

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIELLY OSPEDAL BATISTA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* E *Blastocystis* sp.
DIAGNOSTICADOS EM MORADORES E ANIMAIS DA REGIÃO
METROPOLITANA DE CURITIBA-PR

CURITIBA

2019

MARIELLY OSPEDAL BATISTA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* E *Blastocystis* sp.
DIAGNOSTICADOS EM MORADORES DA REGIÃO METROPOLITANA DE
CURITIBA-PR

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada ao curso de Biomedicina da
Universidade Federal do Paraná, como
requisito à obtenção do título do grau em
Bacharel.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Débora do Rocio
Klisiowicz

CURITIBA

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIELLY OSPEDAL BATISTA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* E *Blastocystis* sp.
DIAGNOSTICADOS EM MORADORES DA REGIÃO METROPOLITANA DE
CURITIBA-PR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de grau de Bacharel em Biomedicina.

Prof^a. Dra. Débora do Rocio Klisiowicz
Orientadora – Departamento de Patologia Básica, UFPR

Prof^a. Dra. Márcia Kiyoe Shimada
Departamento de Patologia Básica, UFPR

Prof^o Dra. Teresa Cristina César Ogliari
Departamento de Patologia Básica, UFPR

Curitiba, 12 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família, meus maiores incentivadores, que sempre estão ao meu lado e me ajudam a cada dia a ser uma pessoa melhor. Em especial aos meus pais Marcio Aparecido Batista e Danielle Ospedal Batista, e aos meus irmãos, Felipe Ospedal Batista e Fernando Ospedal Batista que nunca mediram esforços para me ajudar e sempre me deram todo apoio e confiança durante esta trajetória, com certeza toda força e dedicação a este trabalho foi fruto do amor e carinho que recebo deles. Em memória à minhas avós Miriam Alves e Marlene Ferreira que nos deixaram no meio desta jornada e celebraram, com muita felicidade, a minha entrada na universidade.

A minha Professora Debora do Rocio Klisiowicz por se dispor a me orientar não só neste trabalho, mas também em projetos de extensões e iniciações científicas que realizei durante a graduação, dos quais foram essenciais para minha formação como biomédica, seu profissionalismo e cuidado aos alunos tornaram tudo mais leve e gracioso. Por toda ajuda prestada na realização do meu, tão desejado, intercâmbio para a Espanha e a vivência científica na Universidade de Valência.

A toda equipe responsável pelos laboratórios de parasitologia da Universidade Federal do Paraná, que compartilharam experiências e ajudaram nos procedimentos deste estudo. Em especial, aos meus colegas de projeto, Bruno e Adelino, que sempre estiveram dispostos a ajudar, tirar dúvidas e realizar a pesquisa juntos. Com certeza esse trabalho também é fruto da dedicação e pró-atividade deles.

A todos da Universidade de Valência: professores, alunos, doutorandos e mestrandos, que me ajudaram com as técnicas moleculares e com a experiência de conhecer a ciência em outro país. Em especial ao Raimundo Seguí, que foi o maior incentivador, professor e amigo durante este tempo fora do Brasil.

As amizades realizadas dentro da universidade e aos amigos de longa data que sempre me acompanharam e torceram pelo meu crescimento.

“Pesquisar é acordar para o mundo”

MARCELO LAMY

RESUMO

As parasitoses intestinais são um problema de saúde pública, com índices elevados de prevalências nos países em desenvolvimento. *Giardia duodenalis* além de, em alguns casos, provocar uma sintomatologia bem característica nas populações infectadas, no aspecto molecular há estudos que demonstram as associações zoonóticas desse parasita. *Blastocystis* sp. também é uma espécie de parasita intestinal cada vez mais frequente nas análises de prevalências e demonstra uma diversidade genética ampla, porém com escassez nas informações zoonóticas. Usando como local de estudo o município de Bocaiuva do Sul e Colombo, região metropolitana de Curitiba-PR, foram coletadas amostras fecais humanas e de animais para estudos moleculares dos parasitas mencionados. No total foram obtidas 217 amostras e destas 27,6% foram positivas para os protozoários de interesse, pela análise realizada através do método de Ritchie. Métodos de extração de DNA, ensaio de PCR em tempo real (qPCR) e sequenciamento de nucleotídeos foram realizados para a identificação de Assembleias e de Subtipos (STs) dos parasitas encontrados. Dentre os resultados alcançados, a relação de *Giardia duodenalis*, em sua maioria, foi detectada como Assembleia B dentro das subassembleias BIII e BIV. Já para os resultados de *Blastocystis* sp. a maior prevalência foi do subtipo ST1 nas duas regiões. Um caso de ST7 foi genotipado, subtipo esse considerado raro em regiões brasileiras, para as demais análises foram encontrados subtipos ST2, ST3 e ST4. Conclui-se assim, que as genotipagens analisadas são semelhantes entre amostras animais e humanas, porém não se pode afirmar um potencial zoonótico entre elas. Portanto, se torna importante ampliar estudos nesta área a fim de obter uma análise minuciosa.

Palavras chaves: DNA, Genotipagem, Zoonoses

ABSTRACT

Intestinal parasitosis is a public health problem, with high prevalence rates in development countries. *Giardia duodenalis*, besides, in some cases, causing a very characteristic symptomatology in infected populations, in the molecular aspect there are studies that demonstrate the zoonotic associations of this parasite. *Blastocystis* sp. it is also a species of intestinal parasite that is increasingly common in prevalence analyzes and demonstrates a wide genetic diversity, but with a lack of zoonotic information. Using as a study the neighborhood of Bocaiuva do Sul and Colombo, metropolitan regions of Curitiba-PR, human and animal fecal samples were collected for molecular studies of the mentioned parasites. A total of 217 samples were collected from which 27.6% were flagged positive for the desired protozoa, when under coproparasitological examination. Methods of DNA extraction, quantitative real time PCR (qPCR) assay and nucleotide sequencing were performed to identify Assemblies and Subtypes (STs) of the parasites found. Among the results achieved, the relationship of *Giardia duodenalis*, mostly, was detected as Assembly B within the BIII and BIV subassemblies. For the results of *Blastocystis* sp. The highest prevalence was of ST1 subtype in both regions. One case of ST7 was genotyped, a subtype considered rare in Brazilian regions. For the other analyzes, subtypes ST2, ST3 and ST4 were found. Thus, it is concluded that the analyzed genotypes are similar between animal and human samples, but a zoonotic potential between them cannot be affirmed. Therefore, it is of interest to expand studies in this area in order to obtain a thorough analysis

Keywords: DNA, Genotyping, Zoonoses

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo evolutivo de <i>Giardia duodenalis</i>	20
Figura 2 - Ciclo evolutivo de <i>Blastocystis</i> sp	24
Figura 3 - Localização geográfica do município de Colombo no estado do Paraná ..	28
Figura 4 - Localização geográfica do município de Bocaiúva do Sul no estado do Paraná	29
Figura 5 - Fachada do estabelecimento de estudo localizado em Colombo-PR	30
Figura 6 - Fachada do estabelecimento de estudo localizado em Bocaiúva do Sul- PR	30
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose para identificação de <i>amplicons</i> da proteína beta-giardina encontrada em <i>Giardia duodenalis</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Grupos genotípicos de <i>Giardia duodenalis</i> descritos através do gene beta-giardina e SSU-rRNA, presentes em diversos hospedeiros.....	22
Tabela 2 - Subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. descritos através da análise do gene SSU-rRNA e a relação desses grupos genéticos presentes em diversos hospedeiros descritos e distribuição geográfica.....	26
Tabela 3 - Primers utilizados nas reações de amplificação (PCR) para obtenção do DNA de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Blastocystis</i> sp. nos municípios estudados	36
Tabela 4 - Procedência e número de amostras fecais analisadas nos municípios de Colombo e Bocaiúva do Sul	40
Tabela 5 - Prevalência de enteroparasitoses conforme o total de amostras diagnosticadas positivas em cada município estudado.....	41
Tabela 6- Prevalência de protozoários em amostras humanas e de animais entre os municípios de Colombo e Bocaiúva do Sul	42
Tabela 7- Prevalência de helmintos em amostras humanas e de animais nos municípios de Colombo e Bocaiúva do Sul	43
Tabela 8 - Porcentagens dos resultados alcançados dos métodos moleculares para genotipagem de giardia duodenalis	45
Tabela 9- Porcentagens dos resultados alcançados dos métodos moleculares para genotipagem de Blastocystis sp	47

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- Relação entre amostras humanas e animais	40
GRÁFICO 2- Percentual de amostras positivas por município	41
GRÁFICO 3- Percentual das sequências de nucleotídeos encontrados através do gene SSU-rRNA nas amostras positivas de humanos e animais para Blastocystis sp. nos municípios de Colombo e Bocaiúva do sul	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. JUSTIFICATIVA.....	15
1.2. OBJETIVOS.....	15
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. PARASIToses INTESTINAIS.....	16
2.2. ENTEROPARASIToses NO BRASIL.....	18
2.3. PRINCIPAIS PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS PREV. EM HUMANOS	19
2.3.1 <i>Giardia duodenalis</i>	19
2.3.1 <i>Blastocystis</i> sp.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. ÁREAS DE ESTUDO: COLOMBO E BOCAIUVA DO SUL.....	28
3.2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	30
3.3. MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS	31
3.4. TÉCNICA DE FORMOL-ACETATO DE ETILA MODIFICADO.....	32
3.5. QUANTITATIVA DA PRESENÇA DOS PROTOZOÁRIOS.....	33
3.6. ANÁLISES MOLECULARES.....	34
3.7. EXTRAÇÃO DE DNA.....	34
3.8. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	35
3.9. DETECÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO <i>BLASTOCYSTIS</i> SP.	36
3.10. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	37
3.11. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
4.1. RESULTADOS PRÉ-ANALÍTICOS	39
4.2. PREVALÊNCIA DE ENTEROPARASIToses NOS MUNICIPIOS DE COLOMBO E BOCAIUVA DO SUL.....	41
4.3. ANÁLISES MOLECULARES.....	44
4.4. GENOTIPAGEM DE <i>Giardia duodenalis</i>	45
4.5. GENOTIPAGEM de <i>Blastocystis</i> sp.	47
5. CONCLUSÕES	51
6. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais são infecções decorrentes da presença de helmintos e/ou protozoários no trato digestório inferior de seres humanos ou de animais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) infecções causadas por parasitos, em geral, englobam o grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), as quais acometem cerca de um bilhão de pessoas no mundo (14% da população mundial).

Dentre os parasitos intestinais conhecidos, os helmintos mais frequentes em seres humanos, no estado de Paraná-Brasil são: *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. Entre os protozoários, se destacam *Blastocystis* sp., *Giardia duodenalis* e *Endolimax nana* (SEGUÍ et al., 2018; OISHI et al., 2019). Os sintomas causados por esses parasitos são: anemia, anorexia, desenvolvimento físico e cognitivo prejudicados, desnutrição, diarreia, dor abdominal, fraqueza, náuseas, irritabilidade e vômito (PRADO et al., 2001; NORHAYATI et al., 2003; MELO et al, 2004; SCHMUNIS e LÓPEZ ANTUÑANO, 2010; WHO, 2013).

Estudos recentes demonstram que dentre as parasitoses intestinais causadas por protozoários, *Giardia duodenalis* e *Blastocystis* sp. estão entre as espécies mais prevalentes (SEGUÍ et al., 2018). As infecções causadas por esses protozoários junto aos sintomas característicos estão vinculados a casos de diarreia, Síndrome do Intestino Irritável (SII) e alergias alimentares. As espécies existentes desses parasitos possuem uma grande diversidade genotípica, ou seja, são encontrados até 19 Subtipos (ST) genéticos de *Blastocystis* sp. (YASON & TAN, 2015). Em relação à *Giardia duodenalis*, uma vasta gama de Assembleias e subassembleias são encontradas entre as linhagens. Neste quesito, as metodologias moleculares entram nos estudos como forma de identificar estes genótipos, favorecer um tratamento efetivo da doença e podem, também, ser apontadas como uma ferramenta para determinar possíveis padrões de transmissão antroponóticas e/ou zooantroponóticas.

Embora estas enfermidades não estejam exclusivamente localizadas em regiões de condições precárias de saúde, são nessas regiões em que se concentram altas taxas de morbidade (ANDRADE et al, 2010; WHO, 2013). Quando o intuito é estudar os aspectos epidemiológicos das infecções parasitárias leva-se em conta a estimativa do número de infectados (prevalência), e, normalmente, estes estudos revelam uma

correlação entre as maiores taxas de prevalência serem em localidades com fragilidade socioeconômica. Aliado a isso estão as condições precárias de higiene e de saneamento básico (TELLEZ et al., 1997; GAMBOA et al., 1998; PHIRI et al., 2000; ADBI et al., 2017). Outro aspecto importante, é que estes estudos demonstram que as infecções parasitárias intestinais são, mundialmente, mais prevalentes entre as crianças (WÖRDEMANN et al., 2006).

Nos países em desenvolvimento, as parasitoses intestinais são consideradas um problema de saúde pública (DARYANI et al., 2017). No Brasil, em 2005 foi implantado o Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses que visava reduzir a prevalência, morbidade e mortalidade dessas enfermidades, cuja prevalência varia de 15 a 80% (BRASIL, 2005).

Essa realidade, de escassez de estudos epidemiológicos publicados sobre parasitoses intestinais, pode ser percebida no estado do Paraná. Apesar dos estudos se concentrarem nas regiões Norte e Noroeste do estado, municípios como Colombo e Bocaiúva do Sul, locais do presente estudo, não possuem pesquisas epidemiológicas referente a enteroparasitoses. Segundo dados do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), 2010, Colombo possui um Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) de 0,733, o qual é considerado um nível alto de desenvolvimento, porém, possui uma fragilidade socio-sanitária e condições de higiene e saúde as quais precisam ser melhoradas. Bocaiúva do Sul possui um IDHM de 0,640, o qual é considerado de nível médio para o PNDU de 2010. Em relação a dados referente a saúde da população Bocaiuvense, as internações devido a diarreias são de 0.2 para cada 1.000 habitantes. Quando comparado com outros municípios no país, se encontra na posição 4284^o, no total de 5570 municípios com esses casos de internamento (DATASUS, 2017).

Levando em conta os aspectos socioeconômicos desses municípios, que compõem a Região Metropolitana de Curitiba, este estudo tem como finalidade contribuir com o conhecimento sobre as enteroparasitoses no estado do Paraná. Estas regiões sofrem pouca interferência profilática para tais doenças, sendo assim, os estudos parasitológicos de prevalência podem reverter este quadro. Já os aspectos moleculares entram como uma metodologia complementar para se discutir e analisar o potencial

zoonótico dos protozoários *Giardia duodenalis* e *Blastocystis* sp., o qual poderá auxiliar para as demais pesquisas atuais que discutem este viés. No entanto, estudos sobre prevalência de enteroparasitoses são insuficientes e ainda inexistentes em algumas regiões, como no sul do país.

1.1. JUSTIFICATIVA

A caracterização genética de protozoários intestinais tem sido amplamente utilizada para avaliar os meios de transmissão das enteroparasitoses. O aspecto zoonótico na epidemiologia da infecção humana serve como um meio adicional no desenvolvimento de ferramentas sensíveis para rastrear fontes de infecção.

