

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Blastocystis* sp.
DE ORIGEM HUMANA E ANIMAL**

CAROLINA VALENÇA BARBOSA

RIO DE JANEIRO

2018

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CAROLINA VALENÇA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Blastocystis* sp.
DE ORIGEM HUMANA E ANIMAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Celular e Molecular do Instituto
Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor.

Orientadora: Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

RIO DE JANEIRO

2018

Ficha Catalográfica

Valença-Barbosa, Carolina.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Blastocystis* sp. DE ORIGEM HUMANA E ANIMAL / Carolina Valença-Barbosa. - Rio de Janeiro, 2018.

168 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Claudia Masini d'Avila Levy .

Bibliografia: f. 93-117

1. Epidemiologia molecular. 2. diversidade genética. 3. hospedeiros. 4. PCR. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: CAROLINA VALENÇA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Blastocystis* sp.
DE ORIGEM HUMANA E ANIMAL**

ORIENTADORA: Dra. Claudia Masini d'Avila
Levy

Aprovada em: 30/08/2018

EXAMINADORES:

Dr. Márcio Neves Bóia (IOC/Fiocruz) – **Presidente e membro interno**

Dr. Walter Martin Roland Oelemann (UFRJ/RJ) – **Revisor e membro externo**

Dra. Helena Keiko Toma (UFRJ/RJ) – **Membro externo**

Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (IOC/Fiocruz) – **Suplente interno**

Dra. Yara Leite Adami Rodrigues (UFF/RJ) – **Suplente externo**

Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2018

Primeiramente, FORA TEMER

“Jamais aprisionarão nossos sonhos.”

(Lula, 2018)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio e carinho incondicionais. Sempre me incentivando a seguir firme e forte no meu caminho, buscando sempre alcançar os meus objetivos e realizar meus sonhos sem jamais desistir. Agradeço as longas conversas, ensinamentos e experiências compartilhadas que, certamente, foram responsáveis pela construção do meu caráter e para me tornar quem eu sou. Amo demais vocês e me faltam palavras pra demonstrar a minha eterna gratidão.

Ao meu namorado, companheiro e amigo de vida e de profissão, Dr. André Borges Veloso, por estar ao meu lado sempre, sendo a companhia mais agradável que eu poderia ter. Ajudando-me diretamente na execução deste trabalho e até mesmo no apoio psicológico e conselhos profissionais e de vida ao longo deste caminho. Tenho certeza que ainda trilharemos muitos caminhos juntos. Te amo!

As minhas orientadoras, Dra. Helena L. C. Santos e Dra. Claudia M. d'Avila Levy, por me proporcionarem a oportunidade de realizar este doutorado e pelos ensinamentos durante esses quatro anos.

A professora de filogenia e colega de profissão, Dra. Silvia Justi, que algumas vezes interrompeu suas atividades e trabalhos pra me ajudar via Skype em dúvidas relacionadas à execução deste trabalho. Muito obrigada de coração!

A equipe do laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia pelo suporte dado, em especial ao Dr. Vitor Ennes-Vidal, com toda sua paciência para ouvir sobre as minhas angústias e dificuldades enfrentadas ao longo deste trabalho. Ao amigo, Rhagner Bonono, pelos momentos de descontração, tornando o nosso dia-a-dia, certamente, muito mais divertido. As alunas Amanda Caetano, Bianca Vitorio, Carolina Boucinha, Caroline Celestino e Keyla Gonçalves pelo apoio mútuo para seguirmos sem esmorecer nesta trajetória.

Aos meus amigos, principalmente os adquiridos ao longo destes anos na Fiocruz, desde a iniciação científica até o doutorado, por tornarem tudo mais prazeroso e divertido.

Aos companheiros de luta, também membros do Comitê Fiocruz em Defesa da Democracia, em especial aos amigos Flávia Divino, Luciana Milagres e André Malhão e Geandro Ferreira, por me proporcionarem a oportunidade de participar de discussões riquíssimas sobre posicionamentos políticos, tão importantes de serem discutidos considerando a atual conjuntura política do nosso país, despertando em mim o incessante desejo de mudança. “Deixe o mundo mudar você e você poderá mudar o mundo.” – Che Guevara.

Ao meu acupunturista e amigo, Evaldo, por sempre resgatar um pouco da minha sanidade mental e me fazer enxergar com mais clareza as dificuldades enfrentadas, me encorajando a encará-las sem jamais esmorecer. Muito obrigada mesmo!

Aos professores das diversas disciplinas cursadas da pós-graduação da Biologia Celular e Molecular e outros, por partilharem seus conhecimentos e informações para o enriquecimento da minha formação.

Aos nossos colaboradores, Dr. Bernardo Teixeira, Dra. Rosana Gentili e Me. Sócrates Neto do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres (IOC/Fiocruz), ao Dr. Daniel de Almeida Balthazar do Zoológico do Rio de Janeiro e ao Fábio Alves da Silva do Instituto Científico e Tecnológico em Biomodelos (Fiocruz) pelo fornecimento de amostras, além da contribuição científica nas respectivas áreas de conhecimento pra a execução deste trabalho. A Dra. Magali Muniz Barreto do laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (IOC/Fiocruz) por também ajudar nas coletas de amostras de humanos na região de Sumidouro. A outros colaboradores extraoficiais, Cláudia Moraes, Renata Biot, Sr. Nilson e Marcelo por ajudarem nas coletas de amostras de animais para o estudo. A colega de profissão, Rosemary de Jesus Batista por auxiliar em ambas as coletas das populações humanas.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, à Plataforma de sequenciamento de DNA (Sanger), à Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, e às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio imprescindível para execução deste trabalho.

E, por fim, aos meus dois grandes amores caninos, Toby e Conca, por estarem sempre ao meu lado, tornando a minha vida mais agradável e amável.

“A ciência pode nos ensinar, e eu acho que nossos próprios corações podem nos ensinar, a não mais a olhar ao redor em busca de apoio imaginário, não mais inventar aliados no céu, mas, ao invés, olhar para os nossos próprios esforços aqui embaixo para fazer desse mundo um lugar adequado para se viver...”

(Bertrand Russel)

ÍNDICE

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1-30
1.1 Aspectos gerais.....	1
1.2 Histórico e Taxonomia.....	3
1.3 Subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. e seus hospedeiros.....	5
1.4 Especificidade de hospedeiro e transmissão zoonótica.....	10
1.5 Patogenicidade.....	11
1.6 Manifestações clínicas.....	15
1.7 Morfologia.....	17
1.8 Ciclo Biológico.....	21
1.9 Diagnóstico laboratorial.....	23
1.10 Marcadores moleculares para <i>Blastocystis</i> sp.....	25
1.11 Tratamento.....	29
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
4. METODOLOGIA	33-44
4.1 Coleta de amostras.....	33
4.1.1 Fezes de humanos	33
4.1.2 Fezes de animais.....	34
4.2 Procedimentos laboratoriais.....	39
4.2.1 Preparo das amostras fecais e análise através do microscópio ótico.....	39
4.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> das amostras fecais.....	39
4.2.3 Caracterização molecular dos isolados.....	40
5. RESULTADOS	44-56
5.1 Cultivo de fezes.....	45
5.2 Identificação dos subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. através da PCR/Sequenciamento empregando o alvo SSU-RNAr.....	46
5.2.1. Identificação dos subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. através da PCR/Sequenciamento dos isolados de hospedeiros humanos.....	46
5.2.1.1 População humana do CAPS de Duque de Caxias.....	47
5.2.1.2 População humana da região rural de Sumidouro..	49
5.2.2 Identificação dos subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. através da PCR/Sequenciamento dos isolados de hospedeiros animais.....	51
5.3 Variabilidade genética intra e inter subtipos do alvo SSU- RNAr de <i>Blastocystis</i> sp.....	54
5.4 Demais alvos moleculares.....	70

