLUNA et al. (2006). Para a amplificação de sequências correspondentes ao gene SSUr DNA em isolados de *D. fragilis* (300 pb), as reações seguiram o protocolo descrito por CACCIÒ et al. (2012). Quanto à *E. bieneusi*, para a obtenção de um fragmento de 392 pb, amostras de DNA foram empregadas em uma reação de “Nested” PCR (nPCR), de acordo com metodologia proposta por BUCKHOLT et. al. (2002), para amplificação de fragmento correspondente à região

espaçadora intergênica (ITS) do gene rRNA. Estes protocolos estão resumidos no Quadro 2.

Nos três protocolos, foram empregados 5µL de DNA, 1µL (1µM) de cada primer e 25 µl de *Taq DNA Polymerase Master Mix RED Ampliqon* (2.0x Master Mix kit, contendo 2.0 mM MgCl₂). O volume final de cada reação foi de 50 µL. Para cada um dos protocolos propostos, diferentes ensaios foram realizados para a padronização das condições de amplificação dos genes a serem estudados. Além disso, em todas as baterias de reações foram incluídas amostras-controle, positiva e negativa, provenientes do banco de amostras do laboratório de Protozoários Intestinais/Depto. de Parasitologia/IBB/Unesp. Para o controle de contaminação, em cada bateria de reações foi adicionado um tubo contendo o tampão de reação, omitindo-se a aplicação da amostra de DNA.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e a visualização foi feita em Transiluminador UV. O comprimento dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de bases (*Base-Pair Ladder*).

3.6.2. Sequenciamento dos produtos de PCR e análises filogenéticas

Para a determinação das sequências nucleotídicas, cada um dos produtos de amplificação dos genes estudados foi purificado empregando-se os kits QIAquick PCR Purification® (Qiagen) e MinElute PCR Purification®(Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. Em seguida à purificação, a concentração de DNA do material foi estimada em gel de agarose 2%, empregando o marcador Low DNA Mass Ladder, a fim de que pelo menos 10 ng/µl de DNA purificado fossem enviados para o sequenciamento por Sanger, realizado em aparelho ABIPRISM 3500® (Applied Biosystems) no Instituto de Biotecnologia da UNESP (IBTEC).

Quadro 2. Primers e protocolos empregados para a caracterização molecular dos isolados de *Blastocystis* spp, *D. fragilis* e *E. bienensei*.

Parasita	Gene	Primers (Referência)	Sequência dos primers	Ciclos
<i>Blastocystis</i>	<i>SSU rRNA</i> 600 pb	BL18SF1	5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA-3'	94°C - 3 min
		BL18SR1	5'-GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3'	94°C - 30 seg*
				55°C - 30 seg*
				72°C - 60 seg*
		(Scicluna, et al 2006)		40 ciclos*
<i>Dientamoeba fragilis</i>	<i>SSU rRNA</i> 300 pb			72°C - 7 min
		DF1094	5'-TCAGGCTATAGGTCTTTCAGGA-3'	94°C - 3 min
		DF1250	5'-CATCTTCCTCCTGCTTAGACGC-3'	94°C - 30 seg*
				55°C - 30 seg*
		(Cacciò et al, 2012)		72°C - 30 seg*
<i>Enterocytozoon bienensei</i>	<i>SSUrRNA</i> região ITS 435 pb	1ª reação		94°C - 3 min
		EBITS3 (PCR)	5'-GGTCATAGGGATGAAGAG	94°C - 30 seg*
		EBITS4 (PCR)	5'-TTCGAGTTCTTTCGCGCTC	57°C - 30 seg*
				72°C - 40 seg*
				35 ciclos*
	392 pb			72°C - 10 min
		2ª reação		
		EBITS1 (nPCR)	5'-GCTCTGAATATCTATGGCT	94°C - 3 min
		EBITS2.4 (nPCR)	5'-ATCGCCGACGGATCCAAGTG	94°C - 30 seg*
				55°C - 30 seg*
				72°C - 40 seg*
		(Buckholt et al., 2002)		30 ciclos*
				72°C - 10 min

As sequências geradas (“Forward” e “Reverse”) foram analisadas e editadas empregando-se o programa Chromas versão 2.6.6 e o consenso das sequências foi realizado no programa Embossgui - European Molecular Biology Open Software Suite (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS/>). Para confirmar a espécie e identificar os grupos genéticos de cada isolado de *Blastocystis*, *D. fragilis* e *E. bieneusi* obtidos no presente estudo, todas as sequências nucleotídicas foram comparadas com sequências homólogas previamente publicadas e disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se o programa BLASTn do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). No que se refere a *Blastocystis* spp., os subtipos e os alelos dos isolados também foram identificados em um banco de dados específico (<http://pubmlst.org/blastocystis>).

Para as análises filogenéticas a fim de se avaliar o grau de diversidade entre os isolados de cada parasita em estudo, as sequências obtidas foram comparadas entre si e com as sequências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank e o alinhamento múltiplo das sequências foi feito usando o programa Clustal X versão 2.1 (LARKIN et al., 2007). As árvores filogenéticas foram geradas no programa MEGA X Versão 10.1, empregando a análise de Neighbor – Joining como o método de inferência filogenética com valores de bootstrap obtidos para 1000 replicações.

3.7. Georreferenciamento

A partir da construção de um banco de dados contendo informações referentes à procedência das amostras de fezes encaminhadas ao LAC (bairro, região, município) foi feito o georreferenciamento dos isolados de *Blastocystis* sp, *D. fragilis* e *E. bieneusi* identificados no presente estudo. Para isso, os dados foram importados para o Sistema de Informação Geográfica (SIG), empregando o software QGIS 10.3 para geocodificação dos dados. Empregando a técnica de estimativa de intensidade de Kernel, além da distribuição, foi possível analisar a concentração/densidade dos

isolados. A análise espacial foi realizada pelo Prof. Dr. Cassiano Victória do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Botucatu.

3.8. Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados, categorizados e tabulados em planilha eletrônica do programa Microsoft Excel. Em relação à frequência de *Blastocystis* sp, *D. fragilis* e *E. bieneusi* na população estudada, foram analisadas as possíveis associações com as variáveis idade, sexo e município de procedência. Quanto à genotipagem dos isolados de cada parasita, foi verificada a frequência com que os grupos genéticos identificados ocorrem na população em estudo.

A análise estatística foi realizada com auxílio do software SAS versão 9.3. Os testes aplicados para verificar associação entre as diferentes variáveis foram o teste χ^2 (qui-quadrado) e o teste de Fischer. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Além dessas análises, considerando que métodos diferentes foram empregados para a pesquisa de *Blastocystis* sp. nas amostras de fezes, o índice Kappa (K) foi calculado para determinar a taxa de concordância entre os métodos adotados.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Amostras de fezes encaminhadas ao LAC

Durante o período previsto para a coleta, 348 amostras de fezes enviadas para exame parasitológico e colocadas para o descarte após a análise no LAC foram incluídas no presente estudo. Essas amostras foram provenientes de indivíduos residentes em 16 municípios, a saber: Agudos, Arealva, Avaí, Barra Bonita, Bauru, Borebi, Cabrália Paulista, Duartina, Guaiçara, Jacanga, Igaraçu do Tietê, Paulistânia, Pirajuí, Reginópolis, Torrinha e Uru. O município com maior representatividade foi Bauru, com um total de 182 amostras (52,3%) seguido de Agudos com 70 (20,11%), Jacanga, com 28 (8,0%) e Barra Bonita com 23 (6,0%) (Tabela 1). Os municípios que ao longo do período apresentaram menor representatividade (número de amostras enviadas ≤ 12) foram agrupados na categoria “Outros” (Tabela 1).

De 348 amostras analisadas, 149 (42,8%) foram obtidas de indivíduos do sexo masculino e 199 (57,2%) do sexo feminino, com idades variando de três meses a 88 anos e com média de $20,76 \pm 20,64$ anos. Diante da grande amplitude etária, os indivíduos foram agrupados em sete faixas etárias (Tabela 1), sendo que 59,2% (206/348) eram crianças com idades variando de zero a 14 anos.

Tabela 1. Características demográficas de 348 usuários atendidos no Laboratório de Análises Clínicas (LAC)/USC, Bauru, SP, durante o período de setembro a dezembro de 2018.

Variáveis	Categoria	Nº (%)
Sexo*	Feminino	199 (57,18)
	Masculino	149 (42,82)
Idade*	0 – 4	72 (20,69)
	5 – 9	86 (24,71)
	10 – 14	48 (13,79)
	15 – 20	14 (4,0)
	21 – 35	49 (14,1)
	36 – 55	41 (11,78)
	>55	38 (10,92)
Cidade*	Bauru	182 (52,3)
	Agudos	70 (20,11)
	Iacanga	28 (8,0)
	Barra Bonita	23 (6,6)
	Outros	45 (12,9)

*Dados obtidos no sistema de registro do LAC/USC

4.2. Pesquisa de *Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi*

Todas as 348 amostras de fezes de usuários do LAC colocadas para descarte foram igualmente analisadas para a pesquisa microscópica e molecular de *Blastocystis*

sp. No entanto, para *D. fragilis* e *E. bieneusi*, parasitas que requerem métodos especiais de coloração para o exame microscópico, apenas a detecção molecular foi realizada.

4.2.1. Identificação microscópica e detecção molecular de *Blastocystis* sp.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados relativos à identificação microscópica e molecular de *Blastocystis* sp. em amostras de fezes previamente processadas no LAC.

Tabela 2 – Detecção de *Blastocystis* sp. pelo exame microscópico de fezes e por PCR em 348 amostras encaminhadas para exame no Laboratório de Análises Clínicas (LAC)/USC, Bauru, SP, durante o período de setembro a dezembro de 2018.

Microscopia X Molecular (Nº/ %)			
		Molecular	
		Neg	Pos
Microscopia	Neg	179	99
		51.44	28.45
Pos		2	68
		0.57	19.54
Total		181	167
		52.01	47.99
P<0.0001			

Este parasita foi detectado em 20,1% (70/348) e 48% (167/348) dos indivíduos, baseando-se, respectivamente, no exame microscópico e na PCR, sendo que o último método apresentou maior percentual de positividade ($p<0,0001$). Além disso, ao se

calcular o coeficiente Kappa, o valor de 0,40 reflete uma concordância fraca entre esses métodos.

No que se refere à detecção molecular por PCR, a amplificação do fragmento correspondente ao gene SSUrRNA (Figura 7) foi observada em 97,1% (68/70) das amostras positivas pelo exame microscópico de fezes, sendo que apenas duas amostras foram negativas pela técnica molecular. Em relação às 278 amostras de DNA extraídas de fezes negativas para *Blastocystis* pelo exame microscópico, a eletroforese dos produtos de amplificação evidenciou a presença de banda em 35,6% (99/278) das amostras.



Figura 7. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Blastocystis* sp. PM: Padrão de pares de bases; C+: Controle positivo (fragmento de 600 pb); 307, 308, 311, 313: Amostras de fezes positivas; C-: Controle negativo.

De um total de 167 amostras positivas pela PCR, sequências nucleotídicas foram determinadas em 108, sendo que nas 59 amostras restantes, a concentração de DNA purificado foi inferior à quantidade estabelecida para as reações de sequenciamento (10 ng). Deste modo, considerando os resultados obtidos por microscopia e/ou a detecção molecular por PCR/sequenciamento, *Blastocystis* foi confirmadamente detectado em 31% (108/348) das amostras incluídas no estudo. A frequência nas amostras de fezes em relação ao sexo, idade e procedência dos usuários do LAC está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência de *Blastocystis* sp. em amostras de fezes encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC)/USC, Bauru, SP, durante o período de setembro a dezembro de 2018, segundo sexo, idade e procedência dos usuários do serviço.

Variáveis	Categoria	<i>Blastocystis</i> (108) ¹ nº (%)
Sexo	Feminino	64 (59,3)
	Masculino	44 (40,7)
Idade	0 – 4	7 (6,48) ^b
	5 – 9	35 (32,40) ^{z c}
	10 – 14	17 (15,74) ^a
	15 – 20	4 (3,70) ^b
	21 – 35	19 (17,6) ^a
	36 – 55	17 (15,74) ^a
	> 55	9 (8,33) ^b
Procedência	Bauru	54 (50,00)
	Agudos	29 (26,85)
	Iacanga	9 (8,33)
	Barra Bonita	3 (2,77)
	Outras	13 (12,03)

¹ PCR/sequenciamento ² P < 0,0001 (para idade, proporções seguidas da mesma letra não diferem ao nível de significância de 5%)

O parasita *Blastocystis* foi encontrado em amostra de indivíduos de ambos os sexos, porém a maioria pertencia ao sexo feminino (59,3%). Quanto à idade, o parasita foi observado em todas as faixas etárias, no entanto com maior frequência em amostras de fezes de indivíduos com idade variando de cinco a nove anos (32,4%). Quanto à procedência, a maioria das amostras positivas foi detectada em usuários residentes nos

municípios de Bauru e Agudos, que com maior frequência usam o serviço do LAC. Considerando as análises estatísticas, não foram detectadas associações entre frequência de *Blastocystis* sp e as variáveis comentadas anteriormente, exceto em relação à idade cuja frequência no grupo de usuários com idade entre cinco e nove anos foi significativamente ($p < 0,0001$) mais elevada (Tabela 3).

4.2.1.1. Diversidade genética dos isolados de *Blastocystis* sp.

O sequenciamento parcial do gene SSU-rRNA revelou a presença de sete subtipos (ST) distintos (Figura 8 e Apêndice A), a saber ST1 (n=44), ST2 (n=10), ST3 (n=49), ST4 (n=1), ST6 (n=2), ST7 (n=1) e ST9 (n=1). Em relação à distribuição dos subtipos, ST3 foi o subtipo mais prevalente (45,3, seguido de ST1 (40,7%), ST2 (9,2%), ST6 (1,9%) e por fim, os subtipos ST4, ST7 e ST9, todos identificados em 0,9% das amostras. Em todas as amostras observou-se apenas a presença de um único subtipo e, portanto, nenhuma infecção mista foi detectada.