As metodologias moleculares ajudam não somente a obter um diagnóstico mais preciso, mas também em identificar diferenças genéticas dentro da mesma espécie. Nesse caso, conhecer cada assembleia de *Giardia duodenalis* ou cada subtipo de *Blastocystis* sp., serve como um incremento para ciência, pois ainda há muito o que se discutir entre os diferentes grupos genéticos identificados e as patogenicidades que estes protozoários podem acarretar.

Ao ser conhecido as variedades genéticas e a inter-relação entre humanos e animais domésticos é possível traçar medidas profiláticas e conseqüentemente melhorar a condição de vida da população.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente *Giardia duodenalis* e *Blastocystis* sp. diagnosticados em moradores de Colombo-PR e Bocaiúva do Sul-PR

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de parasitoses em moradores e animais de Colombo e Bocaiúva do Sul
- Caracterizar os genótipos nas amostras positivas para *Giardia duodenalis* e subtipos de *Blastocystis* sp. encontrados nestas regiões
- Relacionar os genótipos encontrados entre amostras animais e humanas

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PARASITÓSES INTESTINAIS

As parasitoses intestinais ou enteroparasitoses são caracterizadas pelo alto potencial infeccioso quando há presença de agentes como protozoários ou helmintos no trato digestório de seres humanos ou animais. Parasito, hospedeiro e ambiente formam uma tríade epidemiológica que se interligam dentro de um sistema no qual cada um depende dos outros dois. Ou seja, o ambiente influencia o comportamento das infecções e no aparecimento das doenças parasitárias (FERREIRA et al., 2012).

Segundo Ferreira et al (2012) infecções causadas por parasito não significa, necessariamente, o aparecimento de sintomas que caracterizam a doença parasitária. Esta manifesta-se por múltiplos fatores que muitas vezes independem da simples presença do parasito. Porém, em algum momento, sem dúvida, a presença do parasito é condição necessária para que surja a doença.

A partir dos registros de enteroparasitoses encontrados em materiais orgânicos mumificados, a paleoparasitologia sugere que a disseminação destes parasitismos advém de processos migratórios, desenvolvimento da agricultura, domesticação de animais e contaminação ambiental (FERREIRA et al., 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) infecções causadas por parasitos, em geral, englobam o grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), as quais acometem cerca de um bilhão de pessoas no mundo (14% da população mundial). Portanto, constituem um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento (SBI, 2016; WHO, 2018).

Margareth Chan, diretora geral da WHO (2013) explica que essas doenças ainda permanecem ocultas em grande parte do mundo, sendo concentradas em áreas rurais, remotas, favelas urbanas e acometem grupos populacionais desfavorecidos economicamente. Há uma maior prevalência de casos de enteroparasitoses em países subdesenvolvidos.

As infecções parasitárias surgem como uma consequência dos descuidos com fatores socioeconômicos e sanitários, os quais favorecem os processos de contaminação (PHIRI et al., 2000; ADBI et al., 2017). Segundo Montresor et al (2002) e Basso et al

(2008) as crianças em idade escolar constituem o principal grupo de risco para infecção por parasitos, pois possuem um sistema imunológico ainda em maturação e possuem contato com água e no solo, locais que podem ser fontes de infecção.

Dentre os parasitos intestinais conhecidos, os helmintos mais frequentes em seres humanos, no estado de Paraná-Brasil são: *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. Entre os protozoários, destacam *Blastocystis* sp., *Giardia duodenalis* e *Endolimax nana* (SEGUÍ et al., 2018; OISHI et al., 2019). A sintomatologia das doenças parasitárias, apesar de se mostrarem semelhantes em alguns casos, são dependentes da espécie do parasito, carga parasitária e as condições nutricionais e imunológicas do hospedeiro (CARVALHO-COSTA et al., 2007; VALVERDE et al., 2011). As complicações conhecidas até hoje são: anemia, anorexia, desenvolvimento físico e cognitivo prejudicados, desnutrição, diarreia, dor abdominal, fraqueza, náuseas, irritabilidade, vômito e risco de óbito (PRADO et al., 2001; NORHAYATI et al., 2003; MELO et al., 2004; SCHMUNIS E LÓPEZ ANTUÑANO, 2010; WHO, 2013).

Diante disso, faz-se necessário um tratamento adequado e a interrupção dos ciclos de reinfecção (CARVALHO-COSTA et al., 2007; VALVERDE et al., 2011). O tratamento das enteroparasitoses consiste, basicamente, do emprego de antiparasitários, porém dependendo do medicamento, o tempo de tratamento é longo (aproximadamente sete dias) e possui efeitos colaterais como dor de cabeça, náusea e vertigem (ANDRADE et al., 2010). Atualmente, há estudos que abordam a relevância de se usar plantas medicinais no tratamento das parasitoses. Batista et al (2019) em uma pesquisa realizada no norte do Brasil, relatou que muitas populações conhecem e usam métodos fito terapêuticos para combater as doenças primárias, como as verminoses, isto se dá por consequência do fácil acesso as plantas medicinais e uma relevante eficácia no tratamento. Murtuzalievá (2018), em um artigo de revisão, relata casos clínicos de parasitoses intestinais dos quais ao serem tratados com fitoterapia apresentaram uma melhora significativa dos sintomas causados pela infecção parasitária.

Contudo, o tratamento contra essas parasitoses é essencial para manter uma qualidade de vida adequada para a população. Segundo Melo et al. (2004) um dos aspectos importantes é combater o ciclo de reinfecção através de medidas educativas e profiláticas na população.

2.2. ENTEROPARASIToses NO BRASIL

No Brasil, as parasitoses intestinais são um problema de saúde pública (DAMÁZIO et al., 2016). Os altos índices de prevalência no país podem ser explicados por aspectos socioeconômicos, culturais, sanitários, ambientais, entre outros. A prevalência no Brasil varia de acordo com a região e a população estudada (COLE et al., 2009; DAMÁZIO et al., 2016). Atualmente há estudos de prevalência em regiões pontuais do país (ANDRADE et al., 2010; FONSECA et al., 2010).

De acordo com a Fundação Nacional de Saúde do Brasil - FUNASA (2006), o saneamento básico é considerado uma das melhores e mais eficazes soluções para a promoção da saúde. No entanto, os dados do Sistema de Informação Hospitalar (SIH) e do Sistema Único de Saúde (SUS) mostram que, na última década, quase 700 mil hospitalizações por ano foram causadas por doenças relacionadas à falta ou inadequação do saneamento. Para a erradicação de parasitos intestinais, também são necessárias melhorias na educação para a saúde e mudanças em certos hábitos culturais, especialmente nas áreas rurais (ARAÚJO FILHO et al., 2011).

Segundo dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), no ano de 2018, as doenças infecciosas e parasitárias representaram a sexta causa de morbidade no país, totalizando 776.358 internações, o que corresponde mais de 7% da morbidade hospitalar no período.

Um estudo realizado por Ludwing et al. (1999) demonstrou que em uma cidade localizada na região oeste do estado de São Paulo, as parasitoses intestinais estavam correlacionadas com as condições de saneamento básico chegando a uma prevalência geral de 23,3% de casos na população estudada. No entanto, um estudo similar publicado Frei et al., (2008) demonstrou que a prevalência nessa região decaiu para 20,3% da população. Sendo assim, foi possível concluir que a queda na prevalência está relacionada com a melhoria no sistema de saneamento básico da região.

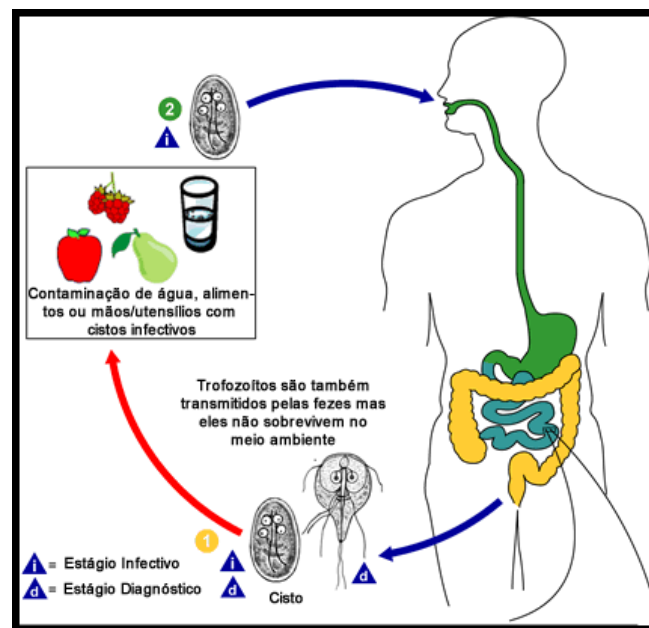
Já no estado do Paraná é possível encontrar alguns estudos de prevalência em regiões litorâneas e urbanas mais para leste do estado. Oishi et al., (2019) relataram aspectos epidemiológicos das enteroparasitoses na região do Campo do Tenente-PR, chegando a uma prevalência de 25,9% de casos positivos na população estudada. Seguí et al.

(2018) seguiu com um estudo semelhante na região litorânea do estado, relatando mais de 300 casos de parasitoses intestinais (cerca de 40% da população estudada). Apesar deste dado alarmante, estudos referentes a este tema ainda são escassos no estado do Paraná, o que se faz necessário um cuidado maior nas regiões vulneráveis a estas infecções junto a um espectro maior de estudos parasitológicos.

2.3. PRINCIPAIS PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS PREVALENTES EM HUMANOS

2.3.1 *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis é uma espécie de protozoário flagelado considerado patogênico, causador da giardíase. Segundo Efstratiou et al. (2017) este parasito está envolvido em cerca de 200 bilhões de casos de diarreia por ano. Além disso, se encontra como uma das principais causas de mortes em crianças menores de 5 anos de idade e contribui para 842 mil mortes anualmente (KOTLOFF et al, 2013; CHECKLEY et al, 2015; PLATTS- MILLS et al, 2015; EFSTRATIOU et al, 2017). Com um ciclo biológico monoxênico, sabe-se que este protozoário infecta através de cistos viáveis o intestino de humanos e de outros mamíferos por uma via de contaminação fecal-oral, isso ocorre através do consumo de alimentos e água contaminados, e também pela falta de higienização das mãos, a qual está constantemente suscetível a entrar em contato direto com a boca (porta de entrada para as infecções) (Figura 1). Infecções por *G. duodenalis* também podem causar Síndrome do Intestino Irritável (SII) e alergias alimentares (EINNARSON et al., 2016). Também já foram relatados a associação da presença de *Giardia duodenalis* com artrites (PAINTER et al., 2016), anemia (JAVED et al., 2019), miocardite eosinofílica fulminante aguda (AVSAR et al., 2019), colite ulcerosa (ZHEN et al., 2018) e câncer (HURNÍK et al., 2019).

Figura 1 - Ciclo evolutivo de *Giardia duodenalis*

FONTE: Adaptado de Centers for Disease (2017).

A presença deste parasito no trato digestivo inferior dos indivíduos, está diretamente relacionada com a qualidade de vida do indivíduo, sendo que somente o saneamento não seria o suficiente para a prevenção e a proteção contra a giardíase, pois um estudo revelou que 47,5% das amostras de água tratada estavam contaminadas com cistos de *G. duodenalis* (RAZZOLINI et al, 2010).

O diagnóstico de *Giardia duodenalis*, nos laboratórios convencionais, tem como base protocolos que analisam apenas a concentração de material fecal e as determinações por testes antigênicos, porém sabe-se que metodologias moleculares que utilizam enzimas, antígenos e análises de DNA possuem mais sensibilidade do que as técnicas tradicionais (BERTRAND et al, 2007).

As primeiras metodologias moleculares usadas para detecção de grupos de *Giardia duodenalis* foram validadas em meados dos anos 90 (ANDREWS et al., 1989). O uso da PCR (*polymerase chain reaction*) para identificar o gene beta-giardina, foi o *start* para as pesquisas avançarem e conseguirem distinguir as espécies de *Giardia duodenalis* (BAKER et al., 1988; MAHBUBANI et al., 1992). Com o uso de aloenzimas foi possível identificar as primeiras diferenças entre linhagens deste parasito, as quais são conhecidas hoje como grupos genéticos A e B (HOMAN et al, 1992; NASH et al., 1992). No entanto, foi Mayrhofer et al. (1995) que utilizaram, pela primeira vez, o termo

“assemblages” após detectar as linhagens AI e AII, BIII e BIV através do uso de marcadores genéticos.

Em 1996, utilizando a técnica de PCR-RFLP, Monis P.T, conseguiu identificar assembleias usando como marcador o gene glutamato desidrogenase (gdh). Quase que concomitantemente, em 1997, Hopkins et al., também conseguiram identificar diferentes grupos genotípicos de *Giardia duodenalis* usando o gene SSU-rRNA. Com este avanço, estudos que tinham como foco a análise genética, conseguiram descrever as demais assembleias e subassembleias deste parasito (MONIS et al., 1998; SULAIMAN et al., 2003).

O gene considerado mais apropriado para genotipagem dessa espécie incluem *locus* que codificam proteínas como beta-giardina (bgi), glutamato desidrogenase (gdh) e uma pequena subunidade do RNA ribossômico (SSU-rRNA) (CACCIÒ et al., 2002; ALMEIDA et al., 2010). Com estes estudos foi possível detectar até oito genótipos (A a H), classificados como assembleias (CACCIÒ & RYAN, 2008).

Os grupos A e B de *G. duodenalis* são os únicos descritos na literatura que infectam humanos e outros mamíferos, sendo, portanto, classificados com potencial zoonótico (LALLE et al., 2005; SPRONG et al., 2009). As demais assembleias (C a H) mostram uma faixa de hospedeiros mais restrita: encontradas apenas em animais domésticos e não domésticos (TABELA 1) (SPRONG et al., 2009).

Tabela 1 Grupos genotípicos de *Giardia duodenalis* descritos através do gene beta-giardina e SSU-rRNA, presentes em diversos hospedeiros

Genótipos	Hospedeiros Principais
A	Humanos, cães ruminantes domésticos e silvestres, gatos, suínos, equinos, roedores, marsupiais, furões e demais mamíferos
B	Humanos, cães, primatas não humanos, equinos, coelhos, ratos, chinchilas e castores.
C	Cães e outros canídeos
D	Cães e outros canídeos
E	Ruminantes, suínos e equinos
F	Gatos
G	Camundongos e ratos
H	Mamíferos marinhos

Fonte: Adaptado de XIÃO; FENG (2017)

É possível restringir a análise molecular e encontrar subgrupos, os quais são denominados como subassembleias. Isolados da assembleia A podem ser divididos em três subassembleias (AI, AII e AIII) que diferem entre si na constituição da sequência gênica, ou seja, apresentam *locus* de codificação diferenciados. Um estudo realizado por Sprong et al. (2009), demonstrou que as subassembleias AI e AII foram encontradas tanto em amostras humanas como de animais domésticos, com uma porcentagem maior de achado AII em humanos. Já a subassembleia AIII não foi descrita em amostras humanas, sendo considerada exclusiva para animais. A assembleia B possui as subassembleias BIII e BIV das quais BIII já foi encontrada em hospedeiros humanos e animais. Já a subassembleia BIV foi descrita como exclusiva para infecções humanas (THOMPSON, 2004).