5.4.1 SSU-RNAr.....	70
5.4.2 MLO-DNAr.....	70
5.4.3 ITS1-2	72
6. DISCUSSÃO.....	75-91
6.1 SSU-RNAr.....	75
6.2 Demais alvos moleculares.....	89
7. CONCLUSÕES.....	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
9. ANEXOS.....	118
9.1 Sequências do Genbank utilizadas no estudo	
9.2 Artigo de revisão publicado “ <i>Blastocystis</i> spp.: Current Status and Research Issues”	
9.3 Artigo de pesquisa publicado “Distribution of <i>Blastocystis</i> subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil”	
9.4 Artigo de pesquisa publicado “Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of <i>Blastocystis</i> subtypes”	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resumo gráfico sobre a distribuição dos subtipos de <i>Blastocystis</i> , seus hospedeiros e formas de transmissão.....	7
Figura 2: As formas evolutivas de <i>Blastocystis</i> sp.....	20
Figura 3: Ciclo biológico de <i>Blastocystis</i> sp.....	22
Figura 4: Mapa do estado do Rio de Janeiro com os pontos de coleta do presente estudo.....	37
Figura 5: Coleta de material fecal de aves.....	38
Figura 6: Arvore filogenética de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (BI) baseada nas sequências parciais do gene SSU-RNAr de <i>Blastocystis</i> sp. de isolados da população humana de Caxias, RJ.....	48
Figura 7: Arvore filogenética de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (BI) baseada nas sequências parciais do gene SSU-RNAr de <i>Blastocystis</i> sp. de isolados da população humana de Sumidouro, RJ.....	50
Figura 8: Arvore filogenética de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (BI) baseada nas sequências parciais do gene SSU-RNAr de <i>Blastocystis</i> sp. de isolados de animais de RJ.....	52
Figura 9: Gráfico de distância genética par-a-par do ST1.....	56
Figura 10: Gráfico de distância genética par-a-par do ST2.....	57
Figura 11: Gráfico de distância genética par-a-par do ST3.....	58
Figura 12: Gráfico de distância genética par-a-par do ST4.....	59
Figura 13: Gráfico de distância genética par-a-par do ST5.....	60
Figura 14: Gráfico de distância genética par-a-par do ST6.....	61
Figura 15: Gráfico de distância genética par-a-par do ST7.....	62
Figura 16: Gráfico de distância genética par-a-par do ST8.....	63
Figura 17: Gráfico de distância genética par-a-par do ST9.....	64
Figura 18: Gráfico de distância genética par-a-par da amostra 210.....	65
Figura 19: Gráfico de distância genética par-a-par entre as 17 cópias do gene SSU-RNAr de <i>Blastocystis</i> sp.....	66
Figura 20: Gráfico de distância genética par-a-par entre as 17 cópias do gene SSU-RNAr de <i>Blastocystis</i> sp. utilizando o fragmento descrito por Scicluna et al., (2006).....	67
Figura 21: Gráfico de distância genética par-a-par entre as 17 cópias do gene SSU-RNAr de <i>Blastocystis</i> sp. utilizando o fragmento descrito por Parkar et al., (2010).....	68
Figura 22: Gráfico de distância genética par-a-par entre as 17 cópias do gene SSU-RNAr de <i>Blastocystis</i> sp. utilizando o fragmento descrito por Santin et al., (2011).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. encontrados em diferentes hospedeiros.....	9
Tabela 2: Alvos moleculares utilizados para a identificação e filogenia de <i>Blastocystis</i> sp. e suas características.....	28
Tabela 3: Os diferentes alvos moleculares utilizados no estudo, as respectivas sequências de ambos os iniciadores (oligonucleotídeo direto e reverso), a temperatura de <i>melting</i> e o tamanho do fragmento amplificado.....	41
Tabela 4: Conjunto de iniciadores utilizados no estudo, as respectivas sequências dos iniciadores (oligonucleotídeo direto e reverso), a temperatura de <i>melting</i> , o tamanho, do fragmento amplificado e a correspondência dos STs.....	42
Tabela 5: Sequências obtidas no Genbank utilizadas como referência para construção dos gráficos de distância genética par-a-par.....	43
Tabela 6: Resultado da pesquisa de <i>Blastocystis</i> sp. por cultivo de amostras fecais de humanos.....	45
Tabela 7: Resultado da pesquisa de <i>Blastocystis</i> sp. por cultivo de amostras fecais de animais.....	46
Tabela 8: Resultado da PCR/sequenciamento com o alvo SSU-RNAr das populações humanas e de animal estudadas.....	46
Tabela 9: Subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. identificados em ambas as populações humanas estudadas.....	48
Tabela 10: Subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. identificados em animais.....	53
Tabela 11: Número de amostras selecionadas previamente identificadas pelo SSU-RNAr para a amplificação dos alvos MLO-DNAr e ITS1-2.....	70
Tabela 12: Resultados concordantes entre as sequências identificadas a partir do SSU-RNAr e MLO-DNAr.....	71
Tabela 13: Resultados discordantes entre as sequências identificadas com os alvos SSU-RNAr e MLO-DNAr.....	72
Tabela 14: Resultados discordantes entre as sequências identificadas com os alvos SSU-RNAr e ITS1-2.....	73
Tabela 15: Resultados concordantes entre as sequências identificadas com os alvos SSU-RNAr e ITS1-2.....	73
Tabela 16: Resultados dos isolados que não amplificaram e não foram obtidas sequências de boa qualidade com o alvo SSU-RNAr, mas foram identificadas com os alvos MLO-DNAr e ITS1-2.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIC: critério de informação de Akaike

BLAST: ferramenta básica de localização de alinhamento local

BSA: albumina sérica bovina

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CFMA: Campus Fiocruz Mata Atlântica

CHO: *Chinese Hamster Ovary*

DNA: ácido desoxirribonucleico

ETS: espaçador externo transcrito

EUA: Estados Unidos da América

IB: inferência Bayesiana

ICTB: Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

ITS1-2: espaçador interno transcrito 1 e 2

MLO-DNAr: subunidade menor do RNA ribossômico da mitocôndria-*like*

MV: máxima verossimilhança

NIT: município de Nitérois

OMS: Organização Mundial da Saúde

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polymerase

PEPB: Parque Estadual da Pedra Branca

PEST: Parque Estadual da Serra da Tiririca

PNH: primata não-humano

RNA_t: ácido ribonucleico transportador

SG: município de São Gonçalo

SII: síndrome do intestino irritável

SPS: cidade de São Pedro da Serra

SSU-RNAr: subunidade menor do RNA ribossômico

ST: subtipo

SUMID: município de Sumidouro

UNESCO: Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Cultura

ZooRio: Zoológico da cidade do Rio de Janeiro



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *BLASTOCYSTIS* sp. DE ORIGEM HUMANA E ANIMAL

RESUMO

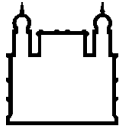
TESE DE DOUTORADO

Carolina Valença Barbosa

Blastocystis sp. é considerado o parasito mais frequentemente encontrado no trato gastrointestinal humano. Elevados percentuais de prevalência são observados nos países em desenvolvimento, atingindo até 100%. Este parasito também tem sido isolado em aves, anfíbios, répteis, insetos e mamíferos. Análises moleculares parciais do gene SSU-RNAr evidenciaram a existência de 17 subtipos, dos quais 10 (ST1-ST9, ST12) são encontrados na população humana e de animais (exceto o ST9). Os demais subtipos são encontrados exclusivamente em animais. Atualmente, poucos estudos sobre a diversidade genética de *Blastocystis* sp. foram realizados no Brasil. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar os isolados de *Blastocystis* sp. de origem humana e de animais e avaliar o desempenho das reações em cadeia da polimerase (PCR) com alvos dirigidos para regiões parciais do gene SSU-RNAr, espaçador transcrito interno 1-2 e para SSU-RNAr da organela mitocôndria-like na identificação dos subtipos de *Blastocystis* sp. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de cultivo *in vitro*, PCR seguido de sequenciamento, PCR subtipo específico, ferramenta BLAST e análise filogenética. Um total de 848 amostras de fezes foram submetidas ao cultivo *in vitro*. Das 309 (194 de humanos e 115 de animais) amostras positivas na cultura, somente 241 foram amplificadas e sequenciadas por meio da PCR/sequenciamento para o alvo SSU-RNAr. Destas, 191 (139 humanos e 52 animais) sequências foram identificadas como os seguintes subtipos: ST1, ST2, ST4, ST5 e ST8 por meio da pesquisa pela ferramenta BLAST e pela análise filogenética. O ST de um isolado não foi identificado nas análises. Entre as demais sequências, 22 apresentaram picos sobrepostos no eletroferograma e 27 apresentaram uma baixa resolução. Para a análise comparativa entre os alvos foram utilizadas 61 amostras previamente identificadas pelo alvo SSU-RNAr. Destas, foram obtidas 59 sequências para o alvo MLO-DNAr, das quais identificamos os ST1-5, ST7, ST8 e 27 para o alvo ITS1-2. Quando comparamos os resultados obtidos com os alvos SSU-RNAr e MLO-DNAr observamos que 17 isolados apresentaram resultados discordantes quanto à identificação dos STs. Além disso, 16 isolados foram caracterizados somente pelo MLO-DNAr, em decorrência da falta de êxito da PCR ou pela baixa resolução das sequências. Em relação ao alvo ITS1-2 não foi possível comparar os resultados, tendo em vista que existem apenas as sequências dos ST1-ST3 e ST7 depositadas no banco público de DNA. As sequências obtidas para este alvo servirão apenas para aumentar o banco dados. Os resultados obtidos neste estudo revelaram a ocorrência de uma grande diversidade de subtipos de *Blastocystis* sp. na amostragem estudada, tanto em hospedeiros humanos quanto em animais. Quanto ao ST não identificado, recomenda-se o sequenciamento total do gene SSU-RNAr para confirmar a existência de um novo ST. O ST4 foi

identificado pela primeira vez na população brasileira, bem como a identificação de STs em diferentes hospedeiros animais na amostragem analisada. Em relação a análise de variabilidade genética dos STs, foi possível observar que os ST1 e ST3 apresentaram a maior distância genética intra-subtipos, compreendendo 8% e quase 10%, respectivamente seguidos pelo ST2 com proximamente 5%. Os demais subtipos (ST4-ST9), a divergência genética foi inferior a 5%. Ao analisar as 17 cópias do gene 18S de um isolado do ST7 comparando as diferentes regiões que são utilizadas na literatura, verificamos que a variabilidade genética varia de 1 a 3,5%. Desta forma, este estudo contribui para compreensão da epidemiologia molecular e para a diversidade genética de *Blastocystis* sp. em escala regional e global.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular, diversidade genética, hospedeiros, PCR