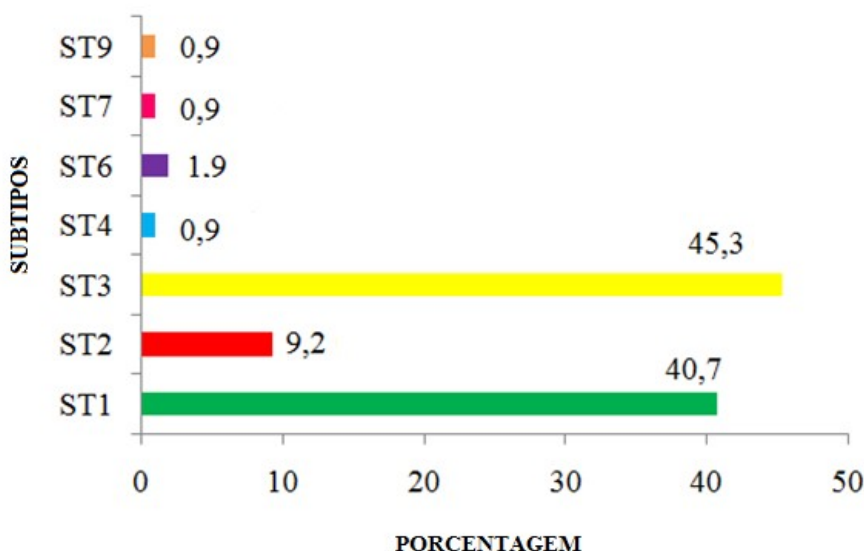


Figura 8- Frequência e distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. identificados em 108 amostras de fezes examinadas no LAC/USC, Bauru, SP.

Quanto à diversidade intrasubtipo, a análise dos alelos 18S revelou um total de 25 alelos diferentes dentro da população estudada: alelos 4, 87 e 141 para ST1; alelos 11, 12, 15, 67, 73, 138 para ST2; alelos 31, 34, 36, 37, 45, 49, 52, 55, 58, 59 e 135 para ST3; alelo 91 para ST4; alelos 125 e 134 para ST6 e alelo 137 para ST7 e alelo 129 para ST9 (Figura 9 e Apêndice A). Entre os subtipos predominantes destacou-se o alelo 4 (66%) de ST1, alelo 12 (40%) de ST2 e alelo 36 (26%) de ST3.

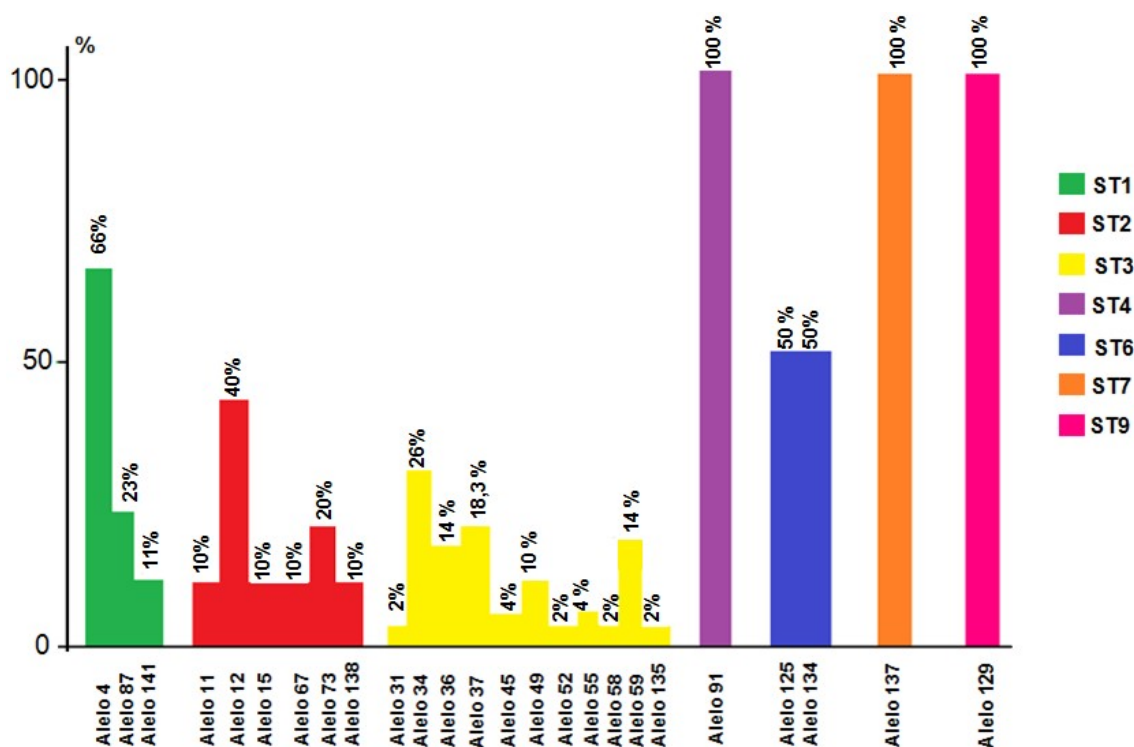


Figura 9. Frequência e distribuição dos alelos 18S dos subtipos de *Blastocystis* sp identificados em 108 amostras de fezes examinadas no LAC/USC, Bauru, SP.

A análise filogenética demonstrou uma clara distribuição dos isolados em sete subtipos distintos (Figura 10). Ao comparar as 108 sequências nucleotídicas geradas no presente estudo com sequências homólogas disponíveis no GenBank, 39,8% e 17,6% delas apresentaram, respectivamente, 100% e 99% de identidade com as sequências de referência. As sequências restantes apresentaram identidade variando de 92% a 98%. As sequências dos isolados identificados como ST4, ST6, ST7 e ST9 foram depositadas no GenBank sob os números de acesso MN944545-MN944549.

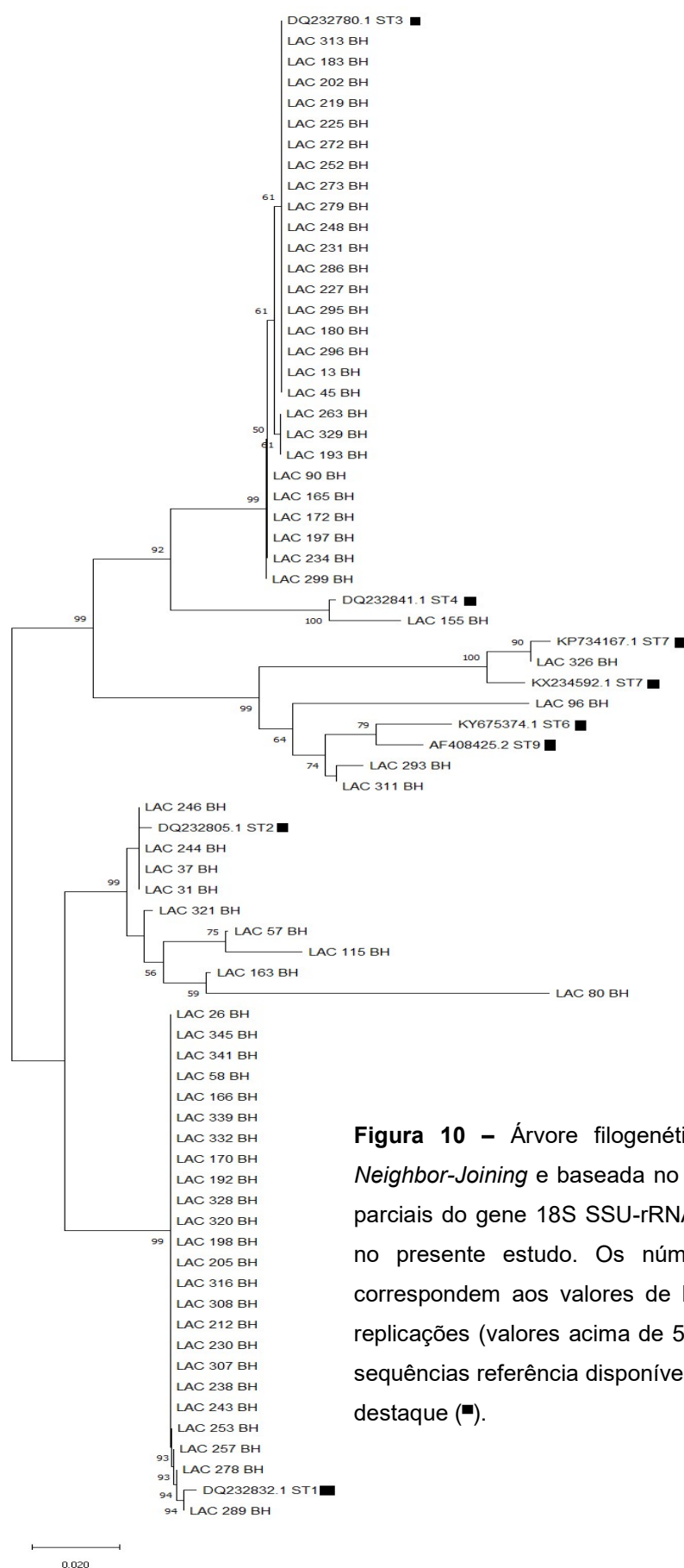


Figura 10 – Árvore filogenética construída pela análise *Neighbor-Joining* e baseada no alinhamento das sequências parciais do gene 18S SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. obtidas no presente estudo. Os números ao longo dos ramos correspondem aos valores de bootstrap obtidos para 1000 replicações (valores acima de 50% foram apresentados). As sequências referência disponíveis no GenBank aparecem em destaque (■).

4.2.2. Detecção molecular de *D. fragilis* e *E. bieneusi*

De um total de 348 amostras de DNA submetidas à PCR, a amplificação dos fragmentos gênicos (Figuras 11 e 12) nas reações para *D. fragilis* e *E. Bieneusi* foi observada, respectivamente, em oito e 16 amostras. Todos os 24 produtos de amplificação foram submetidos ao sequenciamento e geraram sequências nucleotídicas passíveis de análise. O diagnóstico molecular baseado na PCR/sequenciamento revelou 2,3% (8/348) e 4,6% (16/348) de amostras de fezes positivas para *D. fragilis* e *E. bieneusi*, respectivamente.

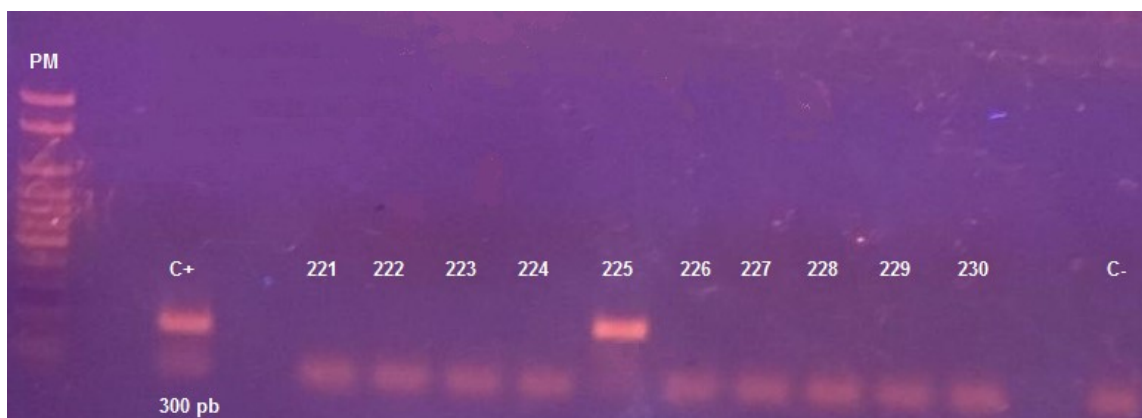


Figura 11. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *D. fragilis* PM: Padrão de pares de bases; C+: Controle positivo (fragmento de 300 pb); 221-224, 226-230: Amostras de fezes negativas; 225: Amostra de fezes positiva; C-: Controle negativo.

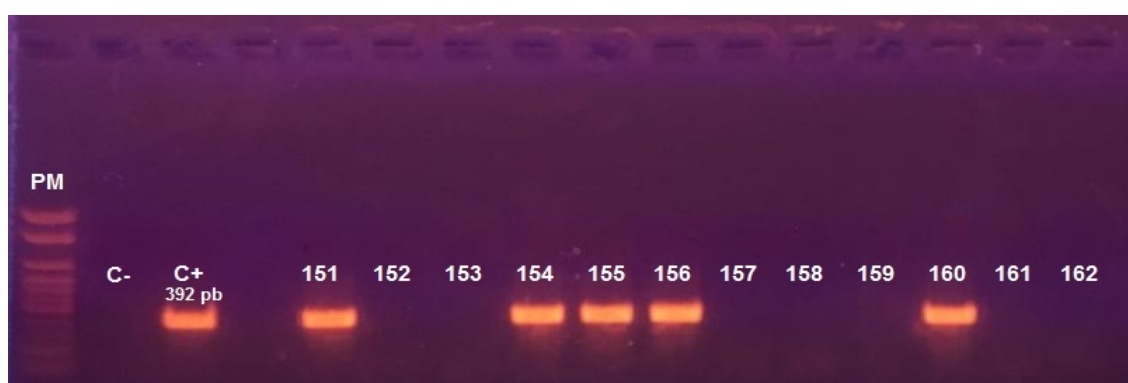


Figura 12 - Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *E. bieneusi*. PM: Padrão de pares de bases; C-: Controle negativo; C+: Controle positivo (fragmento de 392 pb); 151, 154-156, 160: Amostras de fezes positivas; 152, 153, 157-159, 161, 162: Amostras de fezes negativas.

Tabela 4 - Frequência de *Dientamoeba fragilis* em amostras de fezes encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC)/USC, Bauru, SP, durante o período de setembro a dezembro de 2018, segundo sexo, idade e procedência dos usuários do serviço.

Variáveis	Categoria	<i>D. fragilis</i> (08)*
		nº (%)
Sexo	Feminino	4 (50,0)
	Masculino	4 (50,0)
Idade	0 – 4	1 (12,50)
	5 – 9	5 (62,50)
	10 – 14	1 (12,50)
	15 – 20	-
	21 – 35	-
	36 – 55	1 (12,50)
	> 55	-
Procedência	Bauru	5 (62,50)
	Agudos	2 (25,00)
	Iacanga	1 (12,50)
	Barra Bonita	-
	Outras	-

*Apenas PCR/sequenciamento

A despeito do número reduzido de amostras positivas, isolados de *D. fragilis* e *E. bieneusi* foram similarmente detectados em amostras de fezes de indivíduos de ambos os sexos (Tabelas 4 e 5). Quanto à idade, *D. fragilis* foi observado principalmente em amostras de fezes oriundas de crianças de cinco a nove anos de idade, enquanto *E. bieneusi* foi observado tanto em amostras de crianças até 14 anos (50%) quanto de adultos jovens (25%) e de indivíduos com mais de 55 anos (25%). Quanto à procedência,

a maioria das amostras positivas era de indivíduos residentes no município de Bauru (Tabelas 4 e 5). Considerando as análises estatísticas, não foram detectadas associações entre a frequência desses parasitas nas amostras analisadas e as variáveis comentadas anteriormente.