Apesar de todos estes dados já descritos o potencial zoonótico dentro das assembleias e subassembleias de *G. duodenalis* ainda encontra-se em debate, principalmente em relação ao papel dos animais domésticos com as fontes de infecção

(XIÃO, FENG, 2017).

2.3.2 *Blastocystis* sp.

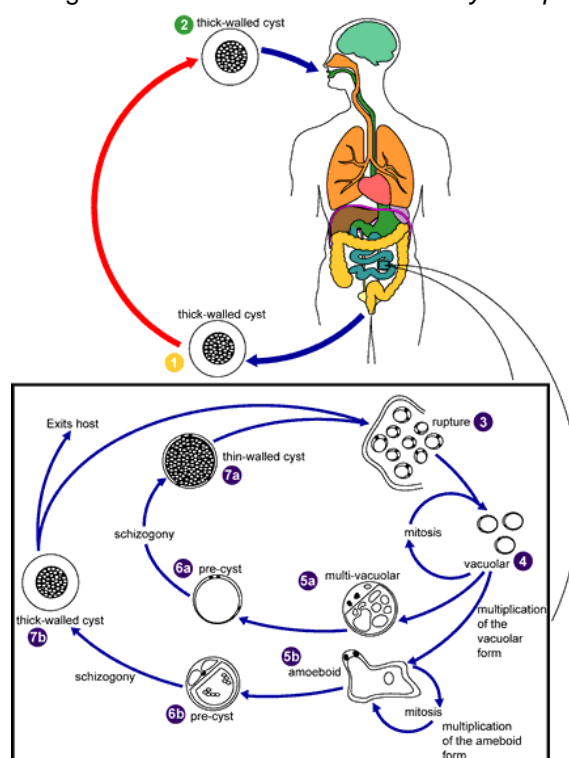
Os primeiros relatos de *Blastocystis* ocorreram em 1911, por Alexeieff, no entanto acreditava-se que este organismo pertencia ao filo das leveduras sendo então classificado como *Blastocystis enterocola* (ALEIXEIEFF, 1911). Um ano depois, Brumpt, analisando amostras fecais humanas o reclassificou como *Blastocystis hominis*, com a justificativa de ser derivado apenas de amostras humanas (BRUMPT, 1912). Ao longo dos anos surgiram muitas contradições a respeito desta espécie, não apenas ligadas à sua filogenia mas também com questões de patogenicidade, morfologia e ciclo evolutivo. Porém, em 1991, Zierdt e demais estudos comprovaram a sua semelhança ao grupo de protozoários intestinais e por obter casos de patogenicidade (Síndrome do Intestino Irritável) este organismo foi classificado como protozoário pertencente ao filo Stramenopiles, o único pertencente a este grupo que pode causar danos ao infectar humanos (ZIERDT, 1991; SILBERMAN et al., 1996; ARISUE et al., 2002; HOEVERS et al., 2005).

A espécie *Blastocystis hominis* foi determinada, através de análises genéticas, como exclusiva para achados em amostras fecais de humanos. Porém sabe-se que a transmissão desse protozoário está relacionada com aspectos zoonóticos, sendo reconhecida então como *Blastocystis* sp. (NOEL et al., 2005; SCICLUNA et al., 2006; STENSVOLD et al., 2006). Acredita-se que este é o termo correto a se usar pois dentre as análises dos subtipos genéticos estão sendo incluídos não apenas a espécie humana, mas também em animais, incluindo répteis e aves, os quais já foram descritos como hospedeiros de algumas classes genéticas desse parasito (YOSHIKAWA, et al., 2004; NOEL et al., 2005).

Blastocystis sp. é então considerada uma espécie de protozoário que infecta o intestino humano e outros seres vivos através da via fecal-oral. Segundo a literatura, sabe-se que este parasito possui 4 formas morfológicas: vacuolar, granular, amebóide e cística (FIGURA 2). Quando visto em microscopia óptica (de luz), através de metodologias específicas, a forma cística é a mais frequente em fezes consideradas com aspecto normal e a forma amebóide mais frequente em fezes diarreicas (ELGHAREEB et al., 2015). Em todo o mundo, por ano, são detectadas milhões de novas infecções (STENSVOLD, 2012).

Diarreia, dor abdominal, náusea e síndrome do intestino irritável já foram descritos como possíveis sintomas (ROBERTS et al., 2014; GENTEKAK et al., 2017). Porém, há autores que descrevem *Blastocystis* sp. como um agente participante da microbiota intestinal saudável (SCANLAN et al., 2014). Uma pesquisa realizada por Seguí et al., (2018) demonstrou que há relação entre a carga parasitária e as infecções decorrentes da presença de *Blastocystis* sp., pois entre os grupos que relataram alguma sintomatologia havia indivíduos que estavam infectados apenas por este parasito.

Figura 2 - Ciclo evolutivo de *Blastocystis* sp.



FONTE: Adaptado de Centers for Disease, 2017

O diagnóstico para *Blastocystis* sp. normalmente é realizado através de análises microscópicas. Em laboratórios convencionais são usadas técnicas de sedimentação espontânea, esfregaço e coloração por Giemsa e Lugol (EYMAEL et al., 2010; WONG et al., 2008). No entanto, dependendo do protocolo a ser utilizado a centrifugação pode destruir estes organismos reduzindo a sensibilidade de detecção do teste (ZHANG et al., 2012). Um método mais específico de análise é a cultura *in vitro* e o esfregaço com hematoxilina férrica ou tricômio (TAN, 2008; EYMAEL et al., 2010). Estes testes possuem maior sensibilidade quando comparado aos mencionados acima, porém, métodos baseados em pesquisa de DNA, vem sendo estudados como fonte de aprimorar o diagnóstico e classificar os grupos genéticos existentes desse parasite (STENSVOLD, 2013).

Nas análises moleculares, a base de detecção, é a filogenia do gene codificador da

pequena subunidade ribossomal (SSU-rDNA) a qual demonstra uma variedade de subtipos genéticos (ST) deste parasito. No entanto, o gene com a região específica para diferenciar cada STs é denominada *barcode*, a qual é isolada a partir de iniciadores específicos (RD5/BhRDr) de *Blastocystis* sp.

Alguns autores divergem quanto ao número de subtipos já detectados, segundo Masuda et al. (2018) há 17 subtipos que podem infectar mamíferos e aves. No entanto, Yason et al. (2015) descreve esta diversidade para 19 STs. O que se encontra de comum nas pesquisas é que há a presença de 10 subtipos em humanos (ST 1 ao 9 e ST12) sendo os mais frequentes ST1, 3 e 4 (STENSVOLD et al., 2016). Até os dias de hoje, ST9 é descrito como exclusivo de amostras humanas. Há estudos que trazem a prevalência dos subtipos em diferentes regiões do mundo, sendo que no Brasil esses dados ainda são escassos e até o momento foram descritos 5 subtipos (TABELA 2) (HOEVERS et al., 2005).

Um estudo recente realizado por Valença-Barbosa (2019) no estado do Rio de Janeiro-BR, relatou a presença em suínos dos subtipos 4 e 8 e em roedores apenas do subtipo 8 além de descrever a diversidade genética de *Blastocystis* sp. encontrada entre humanos e animais no estado do Rio de Janeiro.

Tabela 2 - Subtipos de *Blastocystis* sp. descritos através da análise do gene SSU-rRNA e a relação desses grupos genéticos presentes em diversos hospedeiros descritos e distribuição geográfica.

Subtipos (ST)	Hospedeiros	Países onde foram detectados
1	Humano/Galinha/Cão	Brasil, USA, Colômbia, Japão
2	Humano/ Macaco/Cão	Brasil, Japão, Colômbia
3	Humano/ Macaco/ Ruminantes/Cão	Brasil, Reino Unido, Japão, Tailândia
4	Humano/Porco/Rato	Brasil, Alemanha, USA
5	Humano/Porco/Gado/Cão	China, Japão
6	Humano/Galinha	Japão, Filipinas
7	Humano/Codorna	Singapura, Japão, Europa
8	Humano/Gambá/Cão	Brasil, Colômbia, Japão
9	Humano	Japão, Dinamarca
10	Camelo	Líbia
11	Elefante	Austrália
12	Humano/Girafa	Austrália
13	Cervo/ Marsupiais	Reino Unido
14	Gado/Carneiros	Líbia/ República Checa
15	Macaco/ Camelo	Líbia
16	Canguru	Japão
17	Roedores	Líbia

FONTE: Adaptado de: HOEVERS et al, 2005.

Alguns estudos demonstraram a relação entre a Síndrome do Intestino Irritável com infecções por *Blastocystis* sp. (ERTRUG et al., 2015; CAKIR et al., 2019). Quando relacionado ao ST presente nestes casos, a prevalência foi para o ST1, concluindo que este pode apresentar caráter patogênico (KESUMA et al., 2019).

Em relação ao aspecto zoonótico, tem sido proposto que *Blastocystis* sp. possa ter uma disseminação através do contato de humano para humano, de animal para humano e, possivelmente, de humanos para animais (VALENÇA- BARBOSA et al., 2019). Ainda não está claro se os animais podem servir como reservatórios dos subtipos de *Blastocystis* colonizando humanos. Um maior risco de infecção foi identificado em manipuladores de animais, apoiando a hipótese de transmissão de animais para humanos (PARKAR et al., 2007; STENSVOLD et al., 2009; PARKAR, 2010). Valença-Barbosa et al. (2019) relataram recentemente, em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro, a importância em se conhecer o verdadeiro reservatório de *Blastocystis* sp. já que ele se encontra frequentemente presente em muitos animais e em seres humanos, e com isso conclui que evidências adicionais ainda são necessárias para confirmar definitivamente a ocorrência ou não de transmissão zoonótica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREAS DE ESTUDO: COLOMBO E BOCAIÚVA DO SUL.

Colombo é um dentre os 14 municípios existentes na Região Metropolitana de Curitiba, e está a uma distância de 18 km da capital paranaense. Sua população estimada é de 240.840 pessoas, com densidade demográfica de 1076,72 hab/km², segundo IBGE de 2010 (FIGURA 3).

O município apresenta 81.3% de domicílios com esgotamento sanitário adequado, dos quais 42.9% apresentam domicílios urbanos em vias públicas com arborização e 24% de domicílios urbanos em vias públicas com urbanização adequada (presença de bueiro, calçada, pavimentação e meio-fio). A taxa de mortalidade infantil média na cidade é de 9,69 para 1.000 nascidos vivos. As internações devido a diarreias são de 0,4 para cada 1.000 habitantes. Quando comparado estes índices com todos os municípios do estado, em uma classificação de quem possuem maior taxa de mortalidade infantil, Colombo encontra-se na posição 231 de 399 e em relação aos casos de diarreia, posição 302 de 399. Quando comparado às cidades do Brasil todo, essas posições são de 3317 de 5570 e 3606 de 5570, respectivamente (IBGE, 2010).

Figura 3 - Localização geográfica do município de Colombo no estado do Paraná



FONTE: Adaptado de IPARDES,2019.

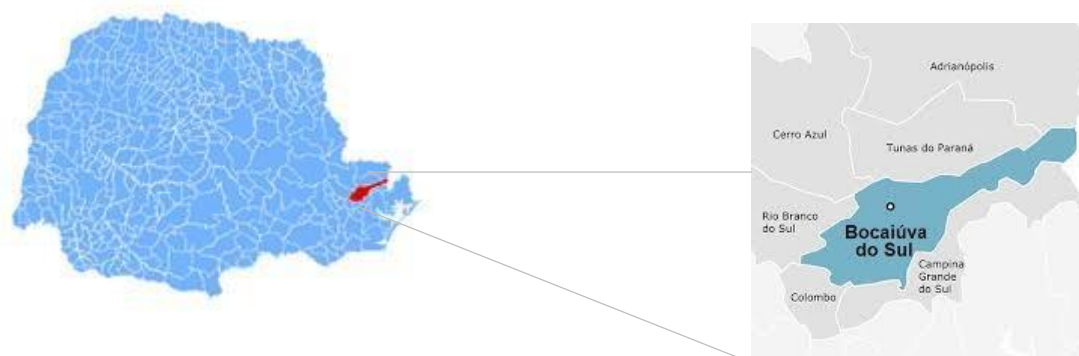
Bocaiúva do Sul também compõem a Região Metropolitana de Curitiba, e limita-se ao sudoeste do município de Colombo, possuindo uma distância de 40 km da capital. Sua

população estimada é de 12.477 pessoas, com densidade demográfica de 13,30 hab/km² segundo o IBGE de 2010. Seu acesso se dá pela BR 476- Estrada da Ribeira. (FIGURA 4).

Segundo o DATASUS de 2017, há na região três unidades básicas de saúde, uma clínica especializada, um consultório, um Hospital Geral e uma unidade móvel pré-hospitalar. A taxa de mortalidade infantil média na cidade é de 10.64 para 1.000 nascidos vivos. As internações devido a diarreias são de 0.2 para cada 1.000 habitantes. Quando comparado com outros municípios no país levando em conta a prevalência desses casos de internamento, se encontra na posição 4284^o, no total de 5570 municípios.

A região apresenta 58,9% dos domicílios com esgotamento sanitário adequado, 13,8% de domicílios urbanos em vias públicas com arborização e 10,4% de domicílios urbanos em vias públicas com urbanização adequada (presença de bueiro, calçada, pavimentação e meio-fio). Entre 5570 municípios, Bocaiúva é o 1863^o na comparação de esgotamento sanitário adequado a população (IBGE, 2010).

Figura 4 - Localização geográfica do município de Bocaiúva do Sul no estado do Paraná



FONTE: Adaptado de IPARDES,2019.

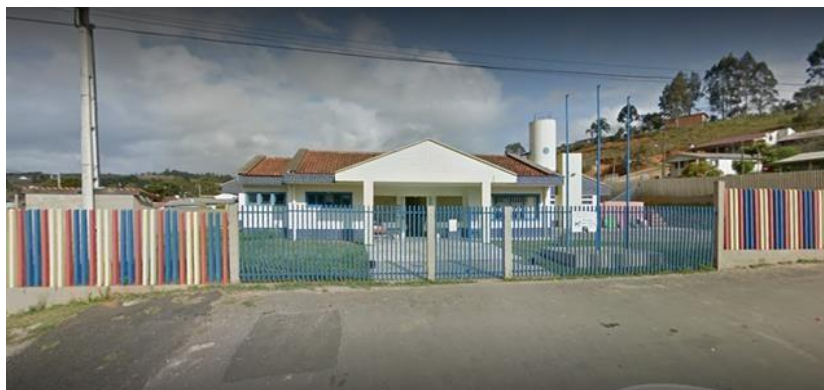
A partir da relevância desses dados socioeconômicos a pesquisa foi realizada a partir da coleta de amostras fecais de alunos entre 4 a 10 anos da Escola Municipal Antonio Cavassin (FIGURA 5) localizada em um ambiente rural do município de Colombo e alunos entre 2 a 10 anos de um Centro Municipal Educacional Infantil (CMEI) Cantinho do Céu (FIGURA 6) localizado na parte urbana de Bocaiúva do Sul. Para compor o n amostral foi coletado também amostras fecais de animais que conviviam diariamente com essas crianças, tanto no ambiente escolar quanto a domicílio.