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *BLASTOCYSTIS* ISOLATES FROM HUMANS AND ANIMALS

ABSTRACT

DOCTORAL DEGREE

Carolina Valença Barbosa

Blastocystis sp. is considered the most frequently found parasite in the human gastrointestinal tract. High prevalence percentages are observed in developing countries, reaching 100%. This parasite has also been isolated from birds, amphibians, reptiles, insects and mammals. Molecular analyzes of the partial SSU-RNAr gene evidenced the existence of 17 subtypes, of which 10 (ST1-ST9, ST12) are found in the human and animal population (except ST9). The other subtypes are found exclusively in animals. Currently, few studies on the genetic diversity of *Blastocystis* sp. were carried out in Brazil. Thus, the present study aims to characterize the *Blastocystis* sp. isolates from humans and animals and to evaluate the performance of polymerase chain reactions (PCR) with targets directed to partial regions of SSU-RNAr, internal transcript spacer 1-2 and to mitochondrial-like organelle rRNA in the identification of subtypes of *Blastocystis* sp. To do so, techniques of *in vitro* culture, PCR followed by sequencing, specific subtype PCR, BLAST tool and phylogenetic analysis were used. A total of 848 stool samples were submitted to *in vitro* culture. Of the 309 (194 of humans and 115 of animals) positive samples in the culture, only 241 were amplified and sequenced by means of the PCR/sequencing for the SSU-RNAr target. Of these, 191 (139 human and 52 animal) sequences were subtyped as follows: ST1, ST2, ST4, ST5 and ST8 through BLAST research and phylogenetic analysis. The ST of one isolate was not identified in the analyzes. Among the other sequences, 22 presented overlapping peaks on the electropherogram and 27 presented a low resolution. For the comparative analysis between the targets, 61 samples previously identified by the SSU-RNAr target were used. From these, 59 sequences were obtained for the MLO-DNAr target, from which we identified ST1-5, ST7, ST8 and 27 for the ITS1-2 target. When we compared the results obtained with SSU-RNAr and MLO-DNAr targets, we observed that 17 isolates presented discordant results regarding the identification of STs. In addition, 16 isolates were characterized only by MLO-DNAr, due to either the lack of success of PCR, or the low resolution of the sequences. In relation to the ITS1-2 target it was not possible to compare the results, considering that there are only the ST1-ST3 and ST7 sequences deposited in the public DNA bank. The sequences obtained for this target will only serve to feed the database. The results obtained in this study reveal the occurrence of a great diversity of subtypes of *Blastocystis* sp. in the studied sample, in both human and animal hosts. As for unidentified ST, the complete sequencing of the SSU-RNAr gene is recommended to confirm the existence of a new ST. ST4 was identified for the first time in the Brazilian population, as well as the identification of ST in different animal hosts in the analyzed sample. In relation to the genetic variability analysis of STs, it was possible

to observe that ST1 and ST3 had the highest intra-subtype genetic distance, comprising 8% and almost 10%, respectively followed by ST2 with approximately 5%. The other subtypes (ST4-ST9), the genetic divergence was less than 5%. By analyzing the 17 copies of the SSU-RNAr gene from an ST7 isolate comparing the different regions that are used in the literature, we found that the genetic variability varies from 1 to 3.5%. Therefore, this study contributes to the understanding of molecular epidemiology and the genetic diversity of *Blastocystis* sp. on a regional and global scale.

Keywords: Molecular epidemiology, genetic diversity, hosts, PCR

I. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

Blastocystis sp. é um organismo unicelular, eucarioto, anaeróbico, pertencente ao grupo dos Stramenopiles, que abrange representantes bem diversificados, incluindo flagelados de vida livre, parasitos de plantas (*Peronospora*), alguns fungos e crisófitas (Silberman et al., 1996) e diversos organismos fotossintéticos, desde diatomáceas a algas pardas (Derelle et al., 2016). É considerado um dos parasitos mais frequentemente encontrado no trato gastrointestinal de humanos (Stenzel & Boreham, 1996; Amin, 2002; Cheng et al., 2006; Tan, 2008; Borges et al., 2009; Stensvold et al., 2009a; Gil et al., 2013; El Safadi et al., 2014; David et al., 2015; Osman et al., 2016).

Além disso, tem sido encontrado em uma ampla variedade de animais, como répteis, insetos, aves, anfíbios e mamíferos (Abe et al., 2002, 2003, 2004; Tan, 2004; Noel et al., 2005; Stensvold et al., 2009b; Parkar et al., 2007, 2010; Santin et al., 2011; Ramirez et al., 2014; Clark et al., 2013; Roberts et al., 2013; Alfellani et al., 2013a; Wang et al., 2014; Yoshikawa et al., 2004a, 2007, 2016a, 2016b; Cian et al., 2017; Masuda et al., 2018; Udonsom et al., 2018). Este parasito é um protista cosmopolita entérico e tem sido estimado que mais de um bilhão de pessoas estejam infectadas (Stensvold et al., 2007), embora as taxas de prevalência variem entre países e até mesmo entre regiões de um mesmo país (Tan, 2008; Alfellani et al., 2013b).

No cenário mundial, apresenta percentuais extremamente variáveis ultrapassando as taxas de prevalência de outros parasitos intestinais, tais como a *Giardia intestinalis*, o complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* e o *Cryptosporidium* sp. (Boorom et al., 2008; Borges et al., 2009; Gil et al., 2013; Osman et al., 2016). Nos países industrializados, os percentuais de prevalência variam de 6% na Hungria a 24% na Holanda (Bart et al., 2013; Bálint et al., 2014; El Safadi et al., 2016; Scanlan et al., 2016) e nos países em desenvolvimento atingem até 100%, como reportado no Senegal (El Safadi et al., 2014). No Brasil, a prevalência em humanos varia entre 2,2% e 86,6% (Guimarães & Sogayar et al., 1993; Gil et al., 2003; Nascimento & Moitinho, 2005; Miné & Rosa, 2008; Aguiar et al., 2007; Borges et al., 2009; Takiazawa et al., 2009; Malheiros et al., 2011; Branco et al., 2012; Cabrine-Santos et al., 2015; David et al., 2015; Rebolla et al., 2016; Faria et al., 2017; Melo et al., 2017; Oliveira-Arbex 2018). Esses altos percentuais estão diretamente relacionados ao baixo nível socioeconômico e às precárias

condições sanitárias (Li et al., 2007; Leelayoova et al., 2008; Lee et al., 2012), predominantes em regiões tropicais empobrecidas, desprovidas principalmente de água potável e redes de esgoto (Noradilah et al., 2016; Osman et al., 2016).

O modo de infecção ainda não foi completamente compreendido, mas é amplamente citado e aceito na literatura que a transmissão envolve a ingestão das formas císticas presentes em água e nos alimentos, sendo, portanto, transmitido pela via orofecal (Parkar et al., 2010; Lee et al., 2012; Angelici et al., 2018). Desta forma, os cuidados no preparo dos alimentos e a carência de hábitos de higiene pessoal e coletiva podem favorecer a transmissão deste parasito (Li et al., 2007; Leelayoova et al., 2008; Alfellani et al., 2013b; Heydari-Hengami et al., 2018). Em 2011, *Blastocystis* sp. foi incluído nas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) no programa sobre o consumo e a qualidade de água potável (OMS, 2011), uma vez que este parasito é frequentemente isolado de fontes de água em diversos países (GuoHong et al., 2000; Karanis et al., 2007; Leelayoova et al., 2008; Eroglu & Koltas, 2010; Rafiei et al., 2014; Rangel-Martínez et al., 2015).

Embora existam vários estudos sobre os aspectos epidemiológicos de *Blastocystis* sp. desde que foi detectado pela primeira vez no ano de 1912 em amostras de fezes humanas, sua taxonomia e patogenicidade ainda são controversas. Alguns estudos apontam que a infecção por *Blastocystis* sp. é mais comum em pacientes imunossuprimidos, sendo considerado um parasito oportunista (Tan et al., 2009; Batista et al., 2011). Outros trabalhos sugeriram que *Blastocystis* sp. é um organismo comensal (Udkow & Markell, 1993; Sun et al., 1989; Audebert et al., 2016). No entanto, um número crescente de novos estudos citou *Blastocystis* sp. como um patógeno emergente (Tan, 2008; Scanlan, 2012; Poirier et al., 2012).

Este parasito já foi identificado em amostras de fezes de indivíduos com diarreia ou com outros sintomas gastrointestinais, além de ter sido associado a doenças entéricas, especialmente à síndrome do intestino irritável (SII) (Tan, 2008; Dogruman-Al et al., 2010; Stensvold et al., 2011; Rostami et al., 2017). Em contrapartida, diversos estudos apontaram a ausência de associação entre o parasito e a doença clínica, principalmente pelo fato da infecção humana ser comumente assintomática (Udkow & Markell, 1993; Chen et al., 2003; Leder et al., 2005; Khademvatan et al., 2017).

No decorrer da última década, os Estados Unidos da América (EUA) têm anualmente investido 30 bilhões de dólares em estudos sobre a SII (Hulisz, 2004). Esta síndrome é altamente prevalente nos países em desenvolvimento, com percentuais

variando de 35% a 45% (Schmulson et al., 2006; Quigley et al., 2006) e 5% a 24% em países industrializados (Longstreth et al., 2006). Em indivíduos portadores da SII observam-se elevados percentuais de infecção por *Blastocystis* sp. com frequências de até 76% (Giacometti et al., 1999; Stensvold et al., 2009a; Boorom et al., 2008; Dogruman-Al et al. 2010; Yakoob et al., 2010). Contudo, os possíveis fatores que estariam envolvidos para causar a doença ainda são incertos.

Assim, surgem alguns questionamentos, como, por exemplo, o impacto de *Blastocystis* sp. na saúde, principalmente devido às altas prevalências deste parasito na população humana. Dados recentes sobre o genoma deste organismo, atrelados a estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* permitiram a identificação de fatores de virulência, demonstrando os efeitos nocivos de *Blastocystis* sp. na barreira intestinal (Poirier et al., 2012; Denoeud et al., 2011; Wu et al., 2014a,b; Ajjampur et al., 2016; Ajjampur & Tan, 2016). Por outro lado, alguns autores acreditam que estudos sobre a microbiota intestinal em indivíduos infectados e não infectados por *Blastocystis* sp. podem fornecer informações importantes para ajudar a determinar o papel deste parasito na saúde humana e na doença (Stensvold & Clark, 2016).