Tabela 5. Frequência de *Enterocytozoon bieneusi* em amostras de fezes encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC)/USC, Bauru, SP, durante o período de setembro a dezembro de 2018, segundo sexo, idade e procedência dos usuários do serviço.

Variáveis	Categoria	<i>E. bieneusi</i> (16) [*]
		nº (%)
Sexo	Feminino	9 (56,25)
	Masculino	7 (43,75)
Idade	0 – 4	3 (18,75)
	5 – 9	3 (18,75)
	10 – 14	2 (12,50)
	15 – 20	-
	21 – 35	4 (25,0)
	36 – 55	-
	> 55	4 (25,00)
Procedência	Bauru	7 (43,75)
	Agudos	-
	Iacanga	1 (6,25)
	Barra Bonita	1 (6,25)
	Outras	7 (43,75)

^{*}Apenas PCR/sequenciamento

Quanto à caracterização molecular dos isolados de *D. fragilis*, todos os oito isolados foram identificados como genótipo 1. Todas as sequências nucleotídicas apresentaram 100% de identidade com sequências descritas anteriormente e depositadas no GenBank (Figura 13), bem como entre si. Essas sequências foram depositadas no Genbank sob os números de acesso MN920432-MN920439.

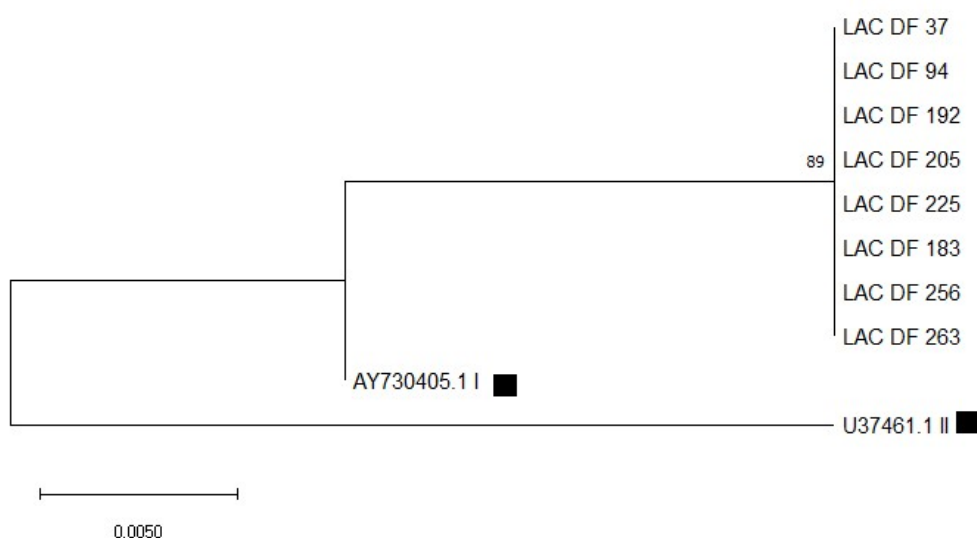


Figura 13 – Árvore filogenética construída pela análise *Neighbor-Joining* e baseada no alinhamento das sequências parciais do gene 18S SSU-rRNA de *D. fragilis* obtidas no presente estudo. Os números ao longo dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* obtidos para 1000 replicações (valores acima de 50% foram apresentados). As sequências referência disponíveis no GenBank aparecem em destaque (■).

Em relação à *Enterocytozoon bieneusi*, dos 16 isolados obtidos, 15 (93,8%) foram identificados como genótipo D e apenas um como genótipo A (6,2%). Entre os isolados do genótipo D, 60% (9/15) apresentaram sequências com identidade de 100% quando comparadas com sequências do GenBank, e entre elas. As sequências restantes apresentaram similaridade variando de 99,73 a 99,46%. O único isolado identificado como genótipo A apresentou identidade de 98,9% a 99,1% com sequências do banco de dados. Sequências representativas obtidas no presente estudo foram depositadas no GenBank sob

os números de acesso MN922358-MN922369. A Figura 14 mostra a árvore filogenética construída com os isolados do microsporídeo.

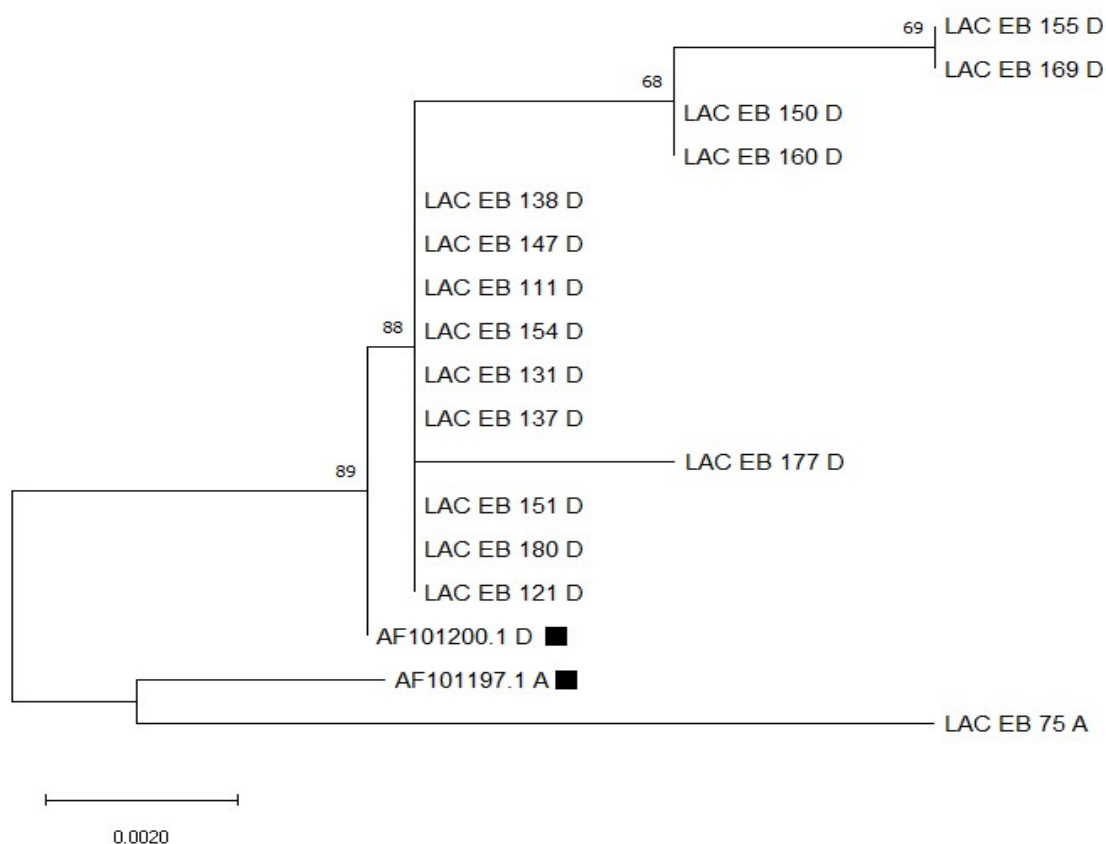


Figura 14 – Árvore filogenética construída pela análise *Neighbor-Joining* e baseada no alinhamento das sequências parciais do gene ITS de *E. bienewisi* obtidas no presente estudo. Os números ao longo dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* obtidos para 1000 replicações (valores acima de 50% foram apresentados). As sequências referência disponíveis no GenBank aparecem em destaque (■).

4.3. Georreferenciamento

4.3.1. *Blastocystis* sp.

A distribuição das amostras positivas para *Blastocystis* sp. nos municípios da DRS IV-Bauru e atendidos pelo LAC está apresentada na Figura 15. Como comentado

anteriormente, Bauru e Agudos se destacaram na relação amostras por município, sendo que de 108 amostras positivas por PCR/sequenciamento, 50% (54) e 26,8% (29) foram provenientes de indivíduos nesses municípios, respectivamente.

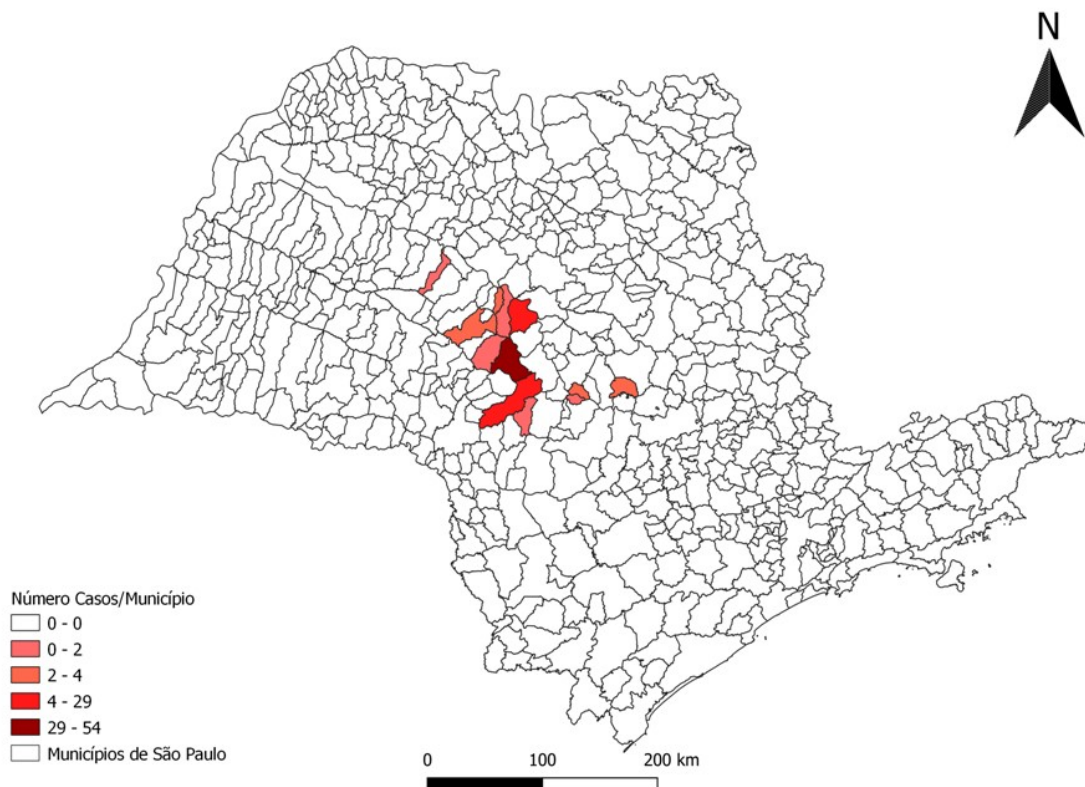


Figura 15 – Distribuição das amostras de fezes positivas para *Blastocystis* sp. provenientes de moradores de municípios da DRS VI-Bauru e encaminhadas para o LAC.

A partir de análise pelo estimador de Kernel, foram gerados os mapas de densidade das amostras positivas para *Blastocystis* provenientes de Bauru (Figura 16) e Agudos (Figura 17).

Em Bauru, o mapa demonstra a distribuição das amostras positivas em diferentes regiões administrativas da cidade. No entanto, as zonas “quentes” (áreas com tons mais escuros como o vermelho), indicando maior concentração de amostras positivas, foram observadas nas regiões que incluem os bairros Centro (D e E), Mary Dota (H), Redentor (F) e Jardim Godoy (I), que coincidem com as áreas mais densamente povoadas do município. Amostras positivas também foram detectadas em indivíduos residentes em

Tibiriçá (A), distrito rural do município que se localiza a 25 quilômetros do centro da cidade.

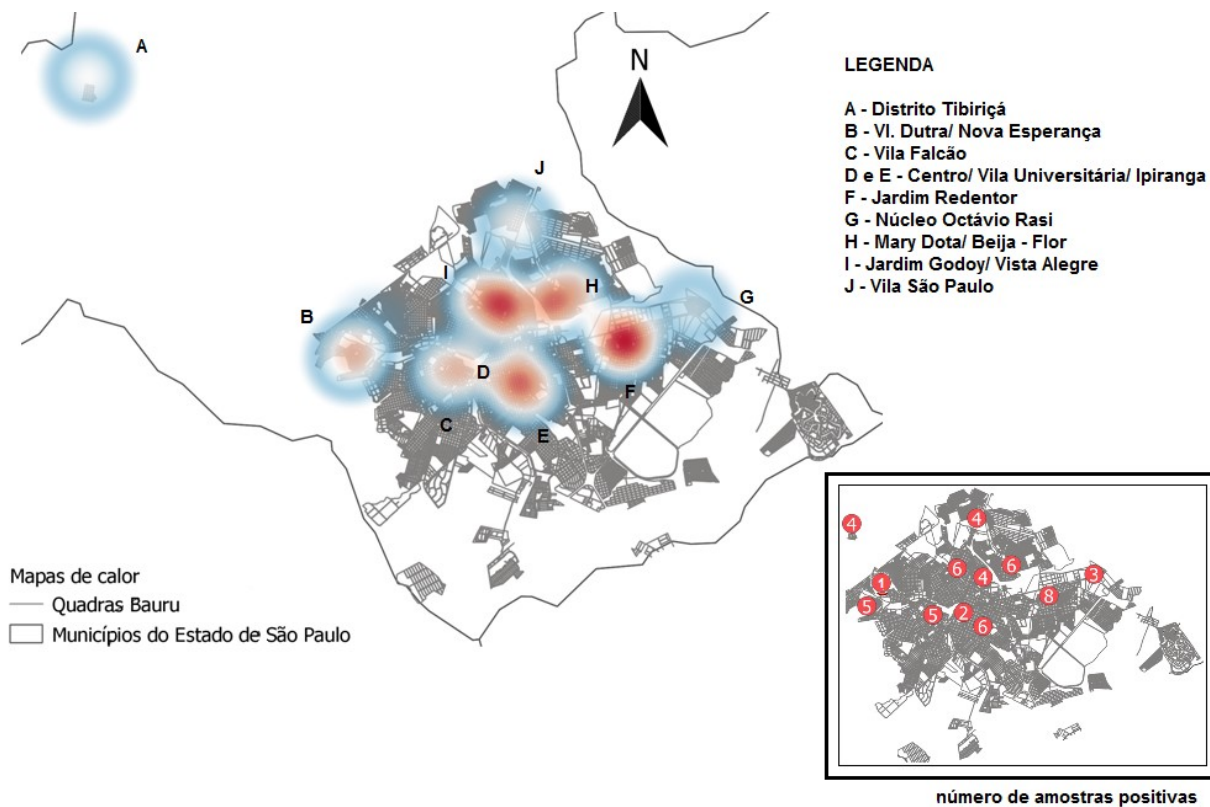


Figura 16 – Distribuição das amostras positivas para *Blastocystis* sp. provenientes do Município de Bauru, de acordo com a análise de densidade de Kernel. Letras maiúsculas indicam os bairros/distritos.