Figura 5 - Fachada do estabelecimento de estudo localizado em Colombo-PR



FONTE: Google Maps, 2019.

Figura 6 - Fachada do estabelecimento de estudo localizado em Bocaiúva do Sul-PR



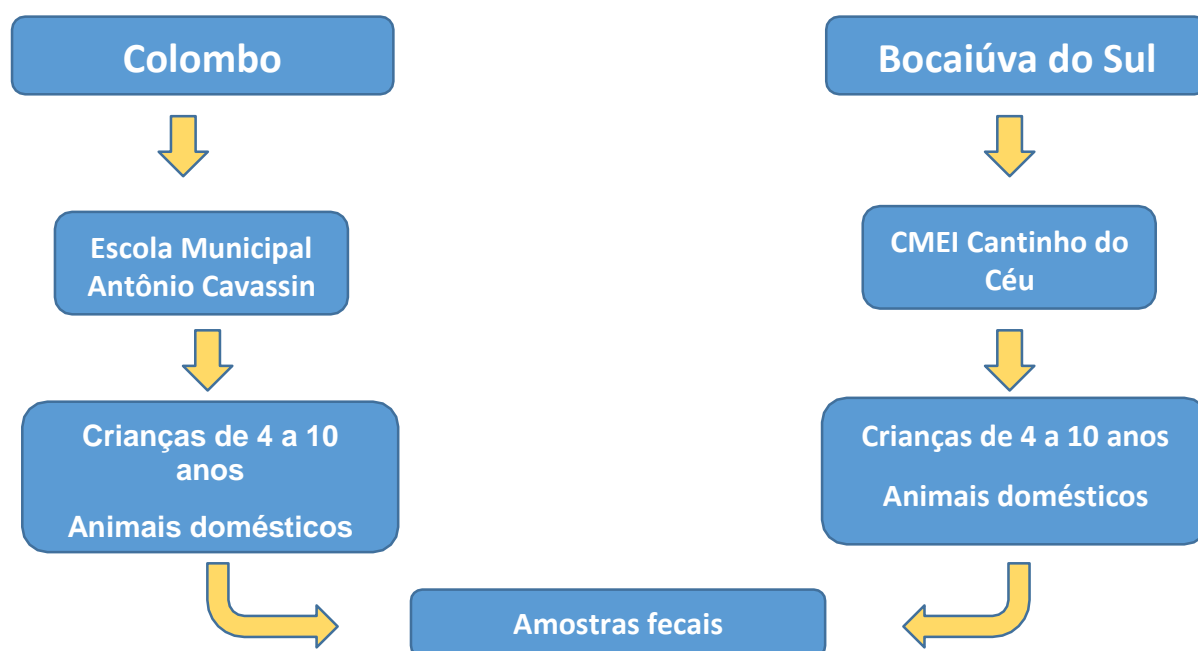
FONTE: Google Maps, 2019.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Inicialmente o projeto foi apresentado às Secretarias de Educação dos municípios que o aprovaram. Posteriormente, em cada estabelecimento, o projeto foi proposto para as diretoras e pedagogas que consentiram com a realização do estudo. Aos pais e/ou responsáveis pelos alunos, foi apresentado e explicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para que dessem a autorização para a participação dos escolares. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (CAAE:91542618.0.0000.0.010).

Para a coleta foi organizado um *Kit* individual que continha instruções de como coletar a amostra, um coletor universal com código específico o qual se referia ao nome do aluno e um plástico para transportar o coletor com a amostra. Estes *Kits* foram entregues aos alunos pelas professoras. A coleta foi realizada pelos responsáveis dos alunos, seguindo as instruções citadas na reunião com os pais junto ao passo a passo presente em cada *Kit*, já a coleta do material fecal dos animais foram realizadas também pelos responsáveis de cada aluno e por parte dos participantes da pesquisa, foi estabelecido como método a coleta através de sacos plásticos para as fezes recém encontradas no ambiente comum daquele animal. Quando realizada a coleta, os *Kits* foram entregues a diretora da escola, a qual entrou em contato com os participantes da pesquisa para agendar uma data para recolhimento do material. O fluxograma 1 retrata o primeiro processo deste estudo.

FLUXOGRAMA 1-COLETA DE AMOSTRAS NOS ESTABELECIMENTOS DE INTERESSE



3.3 MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os métodos e técnicas de diagnóstico coproparasitológico são amplos, sendo assim, é necessário buscar e perceber qual a melhor técnica para avaliar se há presença ou não de parasitos nas amostras, e poder tabelar os dados para análise de prevalência.

Normalmente, nestes estudos é necessária uma análise em triplicata, ou seja, coletadas cada uma em dias alternados. No entanto, em estudos epidemiológicos populacionais esse procedimento se limita devida a complexa abordagem que é necessária realizar com os participantes. Portanto, neste estudo trabalhamos apenas com uma

amostra de cada participante (tanto humanos como animais). Diante disso, deve-se levar em consideração os problemas de diagnósticos que possam ocorrer, como os resultados falso-negativos por consequência da ausência de uma “contra-prova” que confirme a existência ou não de parasitos no material.

Com as amostras no laboratório, elas foram conservadas em Formalina 10%, na proporção de para uma quantidade de fezes, três de fixador (1:3) (ASH & ORIHÉL, 1987). Desta forma, pretende-se conservar formas parasitárias que podem ser detectadas em amostras fecais através dos métodos de processamento e microscopia de luz. A Formalina é usada como fixador pois é um químico de fácil uso em trabalhos de campo e financeiramente econômico.

Antes da fixação, uma alíquota de cada amostra fecal presente no coletor foi retirada e colocada em frascos tipo “*ependorf*” de 2ml de capacidade, e essa quantidade foi fixada em Etanol 70%, na proporção de uma parte de fezes para cada duas de Etanol (2:1). Esse procedimento é essencial para se conservar a amostra e posteriormente servir para realizar o diagnóstico molecular.

3.4 TÉCNICA DE FORMOL-ACETATO DE ETILA MODIFICADO

Através de técnicas analíticas existentes pode-se detectar em amostras fecais os protozoários e helmintos que infectam o intestino humano e de animais.

A microscopia entra como um aspecto essencial de diagnóstico pois permite a visualização de características morfológicas dos parasitos.

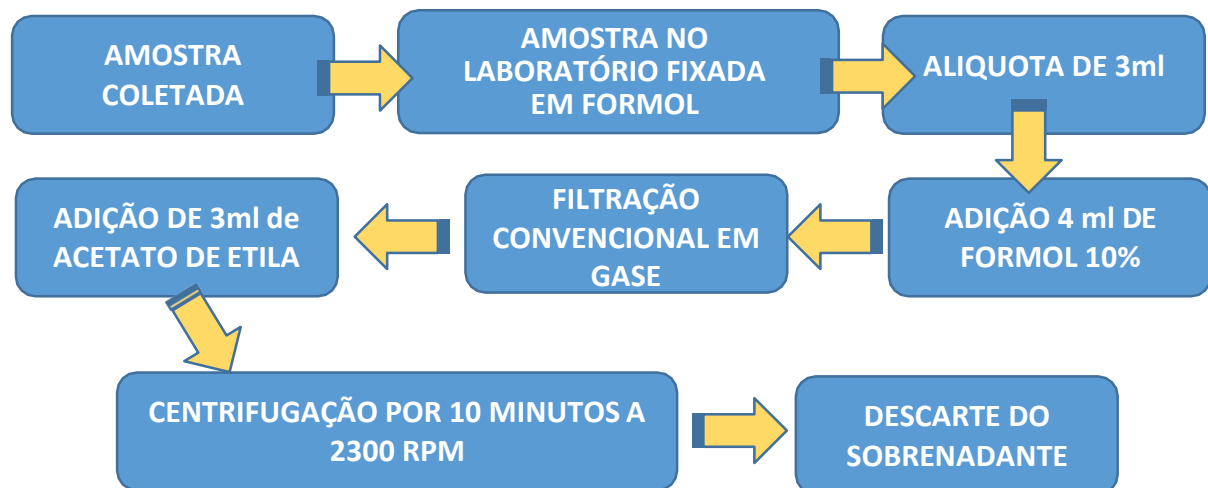
A técnica de formol-acetato de etila consiste em uma concentração difásica com a qual se extrai o material gorduroso e mucoso das amostras (RITCHIE, 1948). No presente estudo, foi utilizado a técnica modificada por Knight et al. (1976). Neste processo são adicionadas em tubos tipo “*falcon*” quantidades entre 2 a 3 ml de amostra fecal conservada em Formalina 10% e é acrescentado mais 4ml desse reagente. Posteriormente deve-se filtrar a amostra e adicionar 3ml de acetato de etila ao filtrado. Este conteúdo é então centrifugado a 2300 rpm por 10 minutos, e assim se obtém a separação do material gorduroso e mucoso do restante da amostra junto a formação de um pellet onde os parasitos, se presentes, estarão concentrados. Assim teremos uma

separação bifásica, a qual o sobrenadante será retirado e o material sedimentado (concentrado) será analisado (FLUXOGRAMA 2).

Com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, uma gota do sedimento e uma gota de lugol foram colocadas sobre uma lâmina de vidro, homogeneizadas e cobertas com uma lamínula para análise em microscópio. A leitura das amostras foi realizada em aumentos de 100x e 400x

O microscópio de rotina utilizado para todas as análises correspondia a marca Centauro, equipado com quatro objetivas (4x, 10x, 40x e 100x de aumento) e oculares de 10x de aumento. Para melhor identificação das estruturas parasitárias foram realizadas medições com micrômetro ocular calibrado para o referido microscópio. De cada amostra, três gotas foram analisadas para poder confirmar o diagnóstico.

FLUXOGRAMA 2 - PREPARO DAS AMOSTRAS



3.5 QUANTITATIVA DA PRESENÇA DOS PROTOZOÁRIOS

Segundo as premissas dos autores Graczyk et al. (2005), Speich et al. (2013) e Libman et al. (2013), foi estabelecida uma técnica de quantificação de protozoários existentes nas amostras. A qual indica que:

-Negativo (-): quando não aparece nenhum protozoário em todo o sedimento observado.

-Leve: quando aparece 1-2 estruturas parasitárias de uma mesma espécie por lamínula analisada ou pelo menos 1 por campo;

-Moderada: quando se encontra de 1 a 4 estruturas parasitárias da mesma espécie por campo.

-Alta: quando se encontra mais de 4 estruturas parasitárias da mesma espécie por campo

3.6 ANÁLISES MOLECULARES

As análises foram realizadas no Departamento de Tecnologia Farmacêutica e Parasitologia da Universidade de Valencia, Espanha.

Todas as amostras que apresentaram diagnóstico positivo para os protozoários *Giardia duodenais* e *Blastocystis* sp., através do método de Ritchie, foram tabeladas. Assim, das amostras conservadas em Etanol 70%, apenas as correspondentes com a tabela foram separadas para realizar a caracterização molecular.

Seguindo o protocolo de trabalho do laboratório, as amostras submetidas a caracterização molecular deviam estar na faixa entre 180 a 230 mg de massa, esta foi a referência estabelecida como a quantia necessária para se realizar a extração de DNA, amostras com quantidades inferiores a 180 mg não fizeram parte da pesquisa.

3.7 EXTRAÇÃO DE DNA

Da alíquota conservada em Etanol 70% foi retirado entre 180-230mg de amostra fecal e adicionado em um microtubo esterilizado para que seja realizado os procedimentos. O método foi padronizado através do protocolo de extração presente no kit QIAamp® FAST ADN Stool MiniKit (QIAGEN®, Hilden, Germany). Neste protocolo os procedimentos consistem em uma extração através de uma coluna (membrana) de sílica em gel a qual retém o DNA e os separa de qualquer outro componente que não seja ácido nucléico e que possa inibir, posteriormente, a reação de PCR. Para purificar esse DNA a coluna passa por processos de lavagens com soluções tampões específicos do *kit* e

então finalizada através da eluição dos ácidos nucléicos retido na sílica, em uma solução de 200ul. O DNA extraído de cada amostra foi conservado em um ambiente de -20°C até o momento do uso.

3.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de Biologia Molecular descrita por MULLIS et al. (1986), que tem como objetivo amplificar a quantidade de cópias de um fragmento de DNA particular, partindo de uma quantidade mínima, obtida inicialmente através da extração.

3.9 DETECÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE *Giardia duodenalis*

O primeiro método usado para detectar o DNA da espécie *Giardia duodenalis* foi qPCR (PCR quantitativa em tempo real), como o próprio nome já diz, é uma PCR quantitativa a qual monitora a amplificação do segmento de DNA e cria um gráfico comparativo entre a quantidade de DNA e a emissão de fluorescência detectada, que proporciona os chamados valores Ct, os quais permitem quantificar o DNA presente em cada amostra. A região alvo de DNA é de 62 pares de base (62-pb) do gene SSU rRNA do parasito (VERWEIJ et al., 2003). As reações de amplificação continham 3ul de DNA extraído, 0,5 uM dos *primers* Gd-80F e Gd-127R (TABELA 3), 0.4 µM de sonda, e 12.5 µL de TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). Para amplificar este DNA parasitário foi utilizado o termociclador MiniCycler™ (MJ Research, Watertown, MA, EUA). Usados como controle, foram incluídas na PCR uma amostra de água como controle negativo, e outra amostra conhecida previamente como positiva para DNA genômico de *G. duodenalis*.

Através dos resultados relevantes da qPCR (Ct entre 20 e 30) o restante de DNA extraído das amostras correspondentes foram amplificados para genotipagem de sequências gênicas que codificam a proteína β-giardina (BG) do protozoário. Um fragmento de aproximadamente 511-pb do gene BG de *G. duodenalis* foi amplificado usando o protocolo de PCR descrito por LALLE et al (2005). A reação de PCR (25 µL) foi adicionada em tubos de microcentrífuga que incluíam: dNTPS; Cloreto de Magnésio 50µM; água estéril; DNA Taq Polimerase (Taq Biotools); solução tampão; 3 µL de DNA

das amostras parasitárias e 0.4 μM de cada *primers* G7_F/G759_R na reação primária, e os G99_F/ G609_R na reação secundária (TABELA 3). A reação primária da PCR seguiu o padrão de amplificação: um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 7 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s; 65 °C durante 30 s; e 72 °C durante 1 min, e mais um passo final a 72 °C durante 7 min. As condições da segunda PCR também foram padronizadas e eram idênticas à primeira reação, exceto na temperatura de resfriamento que foi de 55 °C.