Embora tenha sido descoberto há mais cem anos, *Blastocystis* sp. é um parasito enigmático e foi considerado por muito tempo como comensal, o que atrasou bastante os avanços nos estudos, não despertando o interesse dos pesquisadores até então. Recentemente, diversos trabalhos apontaram indícios sobre o seu potencial patogênico. Todavia, ainda persistem muitas dúvidas acerca do seu potencial zoonótico, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, os aspectos taxonômicos e o seu real papel como patógeno. Sendo assim, estudos adicionais sobre esse parasito são de suma importância com o intuito de agregar o máximo de informação a respeito da biologia deste parasito.

1.2. Histórico e Taxonomia

Há muitas dúvidas sobre a posição taxonômica de *Blastocystis* sp. Em 1911, o parasito foi descrito por Alexieff, que propôs o nome de *Blastocystis enterocola* (Alexieff, 1911). Posteriormente, em 1912, o parasito foi redescrito por Emile Brumpt como levedura presente em fezes humanas, sendo denominado por *Blastocystis hominis*

(Brumpt, 1912). O termo *Blastocystis* foi criado por Alexieff devido às formas observadas serem semelhantes à cápsula de um fungo do gênero *Blastomyces*, além de apresentarem uma forma cística.

No entanto, apenas a título de curiosidade, este parasito já havia sido observado por Brittan & Swayne em 1849 durante a grave epidemia de cólera na Inglaterra. Ambos os pesquisadores trabalharam separadamente, mas compartilharam seus achados. As células chamadas de “corpos de cólera” por Swayne e “células anulares” por Brittan foram consideradas por eles como as causadoras da cólera, convencendo outros médicos de Londres que também estudavam a epidemia. Entretanto, a análise crítica de suas obras não suporta a afirmação de que eles descobriram *Blastocystis* sp. (Zierdt, 1991).

Desde então, *Blastocystis* sp. já foi considerado vegetal, levedura, cisto de flagelado, esporozoário e protozoário (Zierdt, 1991; Boreham & Stenzel, 1993). Em 1967, foram descritas características baseadas em aspectos morfológicos e fisiológicos gerando dúvidas em relação a sua classificação como levedura, reclassificando-o, portanto, como protozoário (Zierdt, 1967). Em 1985, *Blastocystis* sp. foi inserido no reino Protista, subreino Protozoa, subordem Blastocytina e no gênero *Blastocystis*, com base nos parâmetros taxonômicos morfológicos tradicionais (Zierdt, 1991).

Recentemente, estudos filogenéticos baseados na análise do gene SSU-RNAr alocaram *Blastocystis* sp. ao grupo heterogêneo dos Stramenopiles, sinônimo de Heterokonta (Silberman et al., 1996), um dos maiores grupos de eucariotos existente (Adl et al., 2012). Este grupo foi descrito em 1989 (Patterson, 1989) sendo composto por seres unicelulares e multicelulares com metabolismo heterotrófico ou fotossintético. Seus representantes apresentam como característica a presença de, pelo menos, um flagelo ao longo dos estágios do ciclo de vida. Entretanto, *Blastocystis* sp. não apresenta flagelo e é o único eucarioto do grupo capaz de infectar humanos (Arisue et al., 2002).

Na classificação atual, *Blastocystis* sp. está inserido no Reino Protista, Filo Stramenopiles, classe Blastocystea, ordem Blastocystida, família Blastocystidae, gênero *Blastocystis*, estando relacionado aos Alveolatas (Silberman et al., 1996; Arisue et al., 2002). Antigamente, a nomenclatura de *Blastocystis* sp. era baseada no hospedeiro de isolamento, dando origem a uma ampla variedade de espécies, tais como *B. hominis* quando isolado de humanos, *B. ratti* de roedores, *B. galli* de galinha, entre outros. Todavia, pesquisas recentes sugerem limitar sua denominação para *Blastocystis* sp., devido a sua grande diversidade molecular que é suficiente para nomear diferentes espécies (Stensvold et al., 2007).

1.3. Subtipos de *Blastocystis* e seus hospedeiros

Existe um consenso na literatura sobre a nomeação de *Blastocystis* sp., sendo nomeado por muitos anos como *Blastocystis hominis* quando encontrado em fezes humanas. No entanto, estudos sobre a caracterização molecular deste parasito mostraram que os isolados de humanos apresentavam grande variabilidade genética e os isolados de outros hospedeiros eram indistinguíveis morfológicamente dos isolados de humanos (Böhm-Gloning et al., 1997; Clark, 1997). Assim, o hospedeiro de origem não era um indicador confiável para a identificação deste organismo, sendo proposto resumir o nome para *Blastocystis* sp. com diferentes linhagens classificadas em subtipos (Stensvold et al., 2007; Parija & Jeremiah, 2013).

Atualmente, são descritos 17 subtipos, dos quais nove (ST1-ST9) são encontrados na população humana e também em animais (Duda et al., 1998; Abe et al., 2002; 2003; Abe, 2004; Yoshikawa et al., 2004a, 2004b; 2007; 2009; 2016 ; Noel et al., 2005; Tan, 2004; Navarro et al., 2008; Stensvold et al., 2009b; Parkar et al., 2010; Petrasova et al., 2011; Santin et al., 2011; Roberts et al., 2013; Alfellani et al., 2013a; Fayer et al., 2014; Ramirez et al., 2014; Wang et al., 2014; Badparva et al., 2015; Popruk et al., 2015; Helenbrook et al., 2015; Belleza et al., 2016; Villanueva-Garvia et al., 2017; Cian et al., 2017; Song et al., 2017; Zhao et al., 2017). Os demais subtipos (ST10 a ST17) são encontrados exclusivamente em hospedeiros não humanos (Stensvold et al., 2009b; Parkar et al., 2010; Fayer et al., 2012; Alfellani et al., 2013; Roberts et al., 2013), exceto ST12, recentemente descrito em três indivíduos na Bolívia (Ramirez et al., 2016). Além disso, é importante destacar que em 2017, Zhao e colaboradores descreveram possíveis novos subtipos denominando-os de ST18-ST22.

Em humanos, ST1, ST2 e ST3 apresentam altas prevalências (Scicluna et al., 2006; Yan et al., 2006; Li et al., 2007; Ozyurt et al., 2008; Rene et al., 2009; Malheiros et al., 2011; Alfellani et al., 2013; Popruk et al., 2015; Vargas-Sanches et al., 2015), sendo o ST3 o mais prevalente (Alfellani et al., 2013a; Souppart et al., 2010; Moosavi et al., 2012; Roberts et al., 2013; Jantermtor et al., 2013; Casero et al. 2015; Palasuwan et al., 2016; Scanlan et al., 2016; Ben Abda et al., 2017). O subtipo 4 é comumente encontrado na Europa, porém parece ser raro ou completamente ausente na África, Ásia e Américas (Alfellani et al., 2013a). Estima-se que 95% das infecções humanas sejam causadas pelos subtipos 1-4 (Noel et al., 2005; Scicluna et al., 2006, Parkar et al., 2007, Alfellani et al.,

2013). Já ST5-ST8 são observados esporadicamente na população humana, sendo mais comumente encontrados em outros hospedeiros.

O subtipo 9 foi relatado somente uma vez em humanos (Stensvold et al., 2009a) e, até então, não foi encontrado em outros hospedeiros (Noel et al., 2005; Alfellani et al., 2013; Clark et al., 2013; Ramirez et al., 2014; Wang et al., 2014; Fayer et al., 2014; Casero et al., 2015; Poulsen et al., 2016). Até o momento, ST10 a ST17 não foram encontrados na população humana (Parkar et al., 2010; Forsell et al., 2012), com exceção de ST12 (Ramirez et al., 2016). Inicialmente, ST12 foi detectado em girafas e cangurus (Parkar et al., 2010; Roberts et al., 2013), sendo posteriormente relatado por Ramirez e colaboradores (2016) em humanos, sugerindo um possível potencial zoonótico de transmissão. É importante ressaltar que os três indivíduos infectados por ST12 tinham contato próximo com ovelhas e lhamas, sugerindo a necessidade de realizar mais estudos investigando esses mamíferos.

No Brasil, existem apenas cinco trabalhos sobre a distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. e todos eles referentes ao hospedeiro humano. O primeiro relato investigou uma comunidade indígena na Amazônia, na qual os autores observaram a ocorrência de três subtipos de *Blastocystis* sp. (Malheiros et al., 2011). Em 2015, David e colaboradores realizaram um estudo em duas comunidades de baixo poder aquisitivo em São Paulo e detectaram cinco diferentes subtipos. Em um trabalho realizado em seis países da América do Sul, os autores encontraram grande diversidade de subtipos de *Blastocystis* sp. nas amostras brasileiras (Ramirez et al., 2016). Em 2017, Melo e colaboradores analisaram amostras fecais obtidas em um laboratório de análises clínicas na cidade de São Paulo e identificaram a ocorrência de quatro subtipos. Recentemente, também na cidade de São Paulo, os autores investigaram crianças de uma creche, seus familiares e cães, além dos funcionários da mesma e detectaram quatro subtipos de *Blastocystis* sp. Todavia, nenhum cão estava infectado pelo parasito em questão (Oliveira-Arbex et al., 2018).

Assim, enquanto os estudos sobre a distribuição dos subtipos e os dados sobre a prevalência de *Blastocystis* sp. em humanos estão se acumulando rapidamente ao redor do mundo, ainda se sabe relativamente pouco sobre a especificidade de hospedeiro, a variabilidade genética e a distribuição de STs em outros hospedeiros.