Quanto ao município de Agudos, da mesma forma, foi possível observar a distribuição das amostras positivas em grande parte da cidade, porém com maior densidade nas regiões do Centro (B), Jardim Europa (D) e Parque da Pampulha (E), áreas da cidade que concentram a maior parte da população (Figura 17). Além da área urbana, amostras positivas foram detectadas na área rural do município, no distrito de Domélia (H).

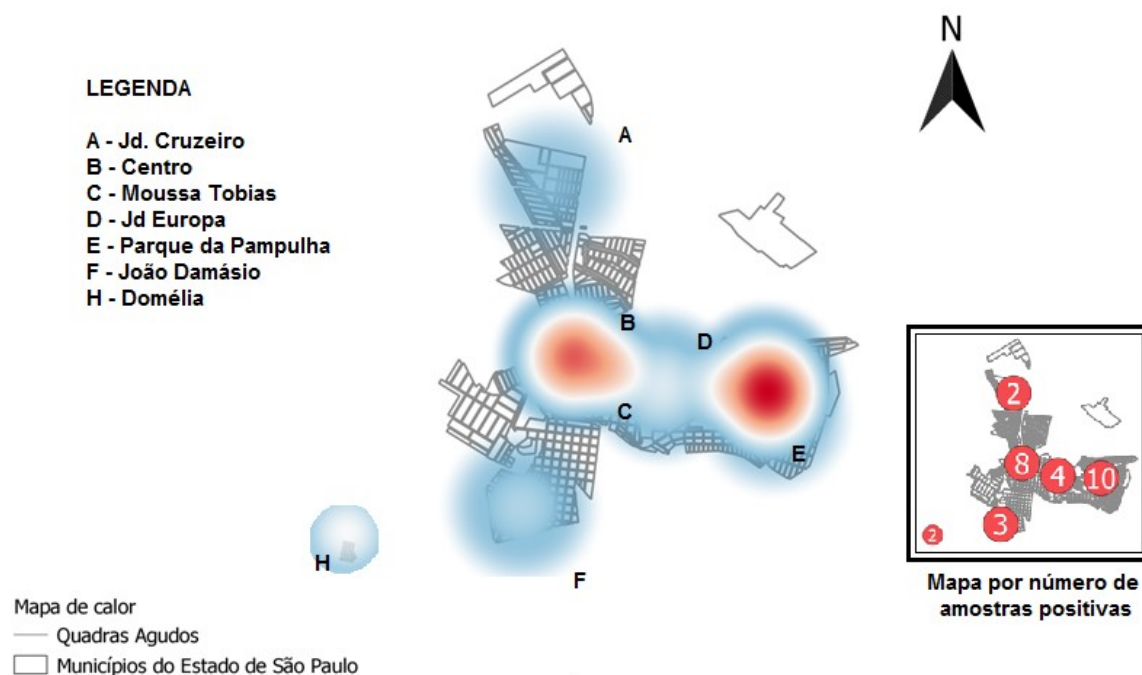


Figura 17– Distribuição das amostras positivas para *Blastocystis* sp. provenientes do Município de Agudos, de acordo com a análise de densidade de Kernel. Letras maiúsculas indicam os bairros/distritos.

No que se refere à distribuição dos subtipos de *Blastocystis*, segundo os municípios de procedência das amostras de fezes encaminhadas para o LAC (Figura 18), ST1 e ST3 foram observados em oito dos 11 municípios onde foram detectadas amostras positivas. Em menor escala, ST2 foi observado em amostras provenientes de duas cidades. Quanto aos subtipos menos frequentes, ST9 foi identificado em uma amostra de fezes de um morador de Bauru. Os subtipos ST4 e ST7 foram identificados em indivíduos de Bauru e Pirajuí, respectivamente. Já os dois isolados classificados como ST6 foram detectados em amostras provenientes de Bauru e Lacanga.

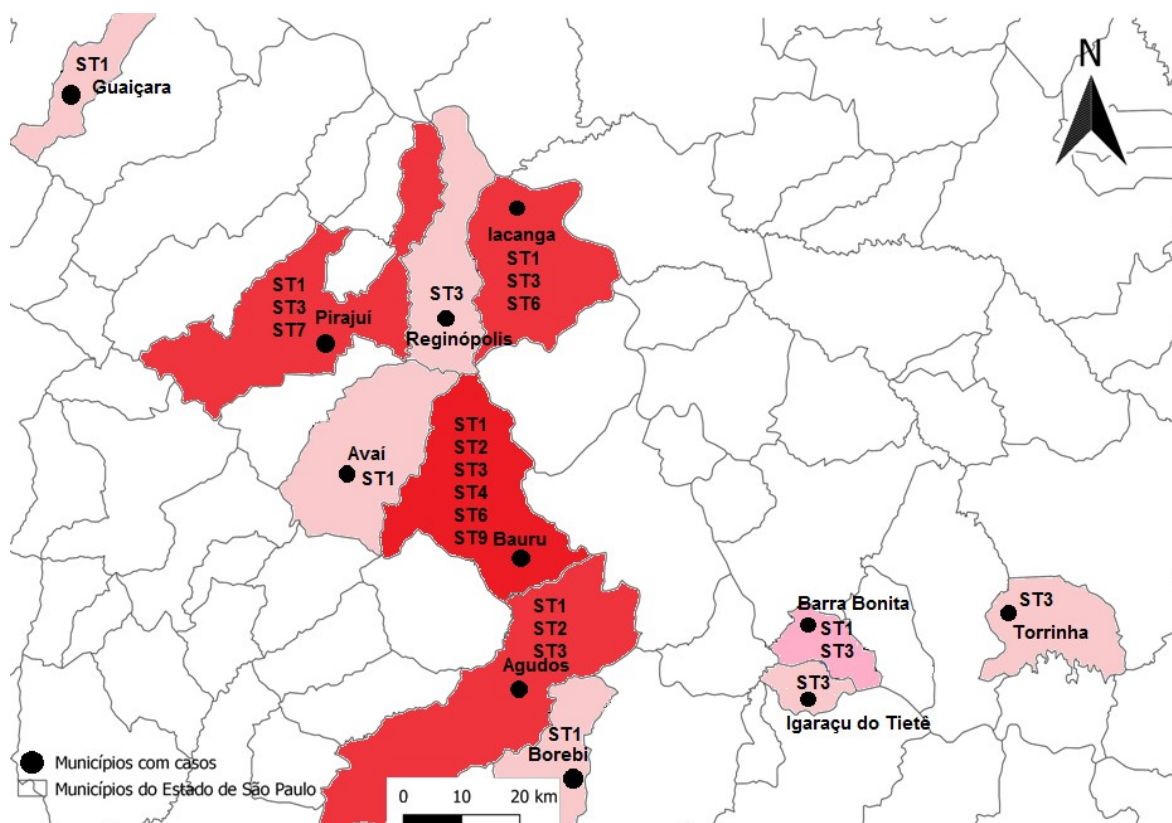


Figura 18 – Distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. de acordo o município de procedência das amostras de fezes encaminhadas para o LAC.

4.3.2. *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi*

Em relação à distribuição de *D. fragilis* e *E. bieneusi*, o reduzido número de amostras de fezes positivas possibilitou apenas apresentar a distribuição dos casos de acordo com os municípios de procedência das amostras encaminhadas ao LAC (Figura 19). Além de Bauru, isolados de *D. fragilis* foram detectados em amostras de indivíduos residentes em Agudos e Iacanga. Vale destacar que todos os isolados foram identificados como genótipo 1 e todos eram 100% idênticos.

Quanto a *E. bieneusi*, os isolados foram identificados em amostras provenientes de Bauru, Barra Bonita, Iacanga, Igarapu do Tietê, Pirajui e Torrinha. O único isolado classificado como genótipo A foi proveniente de amostra de Bauru. Entre os isolados

identificados como genótipo D, nove foram detectados em amostras provenientes de Bauru (3), Barra Bonita (1), Iacanga (1), Igarapu do Tietê (2), Pirajuí (1) e Torrinha (1) e apresentaram sequências nucleotídicas 100% idênticas entre elas.

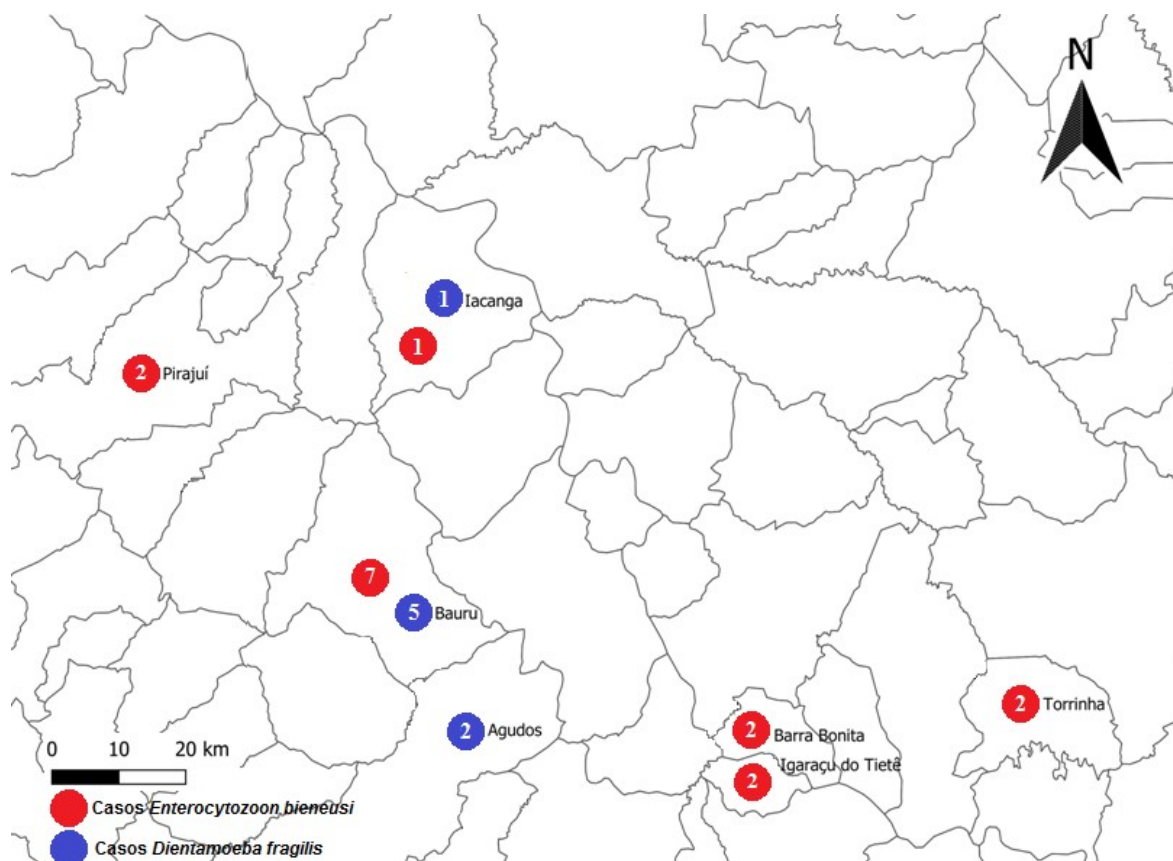


Figura 19 – Distribuição de *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bienersi* de acordo o município de procedência das amostras de fezes encaminhadas para o LAC.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Mesmo em pleno século XXI, as infecções por parasitas intestinais contribuem significativamente para a carga de doenças gastrointestinais em todo o mundo, em particular, nos países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias inadequadas e a indisponibilidade de tratamento eficiente da água favorecem a transmissão desses organismos. Nesses países, a despeito da relevância em Saúde Pública, os parasitas intestinais são frequentemente ignorados como causa de diarreia e outros transtornos gastrintestinais e, pouca atenção é dada ao diagnóstico laboratorial. Exemplo disso é o que se observa em relação ao diagnóstico dos protozoários *Blastocystis* sp. e *Dientamoeba fragilis* e do microsporídeo *Enterocytozoon bieneusi*, que normalmente não entram na rotina dos laboratórios clínicos, seja pelo desconhecimento dos profissionais das áreas médica e laboratorial e/ou pela falta de técnicas adequadas e sensíveis para a identificação em amostras de fezes. Com isso, a prevalência na população ainda é subestimada.

Sendo assim, no presente estudo, investigamos a frequência de *Blastocystis* sp., *D. fragilis* e de *E. bieneusi* em amostras de fezes encaminhadas para exame de rotina em um laboratório clínico de referência no município de Bauru, São Paulo. Além disso, verificamos a diversidade genética dos isolados de cada parasita detectados nas amostras clínicas.

Considerando os resultados relativos à pesquisa de *Blastocystis*, o parasita foi detectado em 20,1% (70/348) e 48% (167/348) das amostras analisadas, respectivamente, no exame microscópico e na PCR. Sendo assim, a PCR possibilitou a detecção de maior número de amostras positivas ($p < 0,0001$), o que vai de encontro às observações feitas em outros estudos empregando microscopia óptica e técnicas moleculares baseadas na PCR para o diagnóstico de *Blastocystis*. Em estudo desenvolvido por SEYER e colaboradores em 2017, a frequência de *Blastocystis* em

230 indivíduos pela microscopia e PCR foi de 10,5% e de 27,8%, respectivamente. Em outro levantamento, MOHAMED e colaboradores (2017) avaliaram 1.262 amostras fecais e detectaram o parasita em 10,5% e 6,6% das amostras analisadas por PCR e microscopia, respectivamente. Esta diferença também já foi observada em estudos anteriores realizados no Brasil (DAVID et al., 2015; OLIVEIRA-ARBEX et al., 2016; OLIVEIRA-ARBEX et al., 2018). Assim, em 126 moradores de duas comunidades ribeirinhas às margens do Rio Tietê, *Blastocystis* foi detectado em 7,9% e 53,2% das amostras de fezes analisadas por microscopia e PCR, respectivamente (DAVID et al., 2015). Interessantemente, em 2016, OLIVEIRA-ARBEX e colaboradores ao realizar o exame microscópico de 181 amostras fecais de crianças e adultos de uma comunidade de baixa renda detectaram *Blastocystis* em 8,9% das amostras (OLIVEIRA-ARBEX et al., 2016). Posteriormente, quando essas mesmas amostras foram submetidas à PCR, os autores observaram que 40,7% foram positivas para este parasita (OLIVEIRA-ARBEX et al., 2018). Diante dessas observações, ressalta-se que no exame microscópico, nem sempre o treinamento técnico é suficiente para a identificação precisa de *Blastocystis*, havendo a necessidade de técnicas mais sensíveis para a detecção deste protozoário em amostras de fezes.