3.10 DETECÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE *Blastocystis* sp.

A identificação molecular de *Blastocystis* sp. leva como referência um protocolo de PCR direta que tem como alvo o gene SSU rRNA deste parasito (SCICLUNA et al., 2006). Este método utiliza os *primers* universais de *Blastocystis* sp. RD5 e BhRDr para amplificar um produto de PCR de aproximadamente 600-pb. Os reativos de amplificação (25 μL) são: dNTPS; Cloreto de Magnésio 50 μM ; água ultrapura; ADN Taq Polimerase Taq Biotools); solução tampão; 5 μL do DNA amostral; e 0.5 μM dos *primers* RD5/BhRDr (TABELA 3). As condições de amplificação consistem em um passo de 95 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de 1 min cada uma a 94, 59 e 72 °C, e uma etapa final adicional de 2 min a 72 °C. Para os controles negativos foram usadas águas ultrapura e para os controles positivos amostras previamente conhecidas como positivas para os parasitos de interesse.

Tabela 3 - *Primers* utilizados nas reações de amplificação (PCR) para obtenção do DNA de *Giardia duodenalis* e *Blastocystis* sp. nos municípios estudados

PROTOZOÁRIO	LOCUS	Primer	Sequência (5'-3')	Referência
<i>Giardia duodenalis</i>	SSU rRNA	Sonda	FAM-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ1	VERWEIJ et al. (2003)
		Gd_80 F	GACGGCTCAGGACAACGGTT	
		Gd_127 R	TTGCCAGCGGTGTCCG	
	βG	G7_7	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	LALLE et al. (2005)
		G759_R	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC	
		G99_F	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	
		G609_R	CTCGACGAGCTTCGTGTT	
<i>Blastocystis</i> sp.	SSU rRNA	BhRDr	GAGCTTTTTAACTGCAACAACG	SCICLUNA et al. (2006)
		RD5	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT	

3.11 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Com a finalidade de verificar se houve amplificação de DNA nas PCRs, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% seguindo a metodologia utilizada por Sambrook et al. (1989).

Os fragmentos de DNA gerados na PCR foram separados entre si de acordo com a carga presente na molécula. A eletroforese consiste em dois polos elétricos disposto em lados opostos numa cubeta, os fragmentos de DNA que são adicionados ao gel irão se separar, ou seja, serão atraídos ao lado oposto de sua própria carga. A distância percorrida por uma molécula de DNA é inversamente proporcional a seu conteúdo em pares de bases, ou seja, ao seu tamanho. Tudo isto é analisado a partir de bandas geradas no gel. Para saber o tamanho correspondente ao desejado, é aplicado um marcador padrão de tamanho conhecido, as bandas que corresponderem a este controle tende a ter os mesmos pares de bases que está buscando na análise.

Para a visualização das bandas amplificadas de DNA no gel de agarose se utiliza um sistema de captura e análise de imagem através de uma câmera de luz ultravioleta (UV).

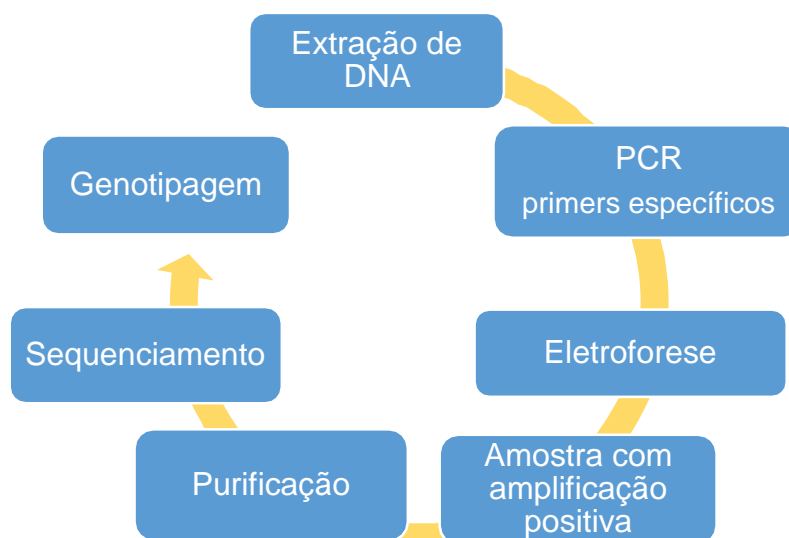
3.12 SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Após analisar a eletroforese em gel e detectar quais amostras foram positivas, o material restante do produto de PCR passou por um processo de purificação, o qual é baseado em centrifugações e lavagens da amostra para concentrar o material (DNA) presente. O material purificado foi encaminhado para um centro especializado em sequenciamento de DNA, dentro da Universidade de Valência, Espanha, esta técnica que consiste em conhecer as bases de nucleotídeos que compõem a sequência amplificada

O material sequenciado foi analisado pelo software chamado *Chromas Lite* versão 2.1. A partir disso pode-se comparar as sequências de nucleotídeos com a base de dados presente no *Center for Biotechnology Information* (NCBI) através da plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Todos estes

processos que levam a genotipagem estão representados pelo fluxograma 3. Esta análise consiste em encontrar consenso entre as sequências para diante disso identificar as Assembleias e Subassembleias de *Giardia duodenalis* com o uso do software gratuito MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Já as sequências de *Blastocystis* sp. foram obtidas da base de dados *Blastocystis* 18S (<http://pubmlst.org/blastocystis/>) para a confirmação dos subtipos encontrados.

FLUXOGRAMA 3 - ANÁLISES MOLECULARES



4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados desta pesquisa serão apresentados em 3 subcapítulos diferentes. Primeiramente, com o levantamento de dados referente ao público alcançado e apresentação das características macroscópicas das amostras obtidas, representando a fase pré-analítica deste estudo. Em seguida, será demonstrado os resultados da análise microscópica, dos quais foi possível obter a prevalência das parasitoses intestinais e quais as espécies encontradas, concomitantemente é relatado a diferença da prevalência dessas enteroparasitoses entre as idades, gênero dos participantes e a região estudada. A terceira fase são os resultados da análise molecular, apresentando detalhadamente desde as extrações de DNA até os dados obtidos de genotipagem. Em discussão se faz a comparação com estudos realizados no estado do Paraná e estudos de análise molecular exclusivos de *Giardia duodenalis* e *Blastocystis* sp.

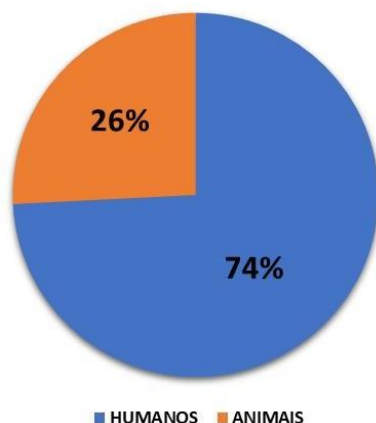
4.1 RESULTADOS PRÉ-ANALÍTICOS

Através de reunião com os pais e responsáveis dos alunos presentes nas escolas: Maria Antonieta (Colombo) e CMEI Cantinho do céu (Bocaiúva do Sul), foi possível realizar a entrega de, aproximadamente, 450 kits para coleta de fezes de humanos e de animais, do qual foi possível obter uma aceitação total (amostras humanas e animais) de 48,2% . Dentre os participantes, nos dois municípios, havia famílias que pertenciam a área rural e famílias que pertenciam a área urbana não sendo possível relatar qual área teve mais porcentagens de exames realizados. A reunião com os pais se mostra relevante na pesquisa pois abre caminho para uma abordagem maior de conhecimento em relação às enteroparasitoses, além de favorecer a participação dos sujeitos envolvidos, o debate e a autonomia para redução da prevalência das enteroparasitoses a partir da educação em saúde. O objetivo dessa reunião foi demonstrar como a pesquisa iria ocorrer, para isso foram usadas metodologias didáticas como imagens, apresentação e exemplos estatísticos relacionados a parasitoses intestinais no Brasil.

Com um total de 217 amostras, 161 foram referentes a fezes humanas e 56 à fezes de animais, conforme representado no Gráfico 1 e Tabela 4. Foi realizada, primeiramente, a análise macroscópica em todas as amostras, nas quais avaliou-se os aspectos que essas

amostras demonstravam, variando de fezes com aspecto diarreico até em aspecto mais rígido. 67,4% das 161 amostras obtidas de humanos tiveram a característica fecal analisada, onde o maior aspecto detectado foi o de característica "Normal".

GRÁFICO 1- Relação entre amostras humanas e animais



FONTE: O autor (2019)

Na Tabela 4 é possível observar o número de amostra equivalente a classe animal ou de humanos, que foi possível obter para a pesquisa. Dentre o total, 74% correspondem a amostras fecais de humanos. A porcentagem restante se distribui entre animais domésticos (cachorro e gatos) e animais não domésticos (aves, suínos, carneiros, coelhos, ruminantes), no entanto todos esses animais mantinham contato diário com os participantes da pesquisa, sendo a possível fonte para gerar a hipótese da transmissão zoonótica de alguns enteroparasitos.

Tabela 4 - Procedência e número de amostras fecais analisadas nos municípios de Colombo e Bocaiúva do Sul, Paraná

Procedência da amostra	Número de amostra obtida
Humanos	161
<i>Canis familiaris</i> (Cães)	43
<i>Felis catus</i> (Gatos)	1
<i>Gallus gallus domesticus</i> (Galinha)	4
<i>Ovis aries</i> (Carneiro)	2
<i>Sus scrofa domesticus</i> (Porco)	1
<i>Bos taurus</i> (Vaca)	3
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coelho)	2

FONTE: O Autor, 2019

4.2 PREVALÊNCIA DE ENTEROPARASITOSE NOS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E BOCAIÚVA DO SUL.

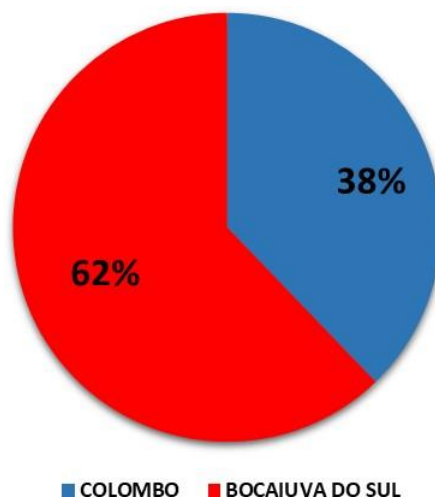
Do total de 217 amostras 37,7% foram positivas. Dentro deste percentual positivo para enteroparasitoses, 62,2% (51/217) correspondem as amostras obtidas em Bocaiúva do Sul e o restante, 37,8% (31/217) correspondem às obtidas no município de Colombo, conforme tabela 5 e gráfico 2.

Tabela 5 - Prevalência de enteroparasitoses conforme o total de amostras diagnosticadas positivas em cada município estudado.

TOTAL DE AMOSTRAS	AMOSTRAS POSITIVAS	AMOSTRAS POSITIVAS DE COLOMBO	%	AMOSTRAS POSITIVAS DE BOCAIÚVA DO SUL	%
217	82	31	37,8	51	62,2

FONTE: O autor (2019)

GRÁFICO 2- Percentual de amostras positivas por município



FONTE: O autor (2019)

Ainda dentro desse percentual positivo, foram encontradas 9 diferentes espécies parasitárias, sendo 5 de protozoários e 4 de helmintos. Comparativamente, os estudos relatados no estado do Paraná, segundo Toledo et al (2009), pode-se observar prevalências de 91,4% de enteroparasitoses. Bem como, Oishi et al (2019), que observaram uma prevalência de 24,8% de enteroparasitoses em seu estudo no município do Campo do Tenente, relatando também a frequência de casos por infecções por protozoários (90%). Já, Seguí et al (2018), constatou que no litoral do estado a prevalência de parasitoses intestinais chegou a 46,1%, sendo também os protozoários como principais agentes de infecção.

Com isso pode-se perceber que na maioria dos casos diagnosticados de parasitoses intestinais o agente causador é um protozoário. Fica evidente que, apesar de poucos estudos nesta área, existe um nível consideravelmente alto por infecções por estes parasitos, relatados também em Seguí et al (2018) e Oishi et al (2019).

Entre os resultados positivos para protozoários, mais da metade são diagnosticados para *Blastocystis* sp (58,5%), seguido de *Giardia duodenalis* (14,6%), *Endolimax nana* (13,4%), *Entamoeba coli* (8,5%) e *Iodamoeba bütschlii* (1,2%). Com a maior prevalência *Blastocystis* sp. é considerado o protozoário mais encontrado em amostras fecais (COCO et al, 2016; OISHI et al, 2019; SEGUÍ et al, 2018). A tabela 6 demonstra a quantidade de protozoários encontrados nas amostras positivas de humanos e de animais, onde percebe-se a ocorrência de mais de um protozoário por amostra.

Tabela 6- Prevalência de protozoários em amostras humanas e de animais entre os municípios de Colombo e Bocaiúva do Sul

	COLOMBO	BOCAIÚVA DO SUL	TOTAL	% DO TOTAL DAS AMOSTRAS POSITIVAS
<i>Blastocystis</i> sp	29	19	48	58,5
<i>Endolimax nana</i>	5	6	11	13,4
<i>Entamoeba Coli</i>	3	4	7	8,5
<i>Giardia duodenalis</i>	7	5	12	14,6
<i>Iodamoeba butschlii</i>	0	1	1	1,2

FONTE: O autor (2019)

Alguns autores citam que a detecção de *Blastocystis* sp. é inviabilizada em técnicas que utilizem água (AMATO NETO et al, 2003; AMATO NETO et al, 2004; NASCIMENTO,

MOITINHO, 2005; ALARCÓN et al, 2007) e por esta razão não é detectada nos trabalhos que utilizam os métodos de sedimentação espontânea (HPJ). O método de Ritchie, utilizado já em muitos estudos, tem como eficiência concentrar as espécies parasitárias e eliminar gotículas de gordura que podem confundir com a morfologia do parasito quando em análise ao microscópico (OISHI et al, 2019). Outra discussão muito relevante em estudos com diagnósticos de *Blastocystis* sp. é a patogenicidade, que apesar de ainda não estar bem descrita, sabe-se que o diagnóstico é importante pois crianças de países em desenvolvimento e paciente imunocomprometidos são as populações que apresentam maior impacto patogênico em casos de infecção.

A segunda maior prevalência (14,6%) foi relatada para a espécie *Giardia duodenalis*. Dois estudos realizados em 2007 na cidade de Guarapuava observaram que entre os diagnósticos apresentados na cidade, cerca de 70% correspondiam aos casos de *Giardia duodenalis* (BUSCHINI et al, 2007 e PITTNER et al, 2007). O que difere quanto estudos no interior norte do estado, Rolândia e Iratama, as porcentagens apontaram cerca de 30% dos casos. Com uma prevalência de enteroparasitoses semelhante a estas regiões Campo do Tenente, cidade próxima a capital Curitiba-PR, relatou 20,6% de infecções por *Giardia duodenalis* (OISHI et al., 2019). Já no litoral paranaense esse parasito apareceu como o terceiro mais prevalente, correspondendo cerca de 11% das infecções por protozoários (SEGUÍ et al., 2018). Por ser considerado um protozoário altamente patogênico, e de fácil contaminação pela ingestão de água ou alimentos contaminados, a alta prevalência de achados nos dias de hoje se mostra preocupante e serve como um sinal de alerta para ir em busca de melhorias na saúde pública das áreas apresentadas.