No cenário mundial, este parasito já foi encontrado em uma ampla variedade de animais, incluindo suínos, bovinos, equinos, primatas não humanos, aves, anfíbios, répteis, peixes, artrópodes, anelídeos (Stenzel & Boreham, 1996; Tan, 2004, Abe, 2004;

Stensvold et al., 2007; 2009b; Wong et al., 2008; Parkar et al., 2010; Santin et al., 2011; Alfellani et al., 2013; Yoshikawa et al. 2016; Villanueva-Garcia et al., 2017; Cian et al., 2017) e, recentemente, em ostras no México (Compean et al., 2018), evidenciando a plasticidade de hospedeiro deste microorganismo. Os subtipos que circulam tanto em humanos quanto em animais denotam baixa especificidade de hospedeiros, o que pode viabilizar a rota de transmissão do parasito entre animais e os humanos e vice-versa (Parkar et al., 2010) (Figura 1).

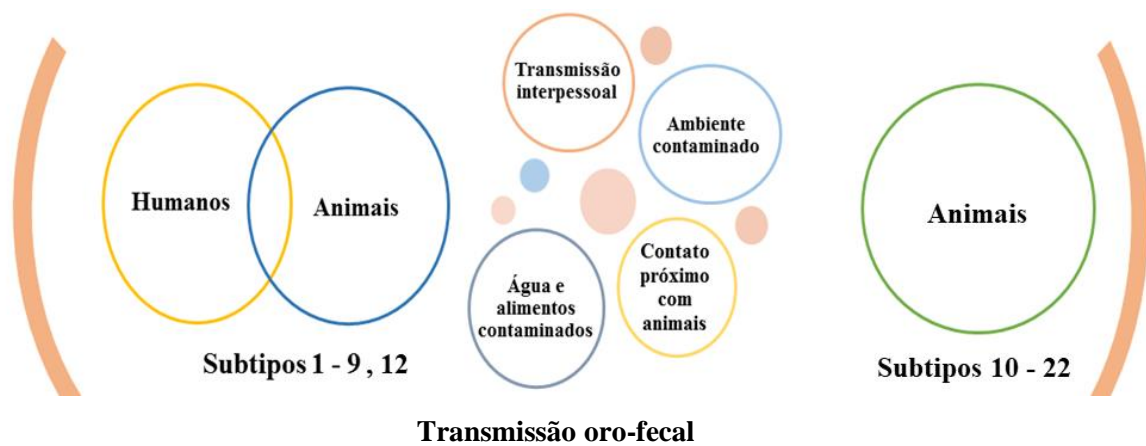


Figura 1: Resumo gráfico sobre a distribuição dos subtipos de *Blastocystis*, seus hospedeiros e formas de transmissão

*Os subtipos 1-9, 12 foram encontrados tanto em humanos quanto em hospedeiros animais, com exceção do ST9 que, até o momento, foi encontrado somente em humanos. Os subtipos 10 - 22 foram detectados em diversos hospedeiros animais, com exceção do ST12, recentemente detectado em humanos. A transmissão da infecção por *Blastocystis* sp. é via oro-fecal, podendo ocorrer através de transmissão interpessoal, água, alimentos e ambiente contaminados por cistos e contato próximo com animais.

Em hospedeiros animais, os subtipos 1, 2 e 3 foram isolados de aves, suínos, caprinos, bovinos e primatas não humanos, enquanto que o subtipo 4 de roedores. Por sua vez, o subtipo 5 é frequentemente descrito em suínos, assim como o 6 e 7 em aves e o subtipo 8 em primatas não humanos (Abe, 2004; Lee & Stenzel, 1999; Stensvold et al., 2009b; Yoshikawa et al., 2009; 2016; Alfellani et al., 2013b; Fayer et al., 2014; Ramirez et al., 2014; Roberts et al., 2013; Santin et al., 2011; Tan et al., 2013; Wang et al., 2014; Villanueva-Garcia et al., 2017). Os subtipos 10 a 17 foram identificados, em sua maioria,

em animais silvestres e de jardins zoológicos (Stensvold et al., 2009b; Parkar et al., 2010; Fayer et al., 2012; Alfellani et al., 2013; Roberts et al., 2013) (Tabela 1). Recentemente na China, foram descritos os ST18-ST22 isolados de cinco diferentes espécies de animais de cativeiro: uma alpaca com ST18, um macaco *Rhesus* com ST19, um avestruz com ST20, um antílope com ST21 e um guanaco com ST22 (Zhao et al., 2017). Assim, é cada vez mais comum observarmos a ocorrência de diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. em vários hospedeiros.

Tabela 1: Lista de subtipos de *Blastocystis* sp. encontrados em diferentes hospedeiros

Subtipos	Hospedeiros	Referências
ST1	Humanos, primatas não humanos, cães, equinos, suínos, felinos e ostras	Alfellani et al., 2013a; Abe et al., 2003; Abe, 2004; Alfellani et al., 2013b; Clark, 1997; Dagci et al., 2014; Malheiros et al., 2011; Mattiucci et al., 2015; Ozyurt et al., 2008; Parkar et al., 2006; Parkar et al., 2010; Ramirez et al., 2014; Rivera, 2008; Roberts et al., 2013; Safadi et al., 2014; Santín et al., 2011; Stevensvold et al., 2009; Stensvold et al., 2010; Whipps et al., 2010; Yoshikawa et al., 2009; Zanzani et al., 2015; Cian et al. 2017; Cian et al. 2017; Melo et al. 2017; Zhao et al 2017; Compean et al., 2018.
ST2	Humanos, primatas não humanos, aves, cães, roedores, suínos, felinos, insetos	Alfelani et al., 2013a; Abe, 2004; Alfellani et al., 2013b; Clark, 1997; Dagci et al., 2014; Malheiros et al., 2011; Mattiucci et al., 2015; Ozyurt et al., 2008; Parkar et al., 2010; Ramirez et al., 2014; Roberts et al., 2013; Safadi et al., 2014; Santín et al., 2011; Stensvold et al., 2009b; Stevensvold et al., 2013; Whipps et al., 2010; Yoshikawa et al., 2009, 2016; Zanzani et al., 2015; Cian et al. 2017; Melo et al. 2017; Zhao et al. 2017
ST3	Humanos, primatas não humanos, suínos, equinos, felinos, bovino, morcego, insetos	Alfellani et al., 2013a; Abe, 2004; Alfellani et al., 2013b; Badparva et al., 2015; Clark, 1997; Dagci et al., 2014; Malheiros et al., 2011; Mattiucci et al., 2015; Parkar et al., 2010; Ramirez et al., 2014; Rivera, 2008; Roberts et al., 2013; Safadi et al., 2014; Santín et al., 2011; Stevensvold et al., 2009 ; Whipps et al., 2010; Cian et al. 2017; Melo et al. 2017; Zhao et al. 2017
ST4	Humanos, primatas não humanos, aves, leões, cervos e cangurus, equinos, roedores	Alfellani et al., 2013a, Abe, 2004; Alfellani et al., 2013b; Clark, 1997; Mattiucci et al., 2015; Noel et al., 2003, 2005; Ozyurt et al., 2008; Parkar et al., 2010; Ramirez et al., 2014; Rivera, 2008; Roberts et al., 2013; Santín et al., 2011; Silberman et al., 1996; Stensold et al., 2009; Whipps et al., 2010; Yoshikawa et al., 1998, 2016; Cian et al. 2017; Zanzani et al., 2015.
ST5	Humanos, primatas não humanos, cães, equinos/bovinos, suínos, anfíbios, ovelhas, aves, roedores	Alfellani et al., 2013a; Badparva et al., 2015; Clark, 1997; Parkar et al., 2006; Rivera, 2008; Roberts et al., 2013; Santín et al., 2011; Stevensvold et al., 2009; Zanzani et al., 2015, Cian et al. 2017; Zhao et al. 2017
ST6	Humanos e aves	Alfellani et al., 2013a; Badparva et al., 2015; Clark, 1997; Dagci et al., 2014; Mattiucci et al., 2015. Parkar et al., 2006; Ramirez et al., 2014; Santín et al., 2011; Melo et al. 2017
ST7	Humanos, primatas não humanos, marsupiais, equinos/bovinos, aves	Clark, 1997; Dagci et al., 2014; Parkar et al., 2007; Rivera, 2008; Santín et al., 2011; Zanzani et al., 2015; Yoshikawa et al. 2016, Cian et al. 2017
ST8	Humanos, primatas, elefantes, marsupiais, aves	Alfellani et al., 2013a; Helenbrook et al., 2015; Mattiucci et al., 2015. Parkar et al., 2010; Ramirez et al., 2014; Stensvold et al., 2009b; Whipps et al., 2010; Cian et al. 2017
ST9 e ST12*	Humanos	Stensvold et al., 2009a; *Ramirez et al., 2016
ST10 a ST22	Equinos/bovinos, elefantes, girafas, marsupiais, leões, cervos, canguru, camelo, alpaca, roedores africanos, primatas não-humanos, roedores, aves, guanaco	Alfellani et al., 2013a; Parkar et al., 2010; Roberts et al., 2013; Stensvold et al., 2009b; Zhao et al. 2017.

1.4. Especificidade de hospedeiros e transmissão zoonótica

Ainda pairam muitas dúvidas acerca da especificidade de hospedeiros deste parasito e a identificação de um perfil generalista ou especialista de um parasito tem implicações epidemiológicas importantes para a compreensão da sua prevalência, fontes de infecção e rotas de transmissão. Os patógenos que interagem com múltiplas espécies de hospedeiros podem ser menos adaptados às condições locais e, conseqüentemente, serem menos específicos. Assim, embora um parasito seja capaz de infectar diferentes espécies de animais, as diferenças nos percentuais de prevalência da infecção podem ser interpretadas como consequência do processo de adaptação local, levando à preferência de certas espécies hospedeiras sobre outras (Westram et al., 2011).