Em nosso estudo, mesmo que em menor proporção, o exame microscópico possibilitou detectar 20% de amostras positivas, previamente processadas em um laboratório clínico. Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial de *Blastocystis* ainda é realizado pelo exame parasitológico de fezes frescas ou conservadas, empregando técnicas de concentração ou pelo exame direto. No entanto, melhores resultados podem ser obtidos quando são empregadas técnicas de colorações permanentes, como hematoxilina férrica ou tricômio (AMATO-NETO et al., 2009). Vale destacar que técnicas amplamente utilizadas em laboratórios clínicos, como os métodos de flutuação com sulfato de zinco ou sedimentação espontânea com água não são muito eficientes para o diagnóstico de *Blastocystis*, pois o contato com o sulfato de zinco e com a água, causa lise do parasita presente em amostras de fezes frescas, como a

maioria recebida nos laboratórios para análise (AMATO-NETO et al., 2009). Como esse parasita é polimórfico e diferentes formas podem ser detectadas nas fezes, a inexperiência técnica também pode comprometer o diagnóstico preciso das infecções.

No que se refere à PCR, a amplificação do fragmento correspondente ao gene SSU rRNA foi observada em 68 das 70 amostras positivas pelo exame de fezes, sendo que apenas duas amostras foram negativas pela PCR. Mesmo tendo sido muito baixa, a ocorrência de falso-negativos pela PCR pode ser uma consequência da presença de inibidores nas amostras fecais que interferem na interação do DNA com a DNA polimerase inibindo a reação de amplificação, e assim reduzindo a sensibilidade da PCR. Mesmo empregando kit de extração, muitas vezes essas substâncias não são totalmente eliminadas da amostra de DNA, especialmente em amostras de fezes que, de modo geral, apresentam uma grande diversidade e altas concentrações dessas substâncias (GONÇALVES et al., 2008).

Em relação às 278 amostras de DNA extraídas de fezes negativas para *Blastocystis* pelo exame microscópico, a eletroforese dos produtos de amplificação evidenciou a presença de banda em 99 (35,6%) das amostras. Essa situação poderia ser atribuída à baixa concentração de formas parasitárias nas amostras de fezes, dificultando e subestimando a detecção da infecção pelo exame microscópico de fezes. Estudos que analisam a intensidade da infecção por *Blastocystis* sp. pelo exame microscópico mostraram porcentagens mais altas de amostras de fezes com poucos a moderados parasitas do que aquelas com abundância de parasitas (LEDER et al., 2005; ÖZYURT et al., 2008). Além disso, a eliminação das formas parasitárias nas fezes não ocorre de forma contínua e o exame de uma única amostra de fezes pode gerar resultados falso-negativos. Vale destacar que as amostras fecais foram coletadas no dia seguinte à análise feita pelo laboratório clínico e não possuíam conservantes, fator que pode ter causado ruptura das formas, e consequentemente levando à resultados falso-negativos.

Apesar da amplificação de 167 amostras, a determinação da frequência de *Blastocystis* baseou-se nos resultados do exame microscópico e da PCR/sequenciamento. Com isso, foi possível confirmar a presença de *Blastocystis* em 31% (108/348) das amostras incluídas no estudo. Atualmente, *Blastocystis* sp. é um dos parasitas mais frequentemente observados em amostras de fezes de indivíduos residentes em diferentes regiões, especialmente nos países em desenvolvimento. A sua distribuição é ampla e as taxas de prevalência normalmente variam entre 0,5 e 62%. Na América do Sul, por exemplo, levantamentos epidemiológicos revelaram taxas de infecção variando de 15% até 50% (REBOLLA et al., 2016; RAMIREZ et al., 2017; FARIA et al., 2017; SANCHEZ et al., 2017; MELO et al., 2017). Recentemente, em uma revisão sistemática e meta-análise de estudos de prevalência de *Blastocystis* sp. no Brasil, ZANETTI e colaboradores (2020) compilaram dados obtidos em levantamentos envolvendo diferentes hospedeiros. A busca não teve limites em relação à data de início e foi concluída em fevereiro de 2019. Nesse levantamento, os autores constataram que na população humana, a prevalência variou de 0,30% a 83,4%. No geral, foi estimada uma prevalência agrupada de 24% no Brasil e de 33% no Estado de São Paulo.

No que se refere à *D. fragilis* e *E. bienersi*, infecções foram observadas em 2,3% (8/348) e 4,6% (16/348) das amostras incluídas no estudo, respectivamente. Essas frequências não divergem das taxas observadas em diferentes regiões, inclusive nos países em desenvolvimento. No presente estudo, apenas a PCR foi empregada para a detecção desses dois parasitas, pois o exame microscópico requer métodos especiais de coloração, que muitas vezes dependem da coleta das amostras em substâncias fixadoras. Como o trabalho incluiu amostras não fixadas e descartadas pelo laboratório após os exames de rotina, essa conduta não foi possível.

Infecções humanas por *D. fragilis* têm sido relatadas em países de todos os continentes, especialmente nos países industrializados. Com base em diferentes

procedimentos diagnósticos, a prevalência varia de 0,2% a 82% e, ao contrário do observado para outros protozoários intestinais, é geralmente mais alta nos países desenvolvidos (STARK et. al., 2016; CACCIÒ, 2018; BOUGHATTAS et al., 2017; AL-HINDI et al., 2019). Quando apenas estudos epidemiológicos moleculares são levados em consideração, prevalência maior que 20% tem sido observada em várias regiões do mundo, incluindo países da Europa, Oriente Médio e América do Sul (CACCIÒ, 2018). Em um estudo envolvendo os moradores de duas comunidades ribeirinhas do rio Tietê, no Estado de São Paulo, *D. fragilis* foi detectada por PCR/sequenciamento em 15,1% das amostras de fezes desses indivíduos (DAVID et al., 2015).

Quanto a *E. bieneusi*, estudos epidemiológicos têm demonstrado que, nos países em desenvolvimento, a prevalência de infecção por este parasita pode variar de 2,5% a 58%, entretanto vai depender se os levantamentos epidemiológicos envolvem indivíduos com imunossupressão ou não (MATOS et al., 2012). Entre 17 espécies de microsporídeos patogênicos para o ser humano, o *E. bieneusi* é o mais prevalente e responsável por infecções oportunistas em pacientes com AIDS e outros indivíduos imunocomprometidos como receptores de transplante de órgãos, crianças e idosos (MATOS et al., 2012). No Brasil, ainda são poucos os estudos de prevalência na população humana, mas taxas de 5%, 27,5% e 46,1% já foram observadas em pacientes HIV+ (Brasil, 1996, 2000; WUHIB et al., 1994). Vale ressaltar que, devido às limitações do método microscópico para detectar os esporos diminutos desse microrganismo, hoje em dia é comum a aplicação de métodos moleculares sensíveis para fins de diagnóstico (GHOYOUNCHI et al., 2019).

Vale destacar que é difícil comparar as taxas de prevalência observadas em diferentes levantamentos realizados para a pesquisa de *Blastocystis*, *D. fragilis* e *E. bieneusi*, devido às diferenças consideráveis nos métodos de diagnóstico empregados, nas amostras analisadas, nas localizações geográficas, nos grupos populacionais investigados e nas características dos indivíduos pacientes (sexo, idade, condições socioeconômicas, status imunológico e características clínicas). No

presente estudo, todos os parasitas foram detectados em amostras de fezes de indivíduos de ambos os sexos e entre crianças, jovens e adultos, incluindo crianças com menos de cinco anos e adultos com idade acima de 55 anos. No entanto, os três parasitas foram detectados em amostras positivas de indivíduos com idade variando de zero a 14 anos. Embora as infecções por parasitas intestinais possam acometer indivíduos de todas as idades, é maior a vulnerabilidade de crianças em idade pré-escolar e escolar. Essa fase inclui crianças que se expõem às infecções em uma idade em que, além de serem imunologicamente imaturas, apresentam hábitos tais como levar as mãos e objetos à boca, não praticar a lavagem das mãos e o contato interpessoal muito próximo, que favorecem a disseminação das infecções (NESTI; GOLDBAUM, 2007). Mesmo que o ciclo biológico dos parasitas estudados ainda não tenha sido completamente elucidado, o mecanismo de infecção ocorre por via fecal-oral, seja de forma indireta, pela ingestão de água e alimentos contaminados, ou de forma direta, de pessoa a pessoa por meio das mãos sujas.

No que diz respeito a caracterização molecular dos isolados de *Blastocystis* sp. obtidos no presente estudo, o sequenciamento parcial do gene SSU-rRNA revelou os subtipos ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7 e ST9, sendo ST3 o subtipo dominante (45,3%), seguido de ST1 (40,7%) e ST2 (9,2%). A distribuição dos subtipos de *Blastocystis* foi bastante semelhante à relatada em pesquisas anteriores realizadas em diferentes regiões do mundo, nas quais a maioria das infecções humanas tem sido atribuída aos STs 1, 2 e 3. Até o presente, nove subtipos já foram encontrados parasitando humanos, no entanto, 90 a 95% dessas infecções estão associadas aos subtipos ST1 a ST4, com predomínio de ST3 (STENSVOLD E CLARK, 2016). O predomínio de ST3 tem sido observado em diferentes áreas geográficas e populações, inclusive na América do Sul (DAVID et al., 2015; MELO et al., 2017; RAMIREZ et al., 2016; SÁNCHEZ et al., 2017). Embora ST1 não tenha sido o subtipo mais prevalente na população estudada, sua prevalência (40,7%) foi relevante. A predominância desse subtipo tem sido relatada em investigações realizadas em particular na África (FORSELL et al., 2016), Ásia (SANPOOL et al., 2017) e

em alguns países da América Latina como Brasil, Colômbia e México (MALHEIROS et al., 2011; OLIVEIRA-ARBEX et al., 2018; RAMIREZ et al., 2014; VILLEGAS-GÓMEZ et al., 2016;). Com relação a ST2, este é um dos subtipos comuns em infecções humanas, mas, curiosamente, em alguns estudos, ele tem sido detectado em taxas mais baixas do que ST1 e ST3 ou pode estar ausente em uma dada população (PANDEY et al., 2015; VILLEGAS-GÓMEZ et al., 2016).

Além disso, vale destacar a presença de ST4, subtipo que ainda é raramente detectado em populações humanas da América do Sul, como observado anteriormente (DAVID et al., 2015; MALHEIROS et., 2011; MELO et al. al., 2017; OLIVEIRA-ARBEX et al., 2018; PENA et al., 2019). No Brasil, apesar de ser um dos subtipos menos prevalentes (ZANETTI et al., 2020), já foi detectado na população humana nos estados de São Paulo (MELO et al., 2019) Paraná (SEGUI et al., 2018) e no Rio de Janeiro (BARBOSA et al., 2018). ST4 apresenta uma distribuição restrita, sendo raro ou ausente na América do Sul, Norte da África e Oriente Médio, entretanto é o segundo subtipo mais comum, após o ST3, na Europa (STENSVOLD E CLARK, 2016). No entanto, ultimamente, sua presença tem sido esporadicamente relatada na população humana na Colômbia, mas sempre em baixas frequências (RAMIREZ et al., 2016, 2017; SÁNCHEZ et al., 2017). Não está claro porque o ST4 é incomum ou ausente fora dos países europeus, porém, segundo CLARK e colaboradores (2013), a homogeneidade genética intra-ST4 em comparação com os subtipos 1, 2 e 3 têm levado à especulação de que ST4 passou a circular na população humana muito mais recentemente do que os outros subtipos.

Outro ponto que merece ser destacado, diz respeito à presença de infecção humana pelos subtipos ST6 e ST7, uma vez que esses subtipos são geralmente encontrados em aves e ocasionalmente, têm sido associados a infecções humanas (CLARK et al., 2013; STENSVOLD et al., 2009). Ainda há poucos dados disponíveis sobre infecções humanas com ST6 e ST7, no entanto, sua presença já foi observada na África (FORSELL et al., 2016), Ásia (SANPOOL et al., 2017) e, mais recentemente, na

América do Sul (DAVID et al., 2015; MELO et al., 2017; OLIVEIRA-ARBEX et al., 2018; RAMIREZ et al., 2016, 2017; SÁNCHEZ et al., 2017).

Além de todos esses subtipos, ST9 foi identificado em uma das amostras. Este subtipo parece estar relacionado estritamente a humanos (STENSVOLD E CLARK, 2016), pois nenhum estudo encontrou tal subtipo em amostras não-humanas. Além disso, poucos estudos têm observado este subtipo nas amostras pesquisadas, e sua ocorrência na população é incomum (STENSVOLD E CLARK, 2016).

Quanto à diversidade genética intrasubtipo, 25 alelos foram identificados, dos quais os alelos 4 (ST1), 12 (ST2) e 34 (ST3) foram os mais prevalentes. Os alelos identificados no presente estudo, já foram relatados como variantes comuns relacionadas a infecções humanas em outros grupos populacionais, inclusive na América do Sul (DAVID et al. , 2015; OLIVEIRA-ARBEX et al., 2018; RAMIREZ et al., 2016, 2017; POULSEN et al., 2016; SÁNCHEZ et al., 2017; SILVA et al., 2020). O grau de diversidade dentro dos subtipos é muito variável. Entre os subtipos mais bem conhecidos, ST3 é provavelmente aquele que apresenta maior heterogeneidade das sequências nucleotídicas de SSU-rRNA, enquanto ST4 é o mais o homogêneo, principalmente os isolados associados a infecções humanas (STENSVOLD; CLARK, 2016). À semelhança do que se observa com os subtipos, a ocorrência de alelos dentro de uma dada população é variável (SCANLAN et al., 2014). Segundo alguns autores, comparar os subtipos e seus respectivos alelos isolados em certos grupos de hospedeiros pode fornecer informações relevantes para uma melhor compreensão sobre a transmissão de *Blastocystis* (ANDERSEN; STENSVOLD, 2016).