Entre os resultados positivos, o helminto com maior prevalência relatada foi Ancilostomídeos (19,5%), seguido de *Ascaris lumbricoides* (4,8%), *Trichuris trichiura* (2,4%) e *Capillaria* sp. (2,4%). A tabela 7 demonstra a quantidade de helmintos relatados nas amostras positivas.

Tabela 7- Prevalência de helmintos em amostras humanas e de animais nos municípios de Colombo e Bocaiúva do Sul

	COLOMBO	BOCAIÚVA DO SUL	TOTAL	% DO TOTAL DAS AMOSTRAS POSITIVAS
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	3	4	4,8
Ancilostomídeos	6	13	16	19,5
<i>Trichuris trichiura</i>	1	1	2	2,4
<i>Capillaria</i> sp.	0	2	2	2,4

Nota-se que nem todas as amostras diagnosticadas positivas, nos dois municípios, possuíam exclusivamente protozoários ou helmintos, algumas amostras possuíam protozoários e helmintos, sendo então consideradas de característica poliparasitismo.

Estes dados contrastam quando comparados com os estudos de Seguí et al (2018) e Oishi et al (2019), os quais relataram a maior prevalência para *Ascaris lumbricoides*, 5% e 8,5%, respectivamente. No entanto, estes estudos não obtiveram casos de Ancilostomídeos.

A distribuição dos casos diagnosticados de parasitoses, com protozoários e helmintos, entre as diferentes idades, gênero e localidade também foram analisadas. Dentre os gêneros dos participantes, a maior prevalência de enteroparasitos foi detectada no grupo feminino, este achado corrobora com estudos anteriores, que apesar de não demonstrarem significância nos dados (46,6% feminino e 45,8% masculino) mostram que casos maiores de infecção são encontrados em mulheres (SEGUÍ et al, 2018). Ao analisar estes resultados, entre as faixas etárias dos participantes, é possível observar que entre os 6-10 anos de idade a prevalência de infecção representou mais da metade dos casos. Resultado este que difere de outros estudos realizados no estado do Paraná. Para Oishi et al (2019) e Seguí et al (2018) os casos de enteroparasitoses foi estatisticamente significativa na faixa etária de 10 a 14 anos. Portanto, a prática de acesso à saúde pública e às políticas de uso de antiparasitários na infância, pela comunidade, devem ser revistas e ou reforçadas.

4.3 ANÁLISES MOLECULARES

Uma vez posto o protocolo das análises moleculares, as 12 amostras diagnosticadas positivas para *Giardia duodenalis* e 48 amostras diagnosticadas positivas para *Blastocystis sp.* estas foram separadas para iniciar estes procedimentos. Como informado na metodologia, todas as amostras tinham sido devidamente conservadas em etanol 70% para posterior análise molecular. Ao realizar a pesagem de cada alíquota fecal, apenas 22 amostras apresentaram a quantidade suficiente de 180-230mg para realizar a extração de DNA. O *kit* usado para esse procedimento tem como protocolo a eficiência da reação para esta margem de miligramas de amostra, sendo assim, este estudo optou por seguir esta

indicação e continuar as análises apenas com as amostras que se enquadravam neste parâmetro.

4.3.1 GENOTIPAGEM DE *Giardia duodenalis*

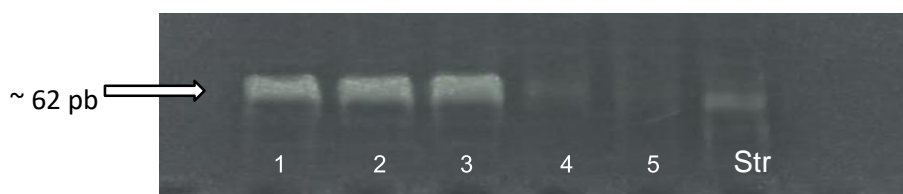
Do total de amostras diagnosticadas microscopicamente para *Giardia duodenalis* (n=12) 9 correspondiam à amostra humana e 3 correspondiam à amostra animal, sendo assim, foi possível realizar a extração de DNA de 100% delas, pois todas estavam dentro dos parâmetros estabelecidos no protocolo (TABELA 8). Após o procedimento de qPCR foi possível obter apenas 5 amostras com valores de Ct representativos (30-32), ou seja, equivalentes a curvas de amplificação. Estas por fim seguiram a metodologia da análise molecular, e a PCR com intuito de amplificar a região codificadora da proteína β -giardina (BG) foi positiva para um total de 3 amostras (FIGURA 7). Procedimentos de sequenciamento e genotipagem foram realizados com êxito (TABELA 8).

Tabela 8 - Porcentagens dos resultados alcançados dos métodos moleculares para genotipagem de *Giardia duodenalis*

	TOTAL DE AMOSTRAS <i>Giardia duodenalis</i> = 12	
	N	%
DNA disponível	12	100
qPCR positiva	5	41,6
qPCR negativa	7	58,4
PCR-BG positiva	3	25

qPCR: Reação em Cadeia pela Polimerase Quantitativa de caráter quantitativo. **PCR-BG:** Reação em Cadeia de Polimerase com gene beta-giardiana (BG) como interesse a se obter milhares de cópias. n: número de amostras

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose para detecção de *amplicons* do gene beta-giardina de *Giardia duodenalis*



Resultado da eletroforese para detecção da amplificação de DNA, proveniente das 5 amostras fecais positivas para *Giardia duodenalis*, utilizando iniciador específico (~62bp) para teste da positividade da qPCR. St (Standart – fragmentos com pares de bases diferenciados de peso molecular de 100pb InvitrogenTM).

Através das análises dos genotipados foi observado a presença da subassembleia BIII para apenas uma amostra, as outras duas apresentaram a subassembleia BIV. As três amostras correspondem a amostras humanas, ou seja, para este protozoário não foi possível obter a genotipagem de nenhuma amostra referente a material fecal de animais, o que impediu a discussão de caráter zoonótico dessas Assembleias. A impossibilidade de analisar todas as amostras pode ser explicado, principalmente, ao método de armazenamento do material, que deve ser congelado ou mantido em quantidades proporcionais de Etanol 70%, além da existência de inibidores de PCR concomitantemente com e a composição do material fecal que não foi possível eliminar no momento da extração de ácidos nucleicos.

Estes resultados corroboram com a literatura quanto ao conhecimento da prevalência da assembleia B em hospedeiros humanos (XIÃO, FENG, 2017). Apesar de não ser possível analisar parâmetros zoonóticos, sabe-se que a subassembleia BIV até hoje só foi descrita em humanos (THOMPSON, 2004), portanto a interpretação possível para este resultado é que duas das amostras positivas para *Giardia duodenalis* não apresentavam genótipo correspondente ao zoonótico. Apenas o resultado referente ao genótipos BIII pode ser considerado como transmissão zoonótica, porém é necessário dar continuidade às análises, ou seja, realizar novas coletas das amostras referentes aos animais que mantem contato direto com estes participantes e repetir os procedimentos das análises moleculares.

Ao analisar outras pesquisas semelhantes é possível comparar o estudo de SEGUÍ et al, 2018, que teve o genótipo BIV como a segunda maior prevalência no litoral paranaense e apenas 5,3% de casos BIII, a maior prevalência correspondeu a subassembleia AII, a qual não foi detectada neste presente estudo. Outro estudo também realizado no estado do Paraná, COLLI et al., 2005, apresentou 70,4% de casos com subassembleias BIV e 3,7% de BIII. Outro estado que apresentou porcentagens semelhantes a estes grupos genéticos foi o estado do Rio de Janeiro, com maior porcentagem para BIII (18,7%) (FARIA et al., 2016). Apesar desses estudos serem destinados a regiões que, teoricamente, possuem saneamento básico adequado e instalações de água potável, estes dados são também indicativos da falta de hábitos higiênicos, como lavar as mão, o que representa um papel importante na propagação e transmissão dos cistos de *Giardia duodenalis* através do manejo de alimentos por pessoas infectadas ou diretamente no contato indivíduo-indivíduo.

4.3.2 GENOTIPAGEM de *Blastocystis* sp.

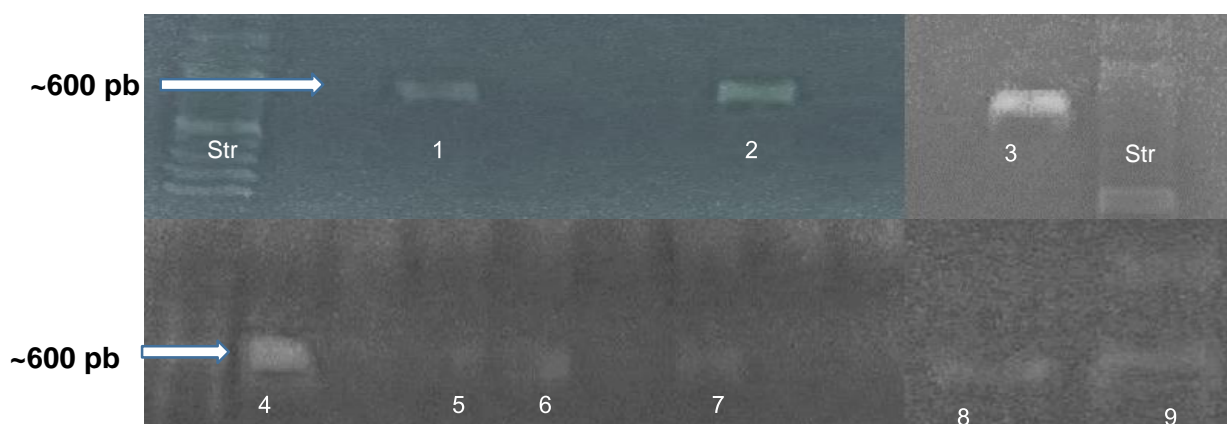
As amostras diagnosticadas via análise microscópica relataram a presença de *Blastocystis* sp. em 48 participantes, sendo 41 correspondente à amostra humana e 7 correspondentes à amostra animal. Das alíquotas fecais devidamente conservadas para realização das análises moleculares apenas 33,3% (n= 16) tiveram o DNA extraído para a realização dos demais procedimentos. A queda no número de amostras, para análise molecular, teve como consequência a baixa quantidade de material (<180mg) disponível (TABELA 9). Das 16 amostras submetidas ao processo de PCR, 9 apresentaram ampliações suficientes, o que garantiu a realização de sequenciamento e genotipagem de, aproximadamente, 19% dos resultados positivos para este protozoário (FIGURA 9).

Tabela 9- Porcentagens dos resultados alcançados dos métodos moleculares para genotipagem de *Blastocystis* sp.

	TOTAL DE AMOSTRAS	
	<i>Blastocystis</i> sp. = 48	
	n	%
DNA disponível	16	33,3
PCR positiva	9	18,7
PCR negativa	7	14,5
Genotipagem	9	18,7

PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase como interesse a se obter milhares de cópias do gene SSU-rRNA.
n: número de amostras.

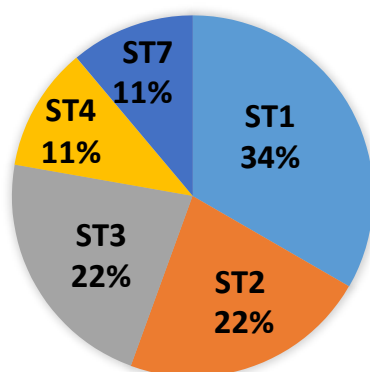
FIGURA 9- Eletroforese em gel de agarose para detecção de *amplicons* do gene SSU-rRNA de *Blastocystis* sp.



Resultado da eletroforese para detecção da amplificação de DNA, proveniente das amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp., utilizando o iniciador específico (~600bp) para teste da positividade da PCR. St (Standart – fragmentos com pares de bases diferenciados de peso molecular 100bp InvitrogenTM).

A Figura 9 demonstra as ampliações do gene SSU-rRNA para classificação dos subtipos genéticos de *Blastocystis* sp. caracterizados entre as 9 amostras genotipadas, as quais 8 eram de humanos e 1 de animal (cachorro). Dentro dos 19 subtipos já descrito na literatura, foi relatado a presença de 5 STs diferentes, sendo que 34% representa a maioria dos achados para o ST1, em seguida pode-se notar a presença de ST2 (n=2) e ST3 (n=2), e relatado apenas um caso de ST4 e ST7. Dos dois casos relatados para o ST3, um se refere à, única, amostra animal do estudo.

GRÁFICO 3- Percentual das sequências de nucleotídeos encontrados através do gene SSU-rRNA nas amostras positivas de humanos e animais para *Blastocystis* sp. nos municípios de Colombo e Bocaiúva do sul



FONTE: O autor, 2019.

Até os dias de hoje 9 subtipos (ST 1-9) de *Blastocystis* sp. já foram identificados em infecções humanas com predomínio de ST 1-4 que podem também infectar primatas não humanos, outros mamíferos e até aves (HOEVERS et al., 2005; VALENÇA-BARBOSA, 2017; SEGUI et al, 2018). O subtipo 9, até os dias atuais só foram descritos em infecções humanas, em contrapartida, os subtipos 10 a 17 foram encontrados apenas em animais. A literatura descreve o ST3 como o mais prevalente em humanos, seguido de ST1 E ST2. Pesquisas englobando a América do Sul descrevem o ST4 como raro na região, sendo encontrado apenas em primatas não humanos, o que contrasta com achados no continente europeu, os quais classificam esse subtipo como responsável pela patogenicidade da Síndrome do Intestino Irritável em humanos. O presente estudo relatou

caso de Subtipo ST4 (11%) no município de Bocaiuva do Sul-PR, dado este de alta relevância pois contrasta com as referências acima, porém complementa estudos como de SEGUÍ et al (2018) que concluiu 2,6% das amostras referentes a este parasito sendo do ST4 e VALENÇA-BARBOSA (2017) que também encontrou este subtipo no estado do Rio de Janeiro (1,6%).

O levantamento de dados realizados neste trabalho traz como comparação três trabalhos científicos. O primeiro de Malheiros et al (2011) corrobora com dados de prevalência em maior porcentagens para o ST1, apresentando apenas três diferentes grupos genéticos identificados (ST1,2 e 3), estas análises foram realizadas no norte do Brasil. Já em SP, considerada uma região de clima e cultura mais parecida com o estado do Paraná, teve como maior prevalência casos de ST3 (MELO et al., 2017) também relatando apenas os três primeiros grupos genéticos. No mesmo ano, Oliveira-Arbex et al (2017) publicaram achados de ST7 no estado de São Paulo, com maiores prevalências para ST1 e ST3. Esta análise se torna importante pois os ST6 e ST7 são encontrados geralmente em aves (DAVID et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017; RAMIREZ et al., 2016) raros são os casos descritos em humanos, porém neste presente estudo a porcentagem encontrada foi de 11% no município de Bocaiuva do Sul, o que corrobora com o estado de São Paulo que apresentou 5,3% deste subtipo (Oliveira-Arbex et al., 2017).