No caso de *Blastocystis* sp., em um trabalho realizado com populações de macacos bugios, *A. palliata* e *A. pigra*, no México, os subtipos 1 e 2 exibiram perfis distintos de especificidade de hospedeiro. ST1 apresentou poucas mutações, sendo considerado generalista, uma vez que vários haplótipos de diferentes animais foram homogeneamente distribuídos nas populações de macacos. ST2 apresentou maior número de mutações entre os primatas, sugerindo ser um conjunto de populações locais (Villanueva-Garcia et al., 2017). Em Katmandu, Nepal, o subtipo 2 foi detectado em crianças e primatas não-humanos (PNH) (*Macaca mulatta*) que viviam na mesma área. Os autores detectaram três subgrupos deste subtipo compartilhados entre as crianças e os animais, sugerindo que os macacos poderiam servir como fonte de infecção para humanos (Yoshikawa et al., 2009) e vice-versa.

Em contraste, um estudo realizado no Parque Nacional da Ilha de Rubondo, na Tanzânia, onde coabitavam duas espécies de primatas autóctones (*Pan troglodytes* e *Colobus guerezae*) e uma de primata introduzido (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*), ST1-ST3 e ST5 foram detectados. No entanto, apenas ST1 foi detectado nas três diferentes populações de primatas e curiosamente, todos os isolados de chimpanzés (*Pan troglodytes*) pertenciam exclusivamente a ST1, formando um clado único na árvore filogenética. Os autores sugeriram que estes chimpanzés foram colonizados por uma única cepa hospedeiro-específica e que a transmissão não ocorreu entre as outras populações de macacos (Petrasova et al., 2011). Porém, é importante salientar que os estudos sobre *Blastocystis* sp. com PNHs em seu habitat natural são escassos.

Tem sido proposto que a transmissão ocorra por meio de contato direto com animais, podendo ocorrer de animais para animais, humanos para humanos e,

possivelmente, de animais para humanos (Clark, 1997; Noel et al., 2005; Tan, 2008; Parkar et al., 2010; Wang et al., 2014) ou indiretamente por meio da contaminação do ambiente, alimentos ou da água com cistos excretados pelos hospedeiros (Leelayoova et al., 2008; Eroglu & Koltas, 2010;). Em jardins zoológicos e santuários, a transmissão entre animais pode ser facilitada, principalmente, devido ao contato próximo entre eles, promovendo a circulação do parasito (Parkar et al., 2010). É importante ainda ressaltar que, posteriormente, o parasito pode ser transmitido para os cuidadores dos zoológicos (Abe et al., 2003).

Blastocystis sp. também tem sido encontrado em animais de cativeiro e em seus respectivos cuidadores. Nestes profissionais, a prevalência da infecção é significativamente maior do que no restante da população em geral (Salim et al., 1999; Stensvold et al., 2009b; Parkar et al., 2010). Na Austrália Ocidental, PNHs e cuidadores do jardim zoológico estavam infectados por ST1 de *Blastocystis* sp., o que sugere que este subtipo possui potencial zoonótico. Considerando que a transmissão da infecção ocorre pela via orofecal, é possível que os cuidadores tenham adquirido a infecção através do contato com água contaminada durante uma das tarefas rotineiramente executadas por eles, como a limpeza das jaulas dos animais (Parkar et al., 2010).

Todavia, alguns autores sugerem que, provavelmente, outras variáveis, como por exemplo, a microbiota intestinal do hospedeiro e os fatores de virulência do parasito, possam ser importantes determinantes para a capacidade de *Blastocystis* sp. em colonizar o trato gastrointestinal (Alfellani et al., 2013a). Além disso, a sobreposição de certos subtipos em diferentes hospedeiros e a alta identidade das sequências de SSU-RNAr dos isolados de humanos e animais evidenciam a transmissão entre os hospedeiros (Parkar et al., 2007; 2010; Rivera, 2008; Stensvold et al., 2009b). Porém, apesar dos inúmeros indícios sobre o potencial zoonótico de *Blastocystis* sp., não existem estudos conclusivos sobre a transmissão zoonótica e especificidade de hospedeiros.

1.5. Patogenicidade

A questão mais debatida a respeito de *Blastocystis* sp., atualmente, é se este microrganismo é patogênico ou comensal, uma vez que alguns indivíduos desenvolvem sintomatologia e outros não (Stensvold et al., 2009a). Infecções causadas por patógenos

são, em muitos casos, assintomáticas, como, por exemplo, nos casos de giardíase e amebíase (Tan, 2008), podendo as infecções por *Blastocystis* sp. se enquadrarem nesses casos. A ação patogênica de *Blastocystis* sp. pode estar relacionada à virulência da cepa, à carga parasitária e à imunodeficiência do indivíduo, embora já tenham sido descritos diversos relatos sobre o seu potencial invasivo em pacientes imunocompetentes (Janarthanan et al., 2011; Scalan et al., 2012; Santos et al., 2014; Fréalle et al., 2015).

Várias tentativas de associação da patogenicidade deste parasito através de estudos com pacientes sintomáticos e assintomáticos têm sido fortemente criticadas. Em sua maioria, esses estudos são realizados a fim de relacionar a presença e ausência de *Blastocystis* sp. com os sintomas. Entretanto, é importante considerar que existe grande dificuldade em excluir todas as outras causas infecciosas. Além disso, as manifestações clínicas das infecções parasitárias são multifatoriais, sendo influenciadas por diversos fatores tanto do hospedeiro quanto do parasito, como por exemplo, a existência de perfis distintos de virulência dos subtipos, a interação com a microbiota intestinal do hospedeiro e estado imunológico do mesmo (Tan, 2008; Mirza & Tan, 2009).

Clark (1997) foi o primeiro a sugerir que diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. possam ter diferentes potenciais patogênicos. Em 2008, foi relatado que o subtipo 4 induzia a apoptose em células epiteliais intestinais de ratos, de um modo independente de contato, aumentando a permeabilidade epitelial (Puthia et al., 2008). Em contrapartida, ST7, provavelmente, utiliza hidrolases para atacar os tecidos do hospedeiro para suprir necessidades nutricionais, além de também ter sido correlacionado a SII (Poirier et al., 2012). Este subtipo expressa cisteíno-peptidases capazes de degradar glicoproteínas do hospedeiro, especialmente àquelas que constituem o muco intestinal. Assim, estas enzimas permitem que *Blastocystis* sp. sobreviva dentro do ambiente intestinal, usando o muco como fonte de carboidratos e proteínas (Sio et al., 2006; Mirza & Tan, 2009).

As peptidases são conhecidas por desempenharem papéis importantes na patogenicidade, no desenvolvimento e na diferenciação de diversos parasitos, como em *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. (Lidell et al., 2006; Rodrigues-Fuentes et al., 2006; Vermelho et al., 2010).

Em relação ao parasito *Blastocystis* sp., estudos de interações *in vitro* com células epiteliais de diferentes linhagens (HT-29 e T-84) demonstraram que *Blastocystis* sp. é capaz de induzir e modular a resposta imune do hospedeiro (Long et al., 2001) e as cisteíno-peptidases estão envolvidas na invasão das células hospedeiras, evasão do

sistema imunológico, patogênese, virulência, podendo, inclusive, degradar a imunoglobulina A (Puthia et al., 2005; Abdel-Hameed et al., 2011).

As cisteíno-peptidases de *Blastocystis* sp. são capazes de ativar a catepsina B, aumentando assim, a permeabilidade das células intestinais e induzindo a apoptose dos enterócitos (Puthia et al., 2008; Mirza et al., 2012; Wawrzyniak et al., 2012; Wu et al., 2014a; Nourrisson et al., 2016). No entanto, embora também tenha sido observado um efeito citopático durante a interação com células epiteliais de linhagem CHO (Walderich et al., 1998), a interação entre *Blastocystis* ST4 isolado de ratos com células epiteliais humanas da linhagem Caco-2 não gerou alterações nos enterócitos (Wu et al., 2014b). Portanto, à medida que forem reunidas mais informações a respeito dos genomas de *Blastocystis* sp., haverá maior oportunidade de identificar possíveis genes envolvidos no potencial patogênico deste parasito.

Em um estudo com indivíduos assintomáticos e sintomáticos, foi demonstrado que ST1 está mais relacionado à patogenicidade (Yan et al., 2006), assim como existem relatos mostrando maior frequência de sintomatologia em pacientes infectados pelo ST2 (Vogelberg et al., 2010), enquanto outros não observaram nenhuma associação (Ozyurt et al., 2008; Mirjalali et al., 2017). Um estudo realizado na Colômbia demonstrou que os indivíduos infectados por ST1 eram assintomáticos, em contraste ao ST2, que só foi identificado em pacientes com diarreia. Já ST3, foi encontrado, exclusivamente, em pacientes com SII (Ramirez et al., 2014), além de ter sido associado ao aumento da propagação de células cancerígenas e de reação inflamatória (Kumarasamy et al., 2013). Todavia, é importante considerar que pode haver cepas patogênicas e não patogênicas deste subtipo (Denoeud et al., 2011).

Assim, embora alguns autores tentem correlacionar a sintomatologia observada com os diferentes subtipos, não há estudos conclusivos provando que um determinado subtipo é mais patogênico do que outro. É provável que a manifestação clínica da doença esteja associada a causas multifatoriais ao longo da infecção, como o potencial patogênico do parasito e o perfil imunológico do hospedeiro. As explicações para a patogenicidade podem ainda incluir diferenças intra-subtipos na atividade de peptidases deste parasito, além de variações na microbiota intestinal do hospedeiro, podendo contribuir para mediar a colonização e virulência de *Blastocystis* sp. (Wu et al., 2014b).