No que se refere à diversidade genética dos isolados de *Dientamoeba fragilis*, no presente estudo, todos os isolados foram identificados como genótipo 1. Até o momento, apenas dois genótipos de *D. fragilis* (1 e 2) foram descritos, dos quais o genótipo 1 predomina amplamente em todo o mundo. À semelhança de outros estudos, a raridade do genótipo 2 chama a atenção. Segundo alguns autores, essa prevalência muito baixa

sugere que os humanos não são o hospedeiro natural desse genótipo, e que uma rota zoonótica envolvendo um reservatório animal desconhecido pode estar envolvida no genótipo 2 (CACCIÒ et al., 2016). As sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo foram ideênticas às sequências descritas anteriormente e depositadas no GenBank, bem como entre elas próprias. Isso não é uma surpresa, pois, além da pequena variabilidade genética nas sequências de rRNA da SSU, fazendo com que os genótipos 1 e 2 compartilhem ~97% de similaridade nesse *locus*, é muito pequena também a variabilidade observada entre isolados do genótipo predominante 1 (CACCIÒ et al., 2012).

Em relação à *E. bieneusi*, dos 16 isolados obtidos, 15 (93,8%) foram identificados como genótipo D e apenas um como genótipo A (6,2%). Até o momento, o filo Microsporidia é composto por aproximadamente 1.200 espécies, sendo que pelo menos 14 espécies de microsporídeos já foram associadas a infecções humanas (SANTÍN & FAYER, 2011). Entre essas espécies, *E. bieneusi* é uma das mais prevalentes sendo responsável por mais de 90% dos casos de microsporídios e em humanos, podendo determinar infecções sintomáticas ou assintomáticas em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes (MATOS et al., 2012). Atualmente, a genotipagem baseada em ITS é o método padrão para comparar com precisão isolados de *E. bieneusi*, pois apresenta alto grau de variabilidade. Com base na análise de sequências obtidas para esse marcador, mais de 450 genótipos já foram identificados em humanos e em uma grande variedade de outros mamíferos e aves (LI; FENG; SANTÍN, 2019). Para organizar a diversidade genética e as relações entre os isolados de *E. bieneusi* de várias fontes, uma extensa análise filogenética de todos os genótipos de ITS válidos foi realizada e identifica 11 principais grupos genéticos (Grupo 1 ao Grupo 11), com níveis variados de especificidade quanto ao hospedeiro (LI; FENG; SANTÍN, 2019).

Pelo menos 70 genótipos estão associados a infecções humanas, dos quais 33 são considerados zoonóticos (YANG et al., 2016). O genótipo D (sin. CEbc, PigEBITS9, WL8, Peru9 e PtEb VI) tem sido comumente observado em infecções humanas e possui

ampla distribuição geográfica (MATOS et al., 2012). Pertence ao grupo 1 (subgrupo 1A) e já foi relatado em humanos na América do Sul, inclusive no Brasil, África, Ásia e Europa (MATOS et al., 2012; LI; FENG; SANTÍN, 2019). Além de humanos, esse genótipo já foi detectado em pelo menos 15 espécies de animais, mas predominando as infecções em suínos (YANG et al., 2016). Além de isolados associados às infecções em animais, esse genótipo foi recentemente detectado em amostras ambientais como água de esgotos (YAMASHIRO et al., 2017). O genótipo A também tem sido frequentemente observado em infecções humanas, inclusive em populações da África, Ásia e Europa, e em primatas não humanos, cães e aves (LI; FENG; SANTÍN, 2019). Apesar de ter sido identificado em uma única amostra analisada no presente estudo, até o momento no Brasil, não há relato do encontro desse genótipo em infecções humanas.

A combinação de estudos epidemiológicos com técnicas de genotipagem, sem dúvida, tem contribuído para ampliar o conhecimento, não apenas sobre a ocorrência e prevalência dos isolados de *Blastocystis* sp. *D. fragilis* e *E. bienersi* associados às infecções humanas em diferentes grupos da população, mas também para fornecer informações sobre a circulação dos parasitas nesses grupos seja por vias antroponóticas ou zoonóticas.

Com relação ao georreferenciamento, técnicas de análise espacial e geográfica têm sido auxiliares em diferentes estudos epidemiológicos. Com essas ferramentas, é possível investigar correlações entre o objeto de estudo e seu ambiente de origem, analisar variáveis que possam explicar fatores de risco e compreender a dinâmica de distribuição das doenças. Incorporar a análise de padrões espaciais em estudos epidemiológicos torna-se importante por possibilitar o entendimento dos processos de difusão das doenças (MAGALHÃES, 2012).

No entanto, a análise de dados espaciais para ser realizada depende de como esses dados serão apresentados. No presente estudo, as análises possibilitaram apenas uma apresentação mais ilustrativa da distribuição dos parasitas em estudo, principalmente dos isolados de *Blastocystis* sp. que foram detectados em maior

número. Entre os fatores que dificultaram uma análise epidemiológica mais detalhada dos padrões de distribuição, foi justamente a falta do endereço ou do código de endereçamento postal (CEP) da residência de origem de cada amostra de fezes incluída no estudo, impossibilitando assim obter uma ligação mais pontual do endereço com a base cartográfica digital. No presente estudo, por questões éticas, apenas a informação sobre a Unidade Básica de Saúde (UBS) que recebeu e encaminhou as amostras de fezes dos pacientes ao LAC foi disponibilizada. Mesmo sabendo que cada UBS atende aos moradores de uma determinada região do município, a falta do endereço específico interfere na qualidade das informações que se espera com o geoprocessamento.

Mesmo assim, alguns pontos merecem ser destacados e comentados. Em relação à distribuição de *D. fragilis* e *E. bieneusi*, o reduzido número de amostras possibilitou apenas que fosse apresentada a distribuição dos isolados de acordo com os municípios de procedência das amostras encaminhadas ao LAC. No que diz respeito a *Blastocystis* sp., especialmente em Bauru e Agudos que se destacaram na relação número de amostras por município, as amostras positivas se distribuíram em diferentes regiões administrativas das cidades, porém a maior concentração dessas amostras foi observada nas áreas mais densamente povoadas de cada cidade, onde inclusive há uma maior demanda por exames clínicos nas UBSs. Apesar dessa relação, vale destacar que se uma maior densidade populacional estiver associada à falta de condições adequadas de saneamento básico, déficit de cuidados de higiene pessoal e baixo desenvolvimento socioeconômico, o risco de disseminação e transmissão dos parasitas intestinais aumenta, tornando a população nessas áreas mais vulnerável às infecções (FARIA et al., 2017).

Considerando a diversidade genética dos isolados de *Blastocystis* sp. e a distribuição nos diferentes municípios de procedência das amostras, maior diversidade foi observada em Bauru e Agudos, onde a frequência de amostras positivas também

foi maior. Nessas cidades, os três subtipos mais frequentemente associados às infecções na população humana, isto é, ST1, ST2 e ST3, foram identificados. Nos municípios com menor frequência de amostras positivas, dois ou pelo menos um desses subtipos, também foram identificados.

Como mencionado anteriormente, os subtipos ST1, ST2 e ST3 estão associados à maioria das infecções na população humana. No entanto, com frequência, têm sido detectados em outros hospedeiros, mais frequentemente em outras espécies de primatas, mas também em várias espécies de mamíferos de produção como suínos, bovinos e caprinos, além de roedores e até mesmo espécies de aves (STENSVOLD; CLARK, 2016). Com isso, subtipos que circulam tanto em humanos como em animais demonstram baixa especificidade de hospedeiro, o que certamente aumenta a transmissibilidade dos isolados dos animais para humanos e vice-versa. No presente estudo, exceto Bauru, cidade mais urbanizada e cuja população estimada é 374.272 habitantes, todos os outros municípios (população variando de cerca de 2600 a 36000) são menos populosos e mantêm características mais interioranas e rurais. É possível inferir que essas condições favoreçam o contato maior com os animais que geralmente circulam próximos aos domicílios. Inclusive nesse contexto, a detecção de alguns isolados ST6 e ST7 em amostras procedentes de três desses municípios (Iacanga e Pirajuí) reforça essa especulação, pois esses subtipos geralmente estão associados a infecções em aves e, eventualmente têm sido detectados em humanos. Por outro lado, a detecção, de um isolado ST9 em amostra de indivíduo de Bauru, sugere que nos centros urbanos, a transmissão pessoa-pessoa de *Blastocystis* seja uma via frequente, já que, até o presente, esse subtipo só foi encontrado em humanos.

Diante da grande variabilidade genética de *Blastocystis* sp., as possibilidades de transmissão são muitas, incluindo o contato direto com animais, podendo ocorrer de animais para animais, humanos para humanos e, possivelmente, de animais para

humanos e ainda, indiretamente por meio da contaminação do ambiente, alimentos ou da água.

É importante destacar que as observações feitas no presente estudo fornecem informações relevantes sobre os parasitas intestinais *Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis* e *Enterocytozoon bieneusi*. No entanto, é pertinente comentar que, por questões éticas, o laboratório clínico manteve em sigilo informações como o endereço dos paciente e as doenças e/ou condições clínicas que justificavam a indicação do exame de fezes, impossibilitando assim uma análise mais detalhada por georreferenciamento e o estabelecimento de qualquer tipo de associação dos parasitas e respectivos genótipos com possíveis aspectos clínicos dos pacientes.

É inegável que essa conduta implicou em limitações no estudo, mas não invalida o mérito das informações reunidas que além de somar ao conhecimento, reforçam o fato de que a despeito da relevância de *Blastocystis* sp., *D. fragilis* e *E. bieneusi*, a determinação precisa das infecções na população humana ainda é limitada e pode estar associada a fatores tais como (1) embora o exame microscópico de fezes seja a principal alternativa para a pesquisa de parasitas intestinais em amostras de fezes nos laboratórios clínicos de rotina, o uso da microscopia para detectar esses parasitas tem utilidade limitada; (2) a pesquisa desses parasitas nas fezes ainda é rara quando os pacientes apresentam quadros de diarreia; (3) o fato de que até o momento esses parasitas são considerados por muitos clínicos como organismos sem importância, inclusive por falta de conhecimento dos mesmos e (4) a falta de técnicas sensíveis e profissionais treinados nos laboratórios clínicos para identificar os parasitas em questão.

Assim sendo, a presença de *Blastocystis* sp., *D. fragilis* e *E. bieneusi* em amostras de fezes encaminhadas para um laboratório clínico chama a atenção para a necessidade de inclusão desses parasitas nos exames de rotina. Com isso, identificar a presença desses parasitas na população humana torna-se importante medida para a

prevenção e controle das infecções principalmente nos países em desenvolvimento, além do que possibilita o conhecimento sobre aspectos como prevalência em diferentes grupos, dinâmica de transmissão e os possíveis fatores de risco envolvidos na exposição ao parasita.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- O diagnóstico microscópico de fezes subestima a prevalência da infecção por *Blastocystis* sp., enquanto a detecção baseada na PCR possibilita uma identificação mais segura, demonstrando ser uma técnica mais sensível.
- Crianças com menos de 10 anos demonstraram ser o grupo mais susceptível a infecção por *Blastocystis* sp.
- A caracterização molecular dos isolados de *Blastocystis* sp., *D. fragilis* e *E. bieneusi* revelou subtipos e respectivos alelos normalmente associados à maioria das infecções humanas em diferentes regiões do mundo, inclusive na América do Sul.
- A variabilidade genética dos isolados de *Blastocystis* sp. e *E. bieneusi* sugere a exposição a diferentes fontes de contaminação envolvendo vias de transmissão antroponótica e zoonótica.
- A maior densidade de amostras de fezes positivas para *Blastocystis* sp. em áreas mais populosas sugere um risco maior de disseminação e transmissão do parasita, tornando a população nessas áreas mais vulnerável a esta e a outras infecções parasitárias cuja transmissão se faz pela via fecal-oral.

Referências

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Madi M. et al. **Coproscopy and molecular screening for detection of intestinal protozoa.** Parasit Vectors. 2017 Sep 6;10(1):414.

Alfellani, M.A., et al. **Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications.** Acta Trop. 126, 11–18, 2013a.

Alfellani, M.A., et al.. **Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals.** , Protist. 164, 497–509, 2013b

Al-Hindi A., et al. **Prevalence of intestinal parasitic infections among university female students, Gaza, Palestine.** Avicenna J Med. Oct 3;9(4):143-147. 2019

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

Amato Neto, et al. **Parasitologia: uma abordagem clínica.** [S.l: s.n.], 2009.

Andersen L. O., Stensvold C. R. ***Blastocystis* in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective?** J. Clin. Microbiol. Mar;54(3):524-8, 2016.

Anuar T. S. et al. **Prevalence of *Dientamoeba fragilis* among an orangasli population in rural malaysia.** Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2015 Sep;46(5):844-9.

Barbosa C. et al. **Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil.**Parasit Vectors. 2017 Oct 25;10(1):518.

- Barbosa C.V., et al. **Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes.** PLoS One. 2018 Mar 9;13(3).
- Barratt J.L., et al. **A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness.** Gut Microbes. 2011; 2(1):3-12.
- Basyoni M.M.A., et al. **Atorvastatin: In-Vivo Synergy with Metronidazole as Anti-*Blastocystis* Therapy.** Korean J Parasitol. Apr; 56(2):105-112, 2018.
- Boughattas S. et al., **Molecular Analysis of the Enteric Protozoa Associated with Acute Diarrhea in Hospitalized Children.** Front Cell Infect Microbiol. Aug 2;7:343. 2017
- Brasil P. et al. **Intestinal microsporidiosis in HIV-positive patients with chronic unexplained diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil: diagnosis, clinical presentation and follow-up.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1996 Mar-Apr;38(2):97-102.
- Breton, J. et al. **New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon.** J. Clin. Microbiol. 45, 2580–2589, 2007.
- Buckholt M.A., Lee J.H., Tzipori S. **Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts.** Appl Environ Microbiol. May; 68(5): 2595-9. 2002
- Burgaña A., et al. **Paromomycin is superior to metronidazole in *Dientamoeba fragilis* treatment.** Int. J. Parasitol. Drugs. Drug. Resist. Dec;11:95-100. 2019
- Cacciò S.M. et al. **Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans.** Emerg Infect Dis. 2012; 18:838–481.
- Cacciò S.M. et al. **Multilocus sequence typing of *Dientamoeba fragilis* identified a major clone with widespread geographical distribution.** Int J Parasitol. 2016 Nov;46(12):793-798.

Cacciò S.M. **Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis***. Acta Trop. 2018 Aug;184:73-77.