Neste contexto, sabe-se que que crianças podem se infectar facilmente em atividades ao ar livre, principalmente quando há presenças de aves no local, pois estes são considerados potentes reservatórios para infecções humanas, situação está que compõem o potencial zoonótico (MATTIUCCI et al., 2016). A presença de ST7 em alguns países parte da premissa que a cultura local tende a possuir aves como animais domésticos (ALFELLANI et al., 2013; YOSHIKAWA et al., 2016). Como potencial zoonótico pode ser discutido neste trabalho a relação de dois casos diagnosticados com ST3, um referente ao indivíduo do município de Bocaiúva do Sul e ao animal de estimação, um cachorro, que convive neste mesmo ambiente e que também apresentou infecção por *Blastocystis* sp. de ST3. Mesmo sabendo que esta classe genotípica pode estar presente em animais e humanos, está análise levanta a hipótese de reação cruzada a qual necessitaria de continuidade da pesquisa para avaliar mais parâmetros e comprovar a fonte de infecção entre eles.

Outro aspecto muito discutido nos dias de hoje é a relação da sintomatologia das infecções por este protozoário e os subtipos existentes. A relevância clínica da infecção é

encontrada em indivíduos saudáveis até pacientes que apresentam transtornos gastrointestinais. Particularmente, crianças que não apresentam nenhuma sintomatologia com escassa higiene pessoal, podem servir como portadores, disseminando o parasito pela comunidade (OLIVEIRA-ARBEX et al., 2017). Kesuma et al (2019) realizou um estudo com o objetivo de relacionar a Síndrome do Intestino Irritável com a presença de STs em amostra de adolescentes indonésios, com isso foi possível concluir que o ST1 está significativamente relacionado ao desenvolvimento desta patogenicidade, com um fator de risco equivalente a 2,9 (alto) sendo então considerável um subtipo patogênico. Este dado serve como alerta para esta pesquisa, pois como visto acima, este subtipo (ST1) genética representou 34% dos achados positivos para *Blastocystis* sp.

Apesar dos últimos estudos, que trazem esta metodologia para entender cada vez mais sobre *Blastocystis* sp., revelarem dados extremamente relevantes e que aos poucos vão eliminando dúvidas referentes à classe genética, patogenicidade e formas de transmissão deste parasito, ainda se faz necessário mais estudos com este viés, em regiões do Brasil, que apresentam condições de saneamento e esgoto precários. Levando em consideração o estudo de Kesuma et al (2019) referente a patogenicidade dos subtipos de *Blastocystis* sp., a prevalência de ST1 no estado do Paraná serve como um alerta para tratar possíveis casos de Síndrome do Intestino Irritável, que ainda não estavam relacionadas a esta infecção.

5 CONCLUSÕES

- A espécie *Blastocystis* sp. representou o maior agente causador de enteroparasitoses nos municípios de Colombo e Bocaiuva do Sul, seguido de *Giardia duodenalis* e o terceiro mais prevalente, *Endolimax nana*.
- A caracterização molecular de *Giardia duodenalis* representa as subassembleias BII e BIV o que corrobora com a literatura quanto a prevalência desses grupos genéticos presentes no estado do Paraná-BR. As análises só foram possíveis de serem realizadas em amostras humanas
- A caracterização molecular de *Blastocystis* sp. identificou 5 subtipos diferentes, sendo que a maior prevalência representou o ST1. No entanto, foi possível identificar ST4 e ST7, os quais segundo a literatura são considerados raros na região da América do Sul e raros em amostras humanas.
- A detecção do subtipo ST3 para *Blastocystis* sp. em uma amostra humana e outra em animal, mais especificamente de um cachorro, levanta a hipótese de transmissão zoonótica, já que a relação desses achados correspondem ao indivíduo e ao animal que convivem num mesmo ambiente. Para *Giardia duodenalis* não foi possível obter a relação zoonótica, em razão da falta de amostras animais positivas para este parasito. Portanto, se faz necessário ampliar esta pesquisa, aumentando o número de amostras, o que resultará numa análise molecular mais abrangente do potencial zoonótico destes parasitos.

6 REFERÊNCIAS

- ABDI, M.; NIBRET, E.; MUNSHEA, A. Prevalence of intestinal helminthic infections and malnutrition among school children of the Zegie Peninsula, northwestern Ethiopia. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, p. 92, 2017.
- ALARCÓN, R. S. R.; AMATO NETO, V.; GAKIYA, E.; BEZERRA, R. C. Observações sobre *Blastocystis hominis* e *Cyclospora cayetanensis* em exames parasitológicos efetuados rotineiramente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 255, 2007.
- ALEXIEFF, A. Sur la nature des formations dites "Kystes de *Trichomonas intestinalis*." **Comptes Rendus Biologies Journal**, v.71, p. 296, 1911.
- ALMEIDA A; POZIO E; CACCIÒ S.M. Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new Real- Time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. **Microbiology**, v.76, p. 1895-1901, 2010.
- ALFELLANI, M.A; STENSVOLD, C.R; VIDAL-LAPIEDRA, A; ONUOHA, E.S.U; FAGBENRO-BEYIOKUD, A.F; CLARKA, G. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. **Acta Tropical**, v. 126, p. 18, 2013.
- AMATO NETO, V.; ALARCÓN, R. S. R.; GAKIYA, E. BEZERRA, R. C.; FERREIRA, C. S.; BRAZ, L. M. A. Blastocistose: controvérsias e indefinições. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p.517, 2003.
- AMATO NETO, V.; ALARCÓN, R. S. R.; GAKIYA, E. FERREIRA, C. S.; BEZERRA, R. C.; SANTOS, A. G. Elevada porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p.356, 2004.
- ANDREWS, R.H, MAYRHOFER, G; MACKRILL, J. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Cambridge University Press**, v. 116, p. 19, 1998.
- ANDRADE, E. C.; LEITE, I. C.; RODRIGUES, V. O.; CESCO, M. G. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Revista de Atenção Primária à Saúde**, v. 13, p.240, 2010.
- ARAUJO FILHO, H, B; CARMO-RODRIGUES, M.S; MELOO, C.S; MELLI, I.C; TAHAN, S; MORAIS, M.B. Parasitoses intestinais se associam a menores índices de peso e estatura em escolares de baixo estrato socioeconômico. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 4, p. 528, 2011.
- ARISUE N, HASHIMOTO T, YOSHIKAWA H. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of *Stramenopiles* inferred from multiple molecular sequence data. **Journal Eukaryot Microbiology**, v.49, p.42, 2002.
- ASH, L.R, ORIHHEL, T.C.Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. **American Society of Clinical Pathologists**, v. 328, p.66, 1987.
- AVSAR, S; OZ, A; CNAR, T; OSKEN, A; GIVENÇÇ, T. Acute fulminant eosinophilic myocarditis due to *Giardia lamblia* infection presented with cardiogenic shock in a young patient. **Anatolomogy Journal Cardiology**, v.21, p. 233, 2019.

- BAKER, D. A.; HOLBERTON, D. V. e MARSHALL, J. Sequence of a giardin subunit cDNA from *Giardia lamblia*. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.7177, 1988.
- BASSO, R.M.C; SILVA-RIBEIRO, R.T; SOLIGO, D.S; RIBACKI, S.I; CALLEGARI-JACQUES, S.M; ZOPPAS, B.C.A. Prevalence and predictors associated with intestinal infections by protozoa and helminths in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 268, 2008.
- BATISTA, LPA; BRANDÃO EG; ROSAS, LV; PINTO, MN; PANDOJA, TM; ARAÚKO, TV; LIMA, RA. Levantamento de plantas medicinais utilizadas contra parasitoses e verminoses intestinais no município de Atalaia do Norte-AM. **Biota Amazonia Open Journal System**, v. 9, p. 39, 2019.
- BERTRAND I; SCHWARTZBROD J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. **Water Research**, v. 41, p. 82, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses**. Brasília, 2005.
- BRUMPT, E. *Blastocystis hominis* N. sp. et formes voisines. **Bulletin Société Pathologie Exotique**, v. 5, p. 725, 1912.
- BUSCHINI, M. L. T.; PITTNER, E.; CZERVINSKI, T.; MORAES, I. F.; MOREIRA, M. M.; SANCHES, H. F.; MONTEIRO, M. C. Spatial distribution of enteroparasitoses among school children from Guarapuava, State of Parana, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 10, p.578, 2007.
- CARVALHO-COSTA, F. A.; GONÇALVES, A. Q.; LASSANCE, S. L.; SILVA NETO, L. M.; SALMAZO, C. A. A.; BÓIA, M. N. - *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p.153, 2007.
- CACCIÒ, S.M; GIACOMO, M.D; POZIO, E. Sequence analysis of the b-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1030, 2002.
- CACCIÒ SM; RYAN U. Zoonotic potential of *Giardia*. **Journal Parasitology**. v. 43, p.956, 2008.
- CAKIR, F, CICEK M, YILDRIM, TH. Determination the Subtypes of *Blastocystis* sp. And Evaluate the Effect of These Subtypes on Pathogenicity. **Acta Parasitology**, v. 1, p12, 2019.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/giardia/>>. Acesso em: 3 de agosto de 2019.
- CHECKLEY, W.; WHITE JR, A. C.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M. J.; CHALMERS, R. M.; CHEN, XIAN-MING; FAYER, R.; GRIFFITHS, J. K.; GUERRANT, R. L.; HEDSTROM, L.; HUSTON, C. D.; KOTLOFF, K. L.; KANG, G.; MEAD, J. R.; MILLER, M.; PETRI JR, W. A.; PRIEST, J. W.; ROOS, D. S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R. C. A.; WARD, H. D.; VOORHIS, W. A. V.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUP, E. R. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, p. 94, 2015.
- COCO, V. F.; MOLINA, N. B.; BASUALDO, J. A.; CÓRDOBA, M. A. *Blastocystis* spp.: avances,

- controversias y desafíos futuros. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 3, p. 120, 2017. COLE, E. R.; VITÓRIA, E. L.; AMIGO, B. V.; MELOTTI, J.; PONTES, P. F. Prevalência de enteroparasitoses entre os moradores do bairro Terra Vermelha no município de Vila Velha, Espírito Santo, e possíveis fatores causais relacionados. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p. 138-152, 2009.
- COLLI, C.M; BEZAGIO, R.C; NISHI, L; BIGNOTTO, T.S, FERREIRA, E.C, FALAVIGNA-GUILHERME, A.L; GOMES, M.L. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in Southern Brazil indicates a relationship among them. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.
- DAMÁZIO, S. M.; SOARES, A. R.; SOUZA, M. A. A. Perfil parasitológico de escolares da localidade de Santa Maria, zona rural do município de São Mateus/ES, Brasil. **Revista de Atenção Primária à Saúde**, v. 19, p. 267, 2016.
- DARYANI, A.; HOSSEINI-TESHNIZI, S.; HOSSEINIA, S.; AHMADPOUR, E.; SARVIA, S.; AMOUEIA, A.; MIZANIA, A.; GHOLAMID, S.; SHARIFA, M. Intestinal parasitic infections in Iranian preschool and schoolchildren: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 169, p. 83, 2017.
- DATAUS. Departamento de informática do SUS, 2018. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/>>. Acesso em: 11 de julho de 2019.
- DAVID, E.B; GUIMARÃES, S; OLIVEIRA, A.P; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G; BITTENCOURT, G.N; NARDI, A.R.M; RIBOLLA, P.E.M, FRANCO, R.M.B; BRANCO, N; TOSINI, F; BELLA, A; POZIO, E, CACCIO, S.M. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 115, 2015.
- EFSTRATIOU, A.; ONGERTHA, J. E.; KARANISA, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. **Water Research**, v. 114, p. 14, 2017.
- EINARSSON, E; MA'AYEH, S; SVÄRD, S. An up-date on *Giardia* and giardiasis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 52, 2016.
- ELGHAREEB, A, S; YOUNIS, M,S; FAKAHANY, F,E,A. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. **Tropical Parasitology**, v. 5, p.36-46, 2015.
- ERTUG, S; MALATIALY, E; ERTABAKLER, H; OZLEM, C. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates and evaluation of clinical symptoms detected in Aydin province, Turkey. **Mikrobiology Bulletin**, v. 1, p.104, 2015.
- EYMAEL D, SCHUH GM, TAVARES RG. Padronização do Diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas de coloração. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 3, p.309, 2010.
- FARIA, C.P; ZANINI, G.M; DIAS, G.S; DA SILVA, S; FREITAS, M.B; ALMENDRA, R; SANTANA, P; SOUSA, M.D.C. Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 120, 2016.
- FERREIRA, L.F.; CHIEFFI, P.P.; ARAUJO, A. Parasitismo não é doença parasitária. **Norte**

Ciência, v. 3, p. 221, 2012

FERREIRA, L. F.; REINHARD, K. J.; ARAÚJO, A. **Fundamentos de Paleoparasitologia**, v. 3, p. 484, 2011.

FONSECA, E. O. L.; TEIXEIRA, M. G.; CARMO, E. H.; COSTA, M. C. N. C. Prevalência e fatores associados às geo-helmintíases em crianças residentes em municípios com baixo IDH no Norte e Nordeste brasileiros. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, p.152, 2010.

FREI, F; JUNCANSEN, C; RIBEIRO-PAES, J.T. Levantamento epidemiológico das parasitoses intestinais: viés analítico decorrente do tratamento profilático. **Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 24, p.2925, 2008.

FUNASA. **Sustentar, saneamento e sustentabilidade em áreas rurais**, 2006.

GAMBOA, M. I.; BASUALDO, J. A.; KOZUBSKY, L.; COSTAS, E.; RUA, E. C.; LAHITTE, H. B. Prevalence of intestinal parasitosis within three population groups in La Plata, Argentina. **European Journal of Epidemiology**, v. 14, p. 61, 1998.

GENTEKAKI E, CURTIS BA, STAIRS CW, KLIMEŠ V, ELIÁŠ M. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote Blastocystis. **PLOS Biology**. v.15,p. 54, 2017.

GRACZYK, T.K; SHIFF, C.K; TAMANG,L; MUNSAKA, F; BEITIN, A.M; MOSS, W. The association of Blastocystis hominis and Endolimax nana with diarrheal stools in Zambian school-age children. **Parasitology Research**, v. 98, p.43, 2005.

HOMAN, W.L.; VAN ENCKEVORT, F.H.J.; LIMPER, L.; VAN EYS, G.J.J.M.; SCHOONE, G.J.; KASPRZAK, W.; MAJEWSKA, A.C.; e VAN KNAPEN, F. Comparison of Giardia from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. **Parasitology Research**, v. 78, p. 323, 1992.

HOPKINS, R.M.; MELONI, B. P.; GROTH, D.M.; WETHERALL, J.D.; REYNOLDS, J. A; THOMPSON, R. C. RibosomalRNAsequencing reveals differences between the genotypes of Giardia isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal of Parasitology**, v. 44, p. 51, 1997.

HURNIK, P; ZIAK, D; ZIDLIK, V; URBAN, O; NOHÝNKOVÁ, E. Another case of coincidental Giardia infection and pancreatic câncer. **Parasitology International**, v. 71, p. 160, 2019.

JAVED, IN; TAJAMMAL, R; IJAZ, SH; MAHMOOD, S. Tear Drops in the Duodenum": Uncommon Cause of Iron Deficiency Anemia in Adults. **Cureus**, v. 8, p. 11, 2019.