Nos últimos anos, a comunidade científica tem demonstrado maior interesse nos estudos sobre a microbiota intestinal e sua relação com algumas doenças, principalmente com as causadas por parasitos intestinais. Recentemente, a fim de entender esta relação,

Nagel e colaboradores (2016) relataram que a existência de diferenças significativas entre a microbiota intestinal de pacientes com a SII quando comparados ao grupo de indivíduos saudáveis. No entanto, pacientes infectados por *Blastocystis* sp. não apresentaram alterações significativas na microbiota intestinal. Em contrapartida, a maior diversidade bacteriana da microbiota intestinal em pacientes infectados por *Blastocystis* sp. sugeriu que a colonização por este parasito está geralmente associada a uma microbiota intestinal saudável (Audebert et al., 2016). Sabe-se que a microbiota gastrointestinal humana está, em sua maioria, concentrada no cólon, sendo composta por bactérias, poucas archaeas, vírus, fungos e outros eucariotos (Lukes et al., 2015; Rajilić-Stojanović & Vos, 2014). É importante ressaltar que apenas 30% da microbiota humana gastrointestinal foi caracterizada. Diversos autores observaram que a distribuição de comunidades microbianas específicas pode ser influenciada por diferentes fatores, incluindo a distribuição geográfica, idade, sexo, estresse, tabagismo, dieta do indivíduo, infecções gastrointestinais, assim como antibióticos ou absorção probiótica (Lagier et al., 2012; Garmendia et al., 2012).

No entanto, um importante obstáculo para o conhecimento a respeito do potencial patogênico de *Blastocystis* sp. é a ausência de modelos adequados de infecção experimental. Diversos estudos de infecção envolvendo ratos, camundongos, galinhas e até mesmo suínos foram realizados (Yoshikawa et al., 2004b; Iguchi et al., 2007; Wang et al., 2014). Alguns autores propuseram que os suínos poderiam ser considerados o modelo animal apropriado para estudos de infecção experimental, uma vez que estes animais apresentaram alta prevalência de ST5, sendo, provavelmente, os hospedeiros naturais deste subtipo (Wang et al., 2014). Contudo, ainda são necessários mais estudos para validar esta proposta. Outras investigações, utilizando galinhas e ratos como modelos experimentais de infecção, foram realizados e, inclusive, relataram a ocorrência de patologia moderada a severa nestes animais (Iguchi et al., 2007; Yoshikawa et al., 2004d). Em um estudo conduzido com camundongos, os autores observaram que a infecção nos animais foi auto limitante, apesar de alguns apresentaram certa perda de peso e letargia (Moe et al., 1997). Entretanto, ao inocular isolados de *Blastocystis* sp. de pacientes assintomáticos e sintomáticos em ratos, os autores observaram que os isolados oriundos de indivíduos sintomáticos induziram patologia de moderada a severa nos animais, enquanto os de pacientes assintomáticos causaram apenas patologia leve (Hussein et al., 2008). Outro estudo sobre a histopatogenicidade de *Blastocystis* sp., no qual foram inoculadas diferentes quantidades de cistos em modelos experimentais foi

possível constatar que a patogenicidade deste organismo está relacionada ao tamanho do inóculo e ao período de infecção, observando, conseqüentemente, intensa hiperplasia linfocítica devido ao grande número de formas vacuolares nos tecidos (Pavanelli et al., 2015). E segundo Elwakil e colaboradores (2010), um grande número de cistos de *Blastocystis* sp. é essencial para a infecção oral de camundongos e, uma vez tendo infectado, o parasito pode invadir a lâmina própria, a submucosa e até mesmo as camadas musculares destes animais. Todavia, embora vários trabalhos tenham sido realizados a fim de avaliar o curso da infecção causada por *Blastocystis* sp. utilizando diferentes modelos experimentais, a patogenicidade deste parasito ainda é controversa e nenhum modelo animal foi definido até então.

1.6. Manifestações clínicas

Nos últimos anos, tem sido proposto que este parasito seja emergente com potencial invasivo (Scanlan, 2012; Clark et al., 2013), sendo também considerado um patógeno oportunista em indivíduos imunossuprimidos (Horiki et al., 1999; Tan et al., 2009). Nestes pacientes, o quadro pode ser mais intenso e, por este motivo é preciso analisar bem os sintomas, tendo em vista que são os mesmos de outras doenças infecciosas. *Blastocystis* sp. é comumente associado à diarreia em indivíduos com deficiências mentais, em manipuladores de animais e pacientes imunocomprometidos (Carbajal et al., 1997; Gassama et al., 2001; Khalili et al., 2013).

A blastocistose, doença causada por *Blastocystis* sp., possui características clínicas inespecíficas, na qual os indivíduos infectados podem apresentar sintomas ou não; quando presentes, as manifestações clínicas observadas são: dor abdominal, prurido anal, flatulência, meteorismo, náusea, vômito e diarreia de intensidade variável, sem a presença de leucócitos ou de sangue nas fezes (Kaya et al., 2007; Tan, 2008; 2010; Stensvold et al., 2009a,d; Abdulsalam et al., 2013). A análise histopatológica de lesões presentes na mucosa intestinal de um indivíduo imunocompetente evidenciou a presença de *Blastocystis* sp. nas ulcerações da mucosa intestinal (Janarthanan et al., 2011). E quadros de apendicite associados à obstrução do lúmen do órgão por *Blastocystis* sp. demonstraram que este parasito apresenta potencial invasivo (Lintong et al., 2012).

Recentemente, em um estudo realizado na Arábia Saudita, foi observada a associação entre o câncer colorretal e a infecção por *Blastocystis* sp., indicando possível influência deste parasito sobre o risco de desenvolver esta doença (Mohamed et al., 2017). Neste mesmo estudo, os autores reportaram que *Blastocystis* sp. está envolvido no aumento do estresse oxidativo, fator crucial na tumorigênese colorretal. O estresse oxidativo é amplamente reconhecido como o componente-chave na patogênese do câncer colorretal (Saygili et al., 2003).

Outros relatos descreveram a ocorrência de *Blastocystis* sp. em locais extraintestinais, como no líquido sinovial de um indivíduo com quadro de artrite, que apresentou a completa resolução do quadro clínico após terapêutica com metronidazol (Lee et al., 1990). Há diversos casos na literatura sobre recidivas de quadro de artrite causado por este parasito em indivíduos imunocompetentes (Lakhanpal e Cohen, 1991; Carbajal et al., 1997; Tejera et al., 2012). Além disso, recentemente, *Blastocystis* subtipo 3 foi evidenciado no apêndice, na escavação retouterina e no fluido peritoneal de uma criança de nove anos de idade na França (Fréalle et al., 2015). No Brasil, este mesmo subtipo foi encontrado no cisto esplênico de uma mulher jovem e imunocompetente, residente no Município de Niterói, no Estado do Rio de Janeiro (Santos et al., 2014).

Logo, a detecção de *Blastocystis* sp. em locais extraintestinais indica, em sua maioria, que o mesmo é capaz de evadir o sistema imunológico e se estabelecer em órgãos não propícios ao seu desenvolvimento, uma vez que seu habitat natural é o trato gastrointestinal. É importante salientar que a presença de *Blastocystis* sp. em órgãos extraintestinais pode ser subestimada, visto que é um parasito polimórfico e de difícil diagnóstico.

Ademais, quadros de urticárias cutâneas e a SII têm sido comumente associados à infecção por este parasito em indivíduos imunocompetentes (Stenzel & Boreham, 1996; Valsecchi et al., 2003; Gupta & Parst, 2006; Boorom et al., 2008; Poirier et al., 2012; Verma & Delfanian, 2013; Khademvatan et al., 2017). Outro caso indicou a presença do subtipo 2 de *Blastocystis* em um paciente com sintomas gastrointestinais e urticária generalizada e sem a presença de outro agente infeccioso. Após a administração de antibiótico, os sintomas persistiram, porém foram completamente erradicados depois do tratamento com paromicina e metronidazol (Vogelberg et al., 2010).

Alguns autores sugeriram que os sintomas cutâneos podem ser causados por desequilíbrios na homeostase imune, já que o hospedeiro produz resposta inflamatória às formas ameboides do parasito (Katsarou-Katsari et al., 2008). Provavelmente, antígenos

de *Blastocystis* sp. levam ao recrutamento de células inflamatórias que são capazes de liberar fatores ativadores de histamina. Assim, a imunoglobulina E pode ser um possível mediador na urticária, através da ativação e desgranulação de mastócitos e posterior liberação de mediadores inflamatórios (Tan, 2008). Todavia, o mecanismo pelo qual uma infecção por *Blastocystis* sp. gera sintomas cutâneos ainda precisa ser elucidado.

De fato, existem diversos relatos mostrando a associação de *Blastocystis* sp. com a urticária, inclusive, sugerindo a relação com a presença de formas ameboides e com *Blastocystis* subtipos 2 e 3 (Katsarou-Katsari et al., 2008; Vogelberg et al., 2010). Em contrapartida, em estudo recente realizado na Turquia com crianças que apresentavam quadros crônicos de urticária, apenas 4,7% estavam infectados com algum parasito, sendo *Blastocystis* sp. o mais prevalente (Yilmaz et al., 2016). Desta forma, esta relação ainda é questionável, tendo em vista que outros fatores podem ser responsáveis por quadros de urticária e pouco se sabe a respeito do mecanismo fisiopatológico envolvido na indução desta manifestação clínica (Abdel-Hameed et al., 2011; Lepczynska et al., 2016).