Calderaro A., et al. **Evaluation of a realtime polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis***. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2010, 67, 239–245. (a)

Calderaro A., et al. **MALDI-TOF as a new tool for the identification of *Dientamoeba fragilis***. Parasit Vectors, 11 (1): 11, 2018. (b)

Casero, R.; Mongi, F.; Sánchez, A.; Ramírez, J.D. ***Blastocystis* and urticaria: examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation**. Acta Trop. 2015. 126, 12–16.

Clark, C.G., Van der Giezen, M., Alfellani, M.A., Stensvold, C.R. **Recent developments in *Blastocystis* research**. Adv. Parasitol. 2013; 82, 1–32.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). ***Blastocystis hominis***. Disponível em < <https://www.cdc.gov/dpdx/blastocystis/index.html> > Acesso em 14 out 2019.

Costa L.N.G., et al. **Intestinal microsporidiosis in a reference center. Letter to the editor**. Braz J Infect Dis. 2013; 17(6):724–725.

Coyle C.M., et al. ***Blastocystis*: to treat or not to treat...** Clin Infect Dis. Jan 1;54(1):105-10, 2012.

Cunha M.J., Cury M.C., Santín M. **Widespread presence of human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in chickens**. Vet Parasitol. Fev 15;217:108-12, 2016

Cunha M.J.R., Cury M.C., Santín M. **Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds**. Parasitol Res. 2017 Feb;116(2):487-493

David, E.B. et al. **Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the state of Sao Paulo, Brazil**. Parasites Vect. 2015; 8, 103.

- Desportes, I. et al. **Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS.** Journal of Protozoology 1985; 32, 250–254.
- Dib, J.R. et al. **Prevalence of intestinal parasitic infection among children from a shanty town in Tucuman, Argentina.** Trop. Biomed. 2015; 32, 210–215.
- Ding et al. **Genotypes and zoonotic potencial of *Enterocytozoon bieneusi* in edible bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) in China.** Int J Parasitol Parasites Wildl. 11: 103-107, 2020.
- Eroglu F., Genc A., Elgun G., Koltas I.S. **Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR.** Parasitol Res 105(6):1589–1592, 2009.
- Faria, C.P., Zanini et al. **Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants.** PLoSNegl. Trop. Dis. 11, 2017
- Fayer, R.; Santín, M. **Epidemiology of microsporidia in human infections.** In: Weiss, L. M. & Becnel, J. J. (ed.), Microsporidia: Pathogens of Opportunity. Wiley-Blackwell, 2014; Iowa, p. 135–164.
- Field A.S., Milner D.A., Jr **Intestinal microsporidiosis.** Clin Lab Med.; 35(2):445–459. 2015
- Fiuza V.R., Oliveira F.C., Fayer R., Santín M. **First report of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs in Brazil.** Parasitol Int. 2015 Aug;64(4):18-23.
- Fiuza V.R.D.S., et al. **Zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes found in brazilian sheep.** Res Vet Sci. 2016 Aug;107:196-201.
- Fletcher S.M.; Stark D.; Harkness J.; Ellis J. **Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective.** Clin Microbiol Rev. 2012; 25 (3):420-49.

Forsell J. et al.. **High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania.** Parasit Vectors. 2016 Jun 29;9(1):370.

Garcia J. A.; Cimerman S. **Detection of *Dientamoeba fragilis* in patients with HIV/AIDS by using a simplified iron hematoxylin technique.** Rev Soc Bras Med Trop. Mar-Apr;45(2):156-8, 2012.

Ghoyounchi R. et al. **Molecular Phylodiagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in Children with Cancer: Microsporidia in Malignancies as an Emerging Opportunistic Infection.** Acta Parasitol. Mar;64(1):103-111, 2019.

Gil, F.F., et al. **High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group.** Pathog. Glob. Health, 2013; 107, 320–324.

Gonçalves E.M. et al. **Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. May-Jun;50(3):165-7, 2008.

Gong et al. **Firts survey of *Enterocytozoon bieneusi* and dominat genotype Peru6 among ethnic minority groups in southwestern Chinas Yunnan Province and assessment of risk factors.** Plos Negl Trop Dis. 13 (5), 2019.

Greigert V. et al. **Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa.** PLoS One. 2018 Oct 10;13(10)

Han B., Weiss L.M. **Therapeutic targets for the treatment of microsporidiosis in humans.** Expert Opin Ther Targets. Nov; 22(11):903-915, 2018.

Hakansson E.G. ***Dientamoeba fragilis*, a cause of illness: report of a case.** Am J Trop Med Hyg 1936; 16:175-8.

Helenbrook W.D. et al. **Gastrointestinal parasites of Ecuadorian mantled howler monkeys (*Alouatta palliata aequatorialis*) based on fecal analysis.** J Parasitol 101: 341–350, 2015.

Holtman G.A. et al. ***Dientamoeba fragilis* colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level.** Family Practice; 34, 25–29, 2017.

Incani, R.N. et al. **Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR.** Acta Trop; 167, 64–70, 2017.

Intra J. et al. **The importance of considering the neglected intestinal protozoan parasite *Dientamoeba fragilis*.** J Med Microbiol. Jun;68(6):890-892, 2019.

Jepps M.W., Dobell C. ***Dientamoeba fragilis* n.g., n. sp.: a new intestinal amoeba from man.** Parasitology. 10:352-67; 1918.

Jimenez-Gonzalez D.E. et al. ***Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population.** Parasitol Res. 2012 Mar;110(3):1269-75.

Johnson E.H.; Windsor J.J.; Clark C.G. **Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*.** Clin Microbiol Rev. 2004;17(3):553-70.

Karim, M. R., et al. **Predomination and new genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in captive nonhuman primates in zoos in China: high genetic diversity and zoonotic significance.** PLoS ONE 2015; 10(2):e0117991.

Krogsgaard L.R. et al. **The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study.** Clin Gastroenterol Hepatol. 2014; 16(14): S1542- 3565.

Lainson R.; da Silva B.A. **Intestinal parasites of some diarrhoeic HIV-seropositive individuals in North Brazil, with particular reference to *Isospora belli* Wenyon, 1923 and *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell, 1918.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999 Sep-Oct;94(5):611-3.

- Lallo M.A.; Calábria P.; Milanelo L. ***Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (Microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds: microsporidia spores in birds.** Vet Parasitol. 2012 Dec 21;190(3-4):418-22.
- Lankester F. et al. ***Dientamoeba fragilis*: initial evidence of pathogenicity in the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*).** J Zoo Wildl Med 2010; 41:350–352.
- Larkin, M.A. et al. **Clustal W and Clustal X version 2.0.** *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948, 2007.
- Leder K. et al. **No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals.** J Gastroenterol Hepatol. 2005 Sep; 20(9):1390-4.
- Lee, I.L., et al. **Predominance of *Blastocystis* sp. subtype 4 in rural communities, Nepal.** Parasitol. Res. 2012; 110, 1553–1562.
- Li, W. Feng Y., Santin M. **Host Specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and Public Health Implications** Trends Parasitol., 35 (2019), pp. 436-451 2019
- Liguory, O. et al. **Determination of types of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from patients with intestinal microsporidiosis.** J. Clin. Microbiol. 1998; 36, 1882–1885
- Maas L. et al. **Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR.** Eur. Soc. of Cli. Microb. and Infec.s Dis. 2013 20: 545–550.
- Macchioni, F. et al. **Intestinal parasitic infections and associated epidemiological drivers in two rural communities of the Bolivian Chaco.** J. Infect. Dev. Ctries. 2016; 10, 1012–1019.
- Machicado, J.D et al. **Diagnosis of soil-transmitted helminthiasis in an Amazonic community of Peru using multiplediagnostic techniques.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2012; 106, 333–339.

Magalhães G.B. **O uso do geoprocessamento e da estatística nos estudos ecológicos em epidemiologia: o caso da dengue em 2008 na região metropolitana de Fortaleza.** 2012. Hygeia; 8(15): 63-77.

Malheiros, A.F., et al. **Short report: molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirape ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 2011; 85, 1050–1053.

Maritz J.M.; Land K.M.; Carlton J.M.; Hirt R.P. **What is the importance of zoonotic trichomonads for human health?** Trends Parasitol. 2014; 30(7):333-41.

Matos O.; Lobo M.L.; Xiao L. **Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* infection in humans.** J Parasitol Res. 2012; 981424.

Melo, G.B., et al. **Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil.** Parasitol. Open. 2017

Melo G.B. **Characterization of subtypes of *Blastocystis* sp. isolated from patients with urticaria, São Paulo, Brazil.** Parasite Epidemiol Control. Nov 9;7, 2019.

Miguel L. et al. **Clinical and Epidemiological Characteristics of Patients with *Dientamoeba fragilis* infection.** Am J Trop Med Hyg. 2018 Nov;99(5):1170-1173.

Mohamed R.T. et al. **Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia.** Parasit Vectors 2017 Apr 7;10(1):174.

Moosavi, A. et al. **Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran.** Parasitol. Res. 111 (2012) 2311–2315

Munasinghea V.S. et al. **Cyst formation and faecal - oral transmission of *Dientamoeba fragilis* - the missing link in the life cycle of an emerging pathogen.** Int J Parasitol. 2013;43(11):879-83.

- Nesti M.M.; Goldbaum M. **Infectious diseases and daycare and preschool education.** J Pediatr (Rio J). 2007 Jul-Aug; 83(4):299-312.
- Noble G.A.; Noble E.R. **Entamoeba in farm animals.** J Parasitol 1952 38:571–595.
- Ögren J. et al. **Dientamoeba fragilis DNA detection in Enterobius vermicularis eggs.** Pathog Dis. 2013; 69(2):157-8.
- Ögren J. et al. **Dientamoeba fragilis prevalence coincides with gastrointestinal symptoms in children less than 11 years old in Sweden.** Clinical Microbiology and Infection 2015; 34, 1995–1998.
- Ögren J. et al. **Prevalence of Dientamoeba fragilis, Giardia duodenalis, Entamoeba histolytica/dispar, and Cryptosporidium spp in Da Nang, Vietnam, detected by a multiplex real-time PCR.** APMIS; Jun;124(6):529-33, 2016.
- Ogunniyi T.; Balogun H.; Shasanya B. **Ectoparasites and endoparasites of peridomestic house-rats in Ile-Ife, Nigeria and implication on human health.** Iran J Parasitol; 9:134 –140, 2014.
- Ojuromi, O.T. et al. **Identification and characterization of microsporidia from fecal samples of HIV-positive patients from Lagos, Nigeria.** PLoS One, 7, 2012.
- Oliveira-Arbex A.P.; David É.B.; Guimarães S. **Blastocystis genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil.** Infect Genet Evol. 2018 Jan;57:59-63.
- Oliveira-Arbex A. P. et al. **Genotyping of Giardia duodenalis isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission.** Epidemiol Infect. May;144(7):1418-28. 2016.
- Osman M. et al. **Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with Cryptosporidium, Giardia, Blastocystis and Dientamoeba among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon.** PLoSNegl Trop Dis. Apr 15;10(4), 2016.
- Ozyurt M. et al. **Molecular epidemiology of Blastocystis infections in Turkey.** Parasitol Int. 2008 Sep;57(3):300-6.

Pandey P.K. et al. **Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals.** Infect Genet Evol. 2015 Apr;31:296-9.

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

Peña S. et al. **Determination of subtypes of *Blastocystis* sp. in Chilean patients with and without inflammatory bowel syndrome, A preliminary report.** Parasite Epidemiol Control. Nov 21;8. 2019

Poirier P, et al. **New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome.** PLoS Pathog. 2012; 8(3).

Poulsen C.S. et al. **Epidemiological Aspects of *Blastocystis* colonization in Children in Ilero, Nigeria.** Am J Trop Med Hyg. 2016 Jul 6;95(1):175-9.

Prado J.B.F. et al. **Occurrence of zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* in cats in Brazil.** Rev Bras Parasitol Vet. 2019 Jan-Mar;28(1):80-90.

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

Ramírez J.D. et al. **Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America.** Infect Genet Evol. 2016 Jul;41:32-35.

Ramirez, J.D. et al.,. ***Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia.** PLoS One 2017; 12.

Rebolla, M.F. et al. **High prevalence of *Blastocystis* spp. infection in children and staff members attending public urban schools in São Paulo State, Brazil.** Rev. Inst. Med. Trop. 2016; Sao Paulo 58, 31.

Robertson L. J. et al. **Are molecular tools clarifying or confusing on understanding of the public health threat from zoonotic enteric protozoa in wildlife?** Int J Parasites Wildl 9: 323-341, 2019.

- Röser D. et al. **DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*.** Exp Parasitol. 2013;133(1):57-61. (a)
- Röser D et al. ***Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR.** European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2013; 32, 1303–1310. (b)
- Rostami A. et al. **The role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis.**Parasitol Res. 2017 Sep;116(9):2361-2371.
- Sadler, F. et al. **Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in AIDS patients from the north west of England.** J. Infect. 2002; 44, 39–42
- Sánchez, A. et al. **Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon Basin.** Front. Microbiol. 2017; 8, 248.
- Sanpool O. et al. **Subtype identification of human *Blastocystis* spp. isolated from Lao People's Democratic Republic.** Acta Trop. 2017 Apr;168:37-40.
- Santín M., Fayer M. **Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals.** Res. Vet. Sci., 2011; 90 pp. 363-371
- Santín, M., Fayer, R. ***Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence. A consensus.** Journal of Eukaryotic Microbiology 56, 34–38, 2019.
- Sarkari B. et al. **Prevalence and risk factors of intestinal protozoan infections: a population-based study in rural areas of Boyer-Ahmad district, Southwestern Iran.** BMC Infect Dis. 2016 Nov 25;16(1):703.
- Scanlan P.D. et al. **The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota.** FEMS Microbiol Ecol. 2014 Oct;90(1):326-30.

Scicluna S. M. , Tawari B., Clark C. G. **DNA barcoding of blastocystis**. Protist. 2006 Feb;157(1):77-85, 2006.

Seguí R. et al. **Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey**. Parasit Vectors. 2018 Aug 30;11(1):490.

Seyer A. et al. **Epidemiology and prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus**. Am J Trop Med Hyg. 2017 May;96(5):1164-1170

Shariati A. et al. **The possible role of bacteria, viruses, and parasites in initiation and exacerbation of irritable bowel syndrome**. J Cell Physiol. 2019 Jun;234(6):8550-8569.

Shehata A.I. ; Hassanein F. **Intestinal parasitic infections among mentally handicapped individuals in Alexandria, Egypt**. Ann Parasitol. 2015;61(4):275-81.