HOEVERS JD, SNOWDEN KF. Analysis of the ITS region and partial ssu and lsu rRNA genes of Blastocystis and Proteromonas lacertae. **Parasitology International**, v.131, p.187, 2005.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E PESQUISA. Cidades - Censo 2010. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>> Acesso em: 21 agosto de 2019.

IPARDES. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Disponível em: <<http://www.ipardes.pr.gov.br/>>. Acesso em: 21 de agosto de 2019.

KESUMA, Y; FIRMANSYAH, A; BARDOSONO, S; SARI, I,P; KURNIAWAN, A. Blastocystis ST-1 is associated with Irritable Bowel Syndrome-diarrhoea (IBS-D) in Indonesian adolescences. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 6, p. 67, 2019.

KNIGHT,W.B; HIATT R.A.; CLINE, B.L; RITCHIE, L.S. A modification of the formolether concentration technique for increased sensitivity in detecting *Schistosoma mansoni* eggs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, p.823, 1976.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A. S. G.; ZAIDI, A. K. M.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J. B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, p. 222, 2013.

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

LIBMAN, M.D; GYORKOS, T.W; KOKOSKIN, E; MACLEAN, J.D. Detection of pathogenic protozoa in the diagnostic laboratory: result reproducibility, specimen pooling, and competency assessment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2205, 2013.

LUDWING, K.M; FREI, F; FILHO, F.A; RIBEIRO-PAES, J.T. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p.555, 1999.

MAHBUBANI, M. H; BEJ, A. K; PERLIN, M. H; SCHAEFER III F. W; JAKUBOWSKI, W. AND ATLAS, R. M. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using Polymerase Chain Reaction and gene probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.7, 1992.

MALHEIROS, A.F.; STENSVOLD, C.R; CLARK, C.G; BRAGA, G.B; SHAW, J.J.Short Report : Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the brazilian Amazon region, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 1053, 2011.

MASUDA, A; SUMIYOSHI, T; OHTAKI, T; MATSUMOTO, J. Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from dairy cattle in Kanagawa, Japan. **Parasitology International**. v. 67, p.702, 2018.

MATTIUCCI, S; CRISAFI, B; GABRIELLI, S; PAOLETTI, M, CANCRINI, G. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. **Epidemiology and Infection**, v. 144, p.646, 2016.

MAYRHOFER G.; ANDREWS R. H, EY P. L.; CHILTON N. B. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. **Parasitology**, v. 111, p. 17, 1995.

MELO, M. C.; KLEM, V. G.; MOTA, J. A.; PENNA, F. J. Parasitoses intestinais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, p.13, 2004.

MELO,G.B; PAULA,F.M; MALTA, F.M; MARUTA, C.W; CRIADO, P.R; CASTILHO, V.L.P; GONÇALVES, E.M.N; SANTO, M.C.E; GRYSCHKEK, R.C.B.Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil.**Parasitology Open**, v.3, p.92, 2017.

MONIS, P.T. Molecular genetic analysis of *G. intestinalis* isolates at the GDH gene. **Parasitology**, v. 112, p. 12, 1996.

MONIS, P.T. ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology**, v.116, p.19, 1998.

MULLIS, K; FALOONA, F; SCHARF, S; SAIKI, R; HORN, G; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology**, v.51, p. 273, 1986.

MURTUZALIEVA, M. Treatment of Parasites in Dagestan with Phytotherapy. **Current Traditional Medicine**, v. 4, p. 110-119, 2018.

MONTRESOR, A; CROMPTON, D.W; HALL, A; BUNDY, D.A; SAVIOLI, L. Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes. **World Health Organization**, 2002.

NASCIMENTO, S. A.; MOITINHO, M. L. R. Blastocystis hominis and other intestinal parasites in a community of Pitanga city, Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 213-217, 2005.

NASH T.E; MCCUTCHAN T; KEISTER D; DAME J.B; CONRAD J.D; GILLIN F.D; Restriction-
endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. **Journal Infectious Diseases**, v. 152, p.73, 1992.

NOE'L, DUFERNEZ F, GERBOD D, EDGCOMB VP, DELGADO-VISCOGLIOSI P, Ho LC, SINGH M, WINTJENS R, SOGIN ML, CAPRON M, PIERCE R, ZENNER L. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species and zoonosis. **Journal. Clinic. Microbiology**, v.43, p.348, 2005.

NORHAYATI, M.; FATMAH, M. S.; YUSOF, S.; EDARIAH, A. B. Intestinal Parasitic Infections in Man: **A Review Medical Journal of Malaysia**, v. 58, p. 296-306, 2003.

OISHI, CY; KLISIEWICZ, DR; SEGUÍ, R; KOSTER, PC; CARMENA, D; TOLEDO, R; ESTEBAN, JG; MUNÓZ-ANTOLI, C. Reduced prevalence of soil-transmitted helminths and high frequency of protozoan infections in the surrounding urban area of Curitiba, Paraná, Brazil. **Parasite Epidemiology Control**, v.7, p. 2405, 2019.

OLIVEIRA-ARBEX, A.P; DAVID, E.B; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G; BITTENCOURT, G.N; GUIMARÃES, S. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. **Epidemiology & Infection**, v.144, p. 1428, 2016.

OLIVEIRA-ARBEX, A.P, DAVID, E.B, GUIMARÃES, Blastocystis genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, p. 63, 2017.

Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, et al. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. **Parasitology**, v, 3, p. 359, 2007.

PAINTER, JE; COLLIER, SA; GARGANO, JW. Association between *Giardia* and arthritis or joint pain in a large health insurance cohort: could it be reactive arthritis?. **Epidemiology and Infection**, v. 3, p. 471, 2016.

PHIRI, K.; WHITTY, C. J. M.; GRAHAM, S. M.; SSEMBATYA-LULE, G. Urban/rural differences in prevalence and risk factors for intestinal helminth infection in southern Malawi. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 94, p. 381-387, 2000.

PNUD. PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO. **Índice de Desenvolvimento Humano Municipal Brasileiro**. Brasília: PNUD, Ipea, FJP, 2013.

PRADO, M. S.; BARRETO, M. L.; STRINA, A.; FARIA, J. A. S.; NOBRE, A. A.; JESUS, S. R. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na Cidade de Salvador (Bahia, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 101, 2001.

SBI -Sociedade Brasileira de Infectologia, 2016. **Parasitoses Intestinais**. Disponível em: <<https://www.infectologia.org.br/pg/827/parasitoses-intestinais>>. Acesso em: 12 agosto 2019.

SPRONG H; CACCIO S.M; Giessen, J.W. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLoS Negligence Tropical Diseases**. v. 3, p.12, 2009.

STENSVOLD CR, SURESH GK, TAN KS, THOMPSON RC, TRAUB RJ, VISCOGLIOSI E. Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. **Trends Parasitology** v. 3, p.93, 2007.

STENSVOLD, C. R.; CLARK, C. G. Current status of *Blastocystis*: A personal view. **Parasitology International**, v. 65, p. 771, 2012.

SULAIMAN, I.M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.; SCHANTZ, P.M.; DAS, P.; LAL, A.A.; XIAO, L.; Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, p.1452, 2003.

PLATTS-MILLS, J. A.; BABJI, S.; BODHIDATTA, L.; GRATZ, J.; HAQUE, R.; HAYT, A.; MCCORMICK, B. J. J.; MCGRATH, M.; OLORTEGUI, M. P.; SAMIE, A.; SHAKOOR, S.; MONDAL, D.; LIMA, I. F. N.; HARIRAJU, D.; RAYAMAJHI, B. B.; QURESHI, S.; KABIR, F.; YORI, P. P.; MUFAMADI, B.; AMOUR, C.; CARREON, J. D.; RICHARD, S. A.; LANG, D.; BESSONG, P.; MDUMA, E.; AHMED, T.; LIMA, A. A. A. M.; MASON, C. J.; ZAIDI, A. K. M.; BHUTTA, Z. A.; KOSEK, M.; GUERRANT, R. L.; GOTTLIEB, M.; MILLER, M.; KANG, G.; HOUP, E.R. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **The Lancet Global Health**, v. 3, p. 575, 2015.

PITTNER, E.; MORAES, I. F.; SANCHES, H. F.; TRINCAUS, M. R.; RAIMONDO, M. L.; MONTEIRO, M. C. Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade escolar na cidade de Guarapuava, PR. **Revista Salus**, v. 1, p.100, 2007.

RAMIREZ, J.D; SÁNCHEZ, A; HERNÁNDEZ, C; FLÓREZ, C; BERNAL, M.C; GIRALDO, J.C; REYES, P; LÓPEZ, M.C; GARCÍA, L; COOPER, P.J; VICUÑA, Y; MONGI, F; CASERO, R.D. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. **Infection Genetics and Evolution**, v. 4, p. 32, 2016.

RAZZOLINI, M. T. P.; SANTOS, T. F. S.; BASTOS, V. K. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. **Journal of Water and Health**, v. 8, p.404, 2010.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of United States Medical Department**, v. 8, p.330, 1948.

- ROBERTS, T; STARK, D; HARKNESS, J; ELLIS, J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. **Gut Pathogens**. v. 6, p.17, 2014.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. Molecular cloning. **A laboratory manual**, v. 1,2, 3, 1989.
- SCANLAN, P.D; STENSVOLD, C.R; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M; HEILIG, H.G; DE VOS, W.M; O'TOOLE, P.W, COTTER, P.D.The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. **FEMS.Microbiology Ecology**, v. 90, p. 330, 2014
- SCHMUNIS, G. A.; LÓPEZ-ANTUÑANO, F. J.World-Wide Importance of Parasites. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, v.1, p.45, 2010.
- SCICLUNA SM, TAWARI B, CLARK CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. **Protista**, v.1, p.177, 2006.
- SEGUÍ, R; MUNÓZ-ANTOLI, C; KLISIEWICZ, D.R; OISHI, C.Y; KOSTER, P.C, CARMENA, D. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 490, 2018.
- SILBERMAN JD, SOGIN ML, LEIPE DD, CLARK CG.Human parasite finds taxonomic home. **Nature**, v. 4, p. 380, 1996.
- SPEICH, B; MARTI, H; AME, S.M; ALI, S.M; BOGOCH, I.I; UTZINGER, J.; FARTHING, M.J.G.6. Giardiasis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 25, p.515, 2013.
- STENSVOLD CR. Thinking *Blastocystis* out of box. **Cell**, v. 28, p.305, 2013.
- STENSVOLD CR, CLARK CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. **Parasitology International**, v. 6, p.763, 2016.
- SULAIMAN, I.M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.; SCHANTZ, P.M.; DAS, P.; LAL, A.A.; XIAO, L.; Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging Infectious**, v.11, p. 1452, 2003.
- TAMURA, K; STECHER, G; PETERSON, D. FILIPSKI, A, KUMAR, S.Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v 30, p. 2725, 2013.
- TAN KS. New insights on classification, identification and clinical relevance of *Blastocystis* spp. **Clin Microbiology Research**, v. 4, p. 639, 2008.
- TÉLLEZ, A.; MORALES, W.; RIVERA, T.; MEYER, E.; LEIVA, B.; LINDER, E. Prevalence of intestinal parasites in the human population of León, Nicaragua. **Acta Tropical**, v. 66, p. 25, 1997.
- THOMPSON, A.R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**. v. 126, p 35, 2004.
- TOLEDO, M.J; PALUDETTO, A.W; MOURA, F.T; NASCIMENTO, E.S; CHAVES, M; ARAÚJO, S.M; MOTA, L.T.Avaliação de atividades de controle para enteroparasitoses em uma aldeia Kaingang do Paraná. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p.981, 2009.
- VALENÇA-BARBOSA, C; BATISTA, R.D.J; IGREJA, R.P, LEVY, C.M.D; MACEDO, H.W;

SANTOS H.L.C. Distribution of Blastocystis subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasites & Vectors**, v.10, p. 518, 2017.

VALENÇA-BARBOSA, C; BOMFIM, T.C.B; TEIXEIRA, B, R; GENTILE, R; NETO S.F.C; MAGALHÃES, B.S.N. Molecular epidemiology of Blastocystis isolated from animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS ONE**, v. 14, 2019.

VALVERDE, J.G.; MOREIRA, C. J. C.; LELES DE SOUSA, D. L. S.; JAEGER, L. H.; MARTINS, P. P.; MENESES, V. F.; BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A. Prevalência e epidemiologia de parasitoses intestinais, como revelado por três técnicas distintas em uma área endêmica na Amazônia brasileira. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 35, 2011.

VERWEIJ, J.J; SCHINKEL, J; LAEIJENDECKER, D; VAN ROOYEN, M.A; VAN LIESHOUT, L; POLDERMAN, A.M. Real-time PCR for the detection of Giardia lamblia. **Molecular and Cellular Probes**, v. 17, p. 23, 2003.

WONG KHS, NG GC, LIN RTP, YOSHIKAWA H, TAYLOR MB, TAN KS. Predominance of subtype 3 among Blastocystis isolates from a major hospital in Singapore. **Parasitology Research**, v. 4,p.663, 2008

WHO. Who Health Organization. **World Health Statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: World Health Organization; 2018

WHO. World Health Organization. Infectious Diseases. Home Page, Intestinal Parasites, 2013. Disponível em <<http://www.who.int/topics/helminthiasis/en/>> Acesso em: 22 março 2019.

WÖRDEMANN, M; POLMAN, K; MENOCA HEREDIA, L.T; JUNCO DIAZ, R.; COLLADO MADURGA, A.M; NÚÑEZ FERNÁNDEZ, .A; CORDOVI PRADO, R.A; RUIZ ESPINOSA, A; PELAYO DURAN, L; BONET GORBEA, M; ROJAS RIVERO, L, GRYSEELS, 2006. Prevalence and risk factors of intestinal parasites in Cuban children. **Tropical Medicine & International Health**, v. 11: p. 1813–1820, 2006.

XIAO, L., FENG, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens Cryptosporidium spp. and Giardia duodenalis. **Food and Waterborne Parasitology**, v.89, p. 14-32, 2017

YASON, J.A; TAN; K.S.W. Seeing the Whole Elephant: Imaging Flow Cytometry Reveals Extensive Morphological Diversity within Blastocystis Isolates. **Public Library of Science One**, v. 10, p.1-15, 2015

YOSHIWAKA, H; IWAMASA, A. Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU RNA gene. **Parasitology International**, v. 65, p. 785-791, 2004.

YOSHIKAWA, H; KOYAMA, Y; TSUCHIYA, E; TAKAMI, K. Blastocystis phylogeny among various isolates from humans to insects. **Parasitology International**, v. 65, p.759, 2016.

ZHANG X, QIAO J, WU X, DA R, ZHAO L, WEI Z. In vitro culture of Blastocystis hominis in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. **International Journal Infections Diseases**, v. 16, p. 23,2012.

ZHEN, Y; LIAO, L; ZHANG, Y. Intestinal Giardiasis Disguised as Ulcerative Colitis. **Reports in Gastrointestinal Medicine**, v. 2018, p. 3, 2018.

ZIERDT C,H. Blastocystis hominis. **Clinic Microbiology Reseach**, v. 4, p.61,1991.