Silva M. D. R. A. et al.,. **Subtypes of *Blastocystis* sp. isolated in fecal samples from transplant candidates in São Paulo, Brazil**. Parasite Epidemiol Control. 2020

Silva-Fiuza V. R. et al. **New findings of *Enterocytozoon bieneusi* in beef and dairy cattle in Brazil**. Vet Parasitol. 2016 Jan 30;216:46-51.

Stark D. et al. **Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis**. Int. J. Parasitol. 2007; 37:11–20.

Stark D. et al. **Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population**. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(4):634–50. (a)

Stark, D. et al. **Limited genetic diversity among genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from HIV-infected patients from Sydney, Australia**. J. Med. Microbiol. 2009; 58, 355–357 (b)

Stark D. et al. **A review of the clinical presentation of dientamoebiasis**. Am J Trop Med Hyg. 2010; 82(4):614-9.

- Stark D. et al. ***Dientamoeba fragilis*, the neglected trichomonad of the human bowel.** Clin Microbiol Rev 2016; 29:553–580.
- Stensvold C. R. et al. **Detecting Blastocystis using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study.** Diagn Microbiol Infect Dis. Nov; 59 (3):303-7, 2007.
- Stensvold C.R. et al. **[Blastocystis: an enigmatic parasite].** UgeskrLaeger. 2009 Aug 17;171(34):2388-90. Danish.
- Stensvold C.R. et al. **Limited intra-genetic diversity in *Dientamoeba fragilis* housekeeping genes.** Infect Genet Evol 2013; 18:284–286.32
- Stensvold C.R.; Clark C.G. **Current status of *Blastocystis*: A personal view.** Parasitol Int. 2016 Dec; 65(6 Pt B):763-771.
- Stentiford, G. D. et al. **Microsporidia – emergent pathogens in the global food chain.** Trends Parasitol., 2016; 32:336 – 348.
- Stenzel D.J.; Boreham P.F. ***Blastocystis hominis* revisited.** Clin Microbiol Rev. 1996; 9(4):563-84.
- Stephenson L.S.; Latham M.C.; Ottesen E.A. **Malnutrition and parasitic helminth infections.** Parasitology, 121, (S23–38), 2000.
- Tan K.S. **New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp.** Clin Microbiol Rev. 2008 Oct;21(4):639-65.
- Thathaisong U. et al. ***Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*.** J Clin Microbiol. 2003;41(3):967–75
- Thellier M.; Breton J. ***Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology.** Parasite. 2008 Sep;15(3):349-58.
- Villegas-Gómez I. et al. **Comparison of the genetic variability of *Blastocystis* subtypes between human carriers from two contrasting climatic regions of México.** Infect Genet Evol. 2016 Oct;44:334-340.

Wong Z.W.; Faulder K.; Robinson J.L. **Does *Dientamoeba fragilis* cause diarrhea? A systematic review.** Parasitol Res. 2018;117(4):971–980.

Wuhib T. et al. **Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil.** J Infect Dis. Aug;170(2):494-7, 1994.

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

Yamashiro S. et al. ***Enterocytozoon bieneusi* detected by molecular methods in raw sewage and treated effluent from a combined system in Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017 Jun;112(6):403-410.

Yang Z. et al. **Subtyping of *Cryptosporidium cuniculus* and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in rabbits in two farms in Heilongjiang Province, China.** Parasite. 2016;23:52.

Zanetti A. D. S. et al. **Prevalence of *Blastocystis* sp. infection in several hosts in Brazil: a systematic review and meta-analysis.** Parasit Vectors. Jan 14;13(1):30, 2020.

Apéndice

APÊNDICE A- Tabela de genotipagem dos isolados de *Blastocystis* obtidos de usuários atendidos no Laboratório de Análises Clínicas (LAC)/USC, Bauru, SP, durante o período de setembro a dezembro de 2018.

Código Paciente	Idade (anos)	Sexo	Procedência	Subtipo	Alelos
LAC 102	12	M	Agudos	ST1	87
LAC 114	8	F	Agudos	ST1	141
LAC 125	5	F	Guaíçara	ST1	87
LAC 127	5	M	Bauru	ST1	87
LAC 129	10	M	Avaí	ST1	87
LAC 130	7	M	Bauru	ST1	87
LAC 159	11	F	Iacanga	ST1	87
LAC 162	5	M	Iacanga	ST1	87
LAC 166	7	M	Agudos	ST1	4
LAC 170	83	M	Iacanga	ST1	4
LAC 192	10	F	Agudos	ST1	4
LAC 198	41	F	Bauru	ST1	4
LAC 205	4	F	Bauru	ST1	4
LAC 206	9	F	Barra Bonita	ST1	4
LAC 212	27	M	Bauru	ST1	4
LAC 230	38	M	Agudos	ST1	4
LAC 238	8	M	Bauru	ST1	4
LAC 242	6	F	Barra Bonita	ST1	4
LAC 243	33	M	Agudos	ST1	4
LAC 25		F	Bauru	ST1	141
LAC 253	6	M	Iacanga	ST1	4
LAC 256	9	M	Bauru	ST1	141
LAC 257	9	F	Bauru	ST1	4
LAC 26	18	F	Bauru	ST1	4
LAC 27	3	M	Bauru	ST1	87
LAC 278	8	M	Agudos	ST1	4
LAC 280	11	M	Agudos	ST1	4
LAC 289	58	F	Bauru	ST1	4
LAC 294	11	M	Bauru	ST1	4
LAC 304	44	F	Bauru	ST1	4
LAC 307	7	F	Borebi	ST1	4
LAC 308	21	M	Bauru	ST1	4
LAC 316	21	F	Pirajuí	ST1	4
LAC 320	30	F	Pirajuí	ST1	4
LAC 328	23	F	Bauru	ST1	4
LAC 332	9	M	Iacanga	ST1	4
LAC 339	10	F	Iacanga	ST1	4
LAC 341	23	F	Bauru	ST1	4
LAC 345	8	F	Iacanga	ST1	4
LAC 50	41	F	Bauru	ST1	87
LAC 52	31	F	Bauru	ST1	87

Continuação

LAC 58	12	F	Bauru	ST1	4
LAC 74	5	M	Agudos	ST1	141
LAC 76	11	F	Agudos	ST1	141
LAC 115	3	F	Agudos	ST2	73
LAC 136	21	F	Agudos	ST2	138
LAC 163	4	F	Agudos	ST2	67
LAC 244	48	F	Bauru	ST2	12
LAC 246	29	F	Bauru	ST2	12
LAC 31	5	M	Agudos	ST2	12
LAC 321	7	F	Bauru	ST2	15
LAC 37	7	M	Bauru	ST2	12
LAC 57	88	F	Bauru	ST2	11
LAC 80	28	F	Agudos	ST2	73
LAC 10	8	M	Agudos	ST3	49
LAC 116	53	M	Bauru	ST3	45
LAC 13	44	F	Bauru	ST3	34
LAC 137	23	M	Igaraçu Tietê	ST3	52
LAC 138	2	M	Igaraçu Tietê	ST3	59
LAC 144	13	M	Bauru	ST3	59
LAC 146	63	M	Torrinha	ST3	59
LAC 148	6	F	Bauru	ST3	135
LAC 149	2	M	Bauru	ST3	49
LAC 154	14	F	Pirajuí	ST3	59
LAC 165	8	M	Bauru	ST3	36
LAC 172	6	M	Bauru	ST3	36
LAC 180	33	M	Torrinha	ST3	34
LAC 183	42	M	Iacanga	ST3	34
LAC 193	27	F	Bauru	ST3	37
LAC 197	10	M	Bauru	ST3	36
LAC 20	7	F	Agudos	ST3	49
LAC 202	39	F	Agudos	ST3	34
LAC 21	18	F	Agudos	ST3	58
LAC 219	61	F	Bauru	ST3	37
LAC 225	9	F	Bauru	ST3	34
LAC 227	40	M	Bauru	ST3	37
LAC 231	9	M	Barra Bonita	ST3	34
LAC 234	10	M	Bauru	ST3	36
LAC 248	60	M	Bauru	ST3	34
LAC 252	64	F	Agudos	ST3	36
LAC 263	5	F	Bauru	ST3	37
LAC 272	9	F	Agudos	ST3	34
LAC 273	7	F	Bauru	ST3	37
LAC 279	56	F	Bauru	ST3	37
LAC 286	47	F	Agudos	ST3	34
LAC 287	49	F	Bauru	ST3	55

Continuação

LAC 295	22	F	Agudos	ST3	34
LAC 296	20	F	Bauru	ST3	34
LAC 299	27	F	Agudos	ST3	36
LAC 313	6	M	Bauru	ST3	34
LAC 329	6	F	Bauru	ST3	37
LAC 348	10	F	Torrinha	ST3	31
LAC 4	82	F	Reginópolis	ST3	49
LAC 45	20	M	Agudos	ST3	34
LAC 48	49	F	Bauru	ST3	49
LAC 64	22	F	Bauru	ST3	45
LAC 65	5	F	Agudos	ST3	37
LAC 7	51	F	Bauru	ST3	55
LAC 82	10	M	Agudos	ST3	59
LAC 90	22	M	Bauru	ST3	36
LAC 91	10	F	Agudos	ST3	59
LAC 92	24	M	Bauru	ST3	37
LAC 94	9	M	Agudos	ST3	59
LAC 155	7	F	Bauru	ST4	91
LAC 293	43	F	Iacanga	ST6	125
LAC 96	10	F	Bauru	ST6	134
LAC 326	38	F	Pirajuí	ST7	137
LAC 311	51	F	Bauru	ST9	129

APENDICE B - Tabela de genotipagem dos isolados de *Dientamoeba fragilis* obtidos de usuários atendidos no Laboratório de Análises Clínicas (LAC)/USC, Bauru, SP, durante o período de setembro a dezembro de 2018.

Código Paciente	Idade (anos)	Procedência	Sexo	Genótipo
LAC 37	7	Bauru	Masculino	1
LAC 94	9	Agudos	Masculino	1
LAC 183	42	Iacanga	Masculino	1
LAC 192	10	Agudos	Feminino	1
LAC 205	4	Bauru	Feminino	1
LAC 225	9	Bauru	Feminino	1
LAC 256	9	Bauru	Masculino	1
LAC 263	5	Bauru	Feminino	1

APENDICE C - Tabela de genotipagem dos isolados de *Enterocytozoon bieneusi* obtidos de usuários atendidos no Laboratório de Análises Clínicas (LAC)/USC, Bauru, SP, durante o período de setembro a dezembro de 2018.

Código Paciente	Idade (anos)	Procedência	Sexo	Genótipo
LAC 75	3	Bauru	Feminino	A
LAC 111	64	Barra Bonita	Feminino	D
LAC 121	32	Bauru	Masculino	D
LAC 131	5	Bauru	Feminino	D
LAC 137	23	Igaraçu Tietê	Masculino	D
LAC 138	2	Igaraçu Tietê	Masculino	D
LAC 147	8	Iacanga	Masculino	D
LAC 150	11	Pirajuí	Feminino	D
LAC 151	58	Bauru	Masculino	D
LAC 154	14	Pirajuí	Feminino	D
LAC 155	7	Bauru	Feminino	D
LAC 160	60	Torrinha	Feminino	D
LAC 169	3	Bauru	Feminino	D
LAC 177	33	Bauru	Masculino	D
LAC 180	33	Torrinha	Masculino	D
LAC 206	9	Barra Bonita	Feminino	D

Anexos

Anexo 1 – Termo de consentimento LAC**Carta de aceite**

Declaro que conheço os objetivos e metodologia do trabalho de pesquisa intitulado **“Caracterização molecular de isolados de *Blastocystis* spp. e *Dientamoeba fragilis* em amostras fecais humanas encaminhadas para laboratório clínico de Bauru, São Paulo”** a ser realizado pela aluna de mestrado **Thainá Valente Bertozzo**, do programa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob a orientação da Profa Dra Semiramis Guimarães Ferraz Viana.

Autorizo a disponibilidade das amostras de descarte, com fins de pesquisa, tendo o laboratório condições para o desenvolvimento do referido estudo.

Dra Ana Cláudia C. de Oliveira Demarchi

Anexo 2 – Comprovante aprovação no Comitê de Ética

21/10/2019
Plataforma Brasil

Saúde

principal
sair

Semiramis Guimarães Ferraz Viana - Pesquisador V3.2

Cadastros
Sua sessão expira em: 38min 14

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização molecular de isolados de *Blastocystis* spp. e *Dientamoeba fragilis* em amostras fecais humanas encaminhadas para laboratório clínico de Bauru, São Paulo. **Executor:** Thainá Valente Bertozzi; **Orientador:** Profa. Dra. Semiramis Guimarães Ferraz Viana
Pesquisador Responsável: Semiramis Guimarães Ferraz Viana
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 90078218.0.0000.5411
Submetido em: 03/05/2018
Instituição Proponente: Departamento de Parasitologia
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1117084

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 1
 - Projeto Original (PO) - Versão 1
 - Documentos do Projeto
 - Comprovante de Recepção - Submissão 1
 - Cronograma - Submissão 1
 - Declaração de Instituição e Infraestrutura
 - Folha de Rosto - Submissão 1
 - Informações Básicas do Projeto - Submissão 1
 - Outros - Submissão 1
 - Projeto Detalhado / Brochura Investigação
 - Apreciação 1 - UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu
 - Projeto Completo

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações
-------------------	----------	---------	----------	-------

LISTA DE APECIAÇÕES DO PROJETO

Apreciação *	Pesquisador Responsável *	Versão *	Submissão *	Modificação *	Situação *	Exclusiva do Centro Coord. *	Ações
PO	Semiramis Guimarães Ferraz Viana	1	03/05/2018	08/05/2018	Aprovado	Não	

HISTÓRICO DE TRÂMITES

Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
PO	08/06/2018 11:38:28	Parecer liberado	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	PESQUISADOR	
PO	08/06/2018 11:37:17	Parecer do colegiado emitido	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	
PO	03/05/2018 17:45:57	Parecer do relator emitido	1	Membro do CEP	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	
PO	03/06/2018 17:16:46	Aceitação de Elaboração de Relatoria	1	Membro do CEP	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	
PO	24/05/2018 11:06:27	Confirmação de Indicação de Relatoria	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	
PO	24/05/2018 11:02:25	Indicação de Relatoria	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	
PO	22/05/2018 10:44:19	Aceitação do PP	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	
PO	03/05/2018 15:18:21	Submetido para avaliação do CEP	1	Pesquisador Principal	PESQUISADOR	UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu	

plataformabrasil.saude.gov.br/visao/pesquisador/gerirPesquisa/gerirPesquisaAgrupador.jsf

1/2