Em relação à SII, acredita-se que antígenos de *Blastocystis* sp. podem causar inflamação na mucosa intestinal provocando a SII, sugerindo que esta síndrome é consequência da infecção por este parasito. Por outro lado, alguns autores apontam que as alterações causadas pela SII geram condições favoráveis para o desenvolvimento do parasito no trato intestinal (Boorom et al., 2008; Stensvold et al., 2009a; Tan et al., 2010), assim como alguns estudos têm apresentado resultados inconsistentes em relação a esta associação (Surangsrirat et al., 2010; Tungtrongchitr et al., 2014). Desta forma, o papel deste parasito na SII, assim como a associação com outras doenças, permanece inconclusivo, devido, em grande parte, ao conhecimento limitado sobre o potencial patogênico deste parasito.

1.7. Morfologia

Blastocystis sp. é um organismo altamente polimórfico e os isolados de humanos e de animais são morfologicamente semelhantes (Yoshikawa et al., 2004a, Stensvold et al., 2008). Até o momento, foram descritas seis formas evolutivas, vacuolar, granular, ameboide, multivacuolar, avacuolar e a cística, cujos tamanhos variam entre 2 e 200 μm

(Tan et al., 2002; 2004; 2008; Stensvold et al., 2009c). O papel funcional de cada uma das formas permanece incerto (Rene et al., 2009) (Figura 2).

Entretanto, é sabido que todas as formas deste parasito são revestidas externamente por uma camada, denominada cápsula ou camada fibrilar, porém ainda não se sabe sobre a sua função (Dunn et al., 1989). Alguns estudos sugeriram que a mesma tenha papel importante na aderência, aprisionando bactérias para nutrição do parasito, aderência à mucosa intestinal do hospedeiro, assim como proteção contra condições adversas no meio ambiente externo (Stenzel & Boreham, 1996).

A forma vacuolar (Fig. 2) é a mais evidenciada nas fezes e apresenta um tamanho que pode variar de 2 a 200 μm . A principal característica deste estágio evolutivo é a presença de um grande vacúolo citoplasmático, que ocupa cerca de 90% do volume celular, de aparência densa e contendo material amorfo, apresentando função desconhecida (Tan et al., 2002). Nas bordas do citoplasma estão as organelas: múltiplas mitocôndrias-*like*, complexo de Golgi, endossomos-*like* e um a quatro núcleos (Stenzel & Boreham 1996; Tan et al., 2002). Esta forma pode ser facilmente confundida com uma gota de gordura, devido ao seu conteúdo amorfo, dificultando o diagnóstico deste parasito. Muitos autores relataram que a forma vacuolar é frequentemente observada em fezes e culturas, ao passo que a granular é considerada produto degenerativo e é comumente encontrada em culturas mais antigas (Tan, 2004). Sugere-se que a forma vacuolar dê origem à granular em certas condições de cultivo. Assim, é comum observar culturas ricas em formas vacuolares tornando-se predominantemente ricas em formas granulares a partir da mudança do meio de cultura, da axenização do mesmo, do aumento da concentração de soro ou pela adição de antibióticos (Dunn, 1989).

A forma granular (Fig. 2), geralmente é menor do que as formas vacuolares, apresentando os diâmetros de 3 a 80 μm (Tan, 2004; Dunn et al., 1989). A presença de grânulos no interior do vacúolo é uma característica que distingue a forma granular da vacuolar (Dunn et al., 1989). Gaythri e colaboradores (2014) demonstraram o surgimento das formas granulares em culturas em decorrência de resposta ao estresse térmico. Após exposição à alta temperatura (41 °C) por 24 h, o crescimento do parasito foi drasticamente reduzido e a maioria das formas presentes era a granular. No entanto, o crescimento dobrou quando os parasitos foram novamente cultivados a 37 °C (Thergarajan et al., 2018).

Outra forma existente, menor do que a vacuolar e granular, medindo cerca de 2,6 a 7,8 μm , é a forma ameboide (Fig. 2) e tem sido observada nas fezes de indivíduos

sintomáticos (Stenzel & Boreham, 1996; Vdovenko, 2000; Tan & Surish, 2006). Esta forma é caracterizada pelo seu formato irregular, possuindo pseudópodes, porém sem motilidade aparente (Stenzel & Boreham, 1996). Além disso, foram observadas organelas mitocôndrias-*like* irregulares, inclusões lipídicas e múltiplos vacúolos bem próximos aos pseudópodes, bem como a presença de um núcleo característico (Tan & Suresh, 2006). Usualmente, é a forma que predomina nas infecções maciças isoladas de portadores sintomáticos (Vassalos et al., 2010; Rajamanikam & Govind, 2013), sendo considerada a responsável pela adesão do parasito ao epitélio intestinal (Rajamanikam & Govind, 2013).

Ademais, na maioria dos ciclos de vida propostos, as formas avacuolares e multivacuolares não são identificadas (Tan, 2004). De fato, não são todos os pesquisadores que aceitam a existência de ambas as formas, tendo em vista a possibilidade de serem formas de transição e por ser difícil a diferenciação das demais formas. As formas avacuolares e multivacuolares são menores (5 a 8 μm) quando comparadas às formas granulares e vacuolares e são mais frequentemente encontradas em culturas, podendo estar relacionadas com estágios intermediários de desenvolvimento da forma cística (Tan, 2008).

Por sua vez, o cisto (Fig. 2) foi a primeira forma a ser descrita por Mehlhorn (1988), sendo observada em um paciente com a síndrome da imunodeficiência adquirida, porém Stenzel & Boreham (1991) forneceram a primeira descrição morfológica completa da forma cística. Esta forma é polimórfica, mas geralmente apresenta formato oval ou circular, de tamanho pequeno, em torno de 3 a 5 μm , o que dificulta a sua identificação, podendo ser confundido com leveduras ou com detritos fecais (Tan, 2004; Stensvold et al., 2009c). Podem possuir de 1 a 2 núcleos e várias organelas mitocôndrias-*like* (Stenzel & Boreham, 1991). É considerada a forma de infecção e de resistência ao meio ambiente, porém apenas 20,9% dos indivíduos infectados são capazes de excretar cistos, podendo ser eliminados de forma intermitente, além de, possivelmente, os diferentes subtipos produzirem cistos em quantidades distintas (Suresh & Smith, 2004).

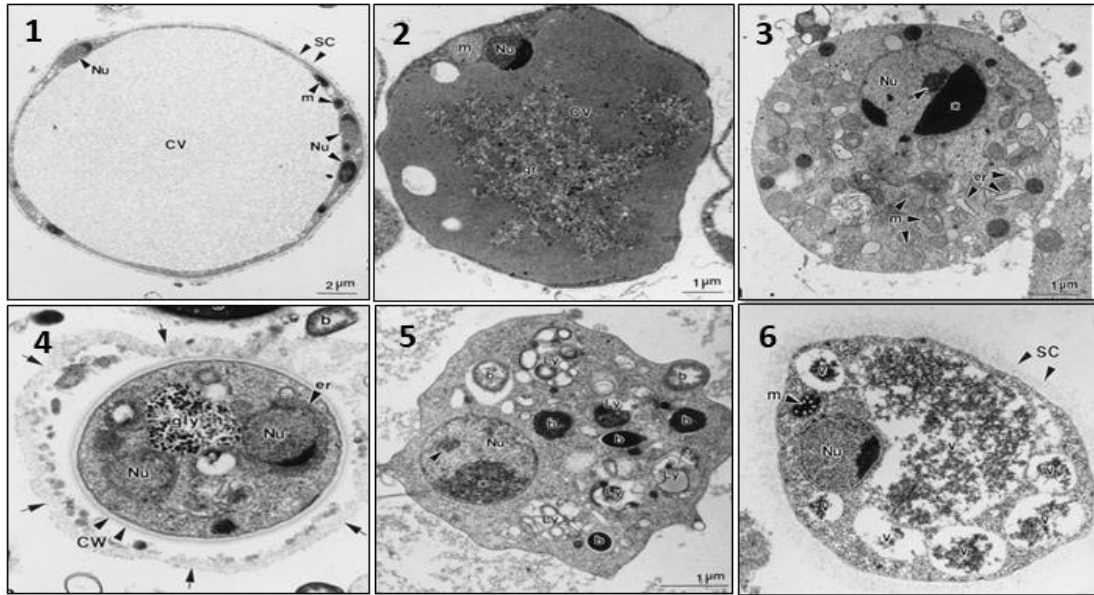


Figura 2: As formas evolutivas de *Blastocystis* sp. (Stenzel & Boreham, 1996)

*Microscopia eletrônica das seis formas evolutivas de *Blastocystis* sp. 1: forma vacuolar – seta apontando o núcleo (Nu), organela mitocôndria-like (m), camada superficial (SC), vacúolo central (CV); 2: forma granular – núcleo (Nu), organela mitocôndria-like (m), vacúolo central (cv), grânulos (gr); 3: forma avacuolar - seta apontando o núcleo (Nu), três setas apontando a organela mitocôndria-like (m) e retículo endoplasmático (er); 4: forma cística – setas mais externas apontando a camada fibrilar, setas mais internas mostrando a parede cística (CW), núcleo (Nu), vacúolo de glicogênio (gly), retículo endoplasmático (er); 5: forma ameboide – núcleo (Nu), bactérias (b), vacúolo de lipídio (ly); 6: forma multivacuolar – núcleo (Nu); retículo endoplasmático (er); seta apontando a organela mitocôndria-like (m); a camada superficial (SC), vacúolos (v).

Em relação à viabilidade, foram encontrados cistos viáveis em estações de tratamento de esgoto na Escócia e Malásia (Suresh et al., 2005), além de serem capazes de sobreviver a temperaturas ambientes (25°C) e 4°C em meio aquoso por até um mês e dois meses, respectivamente (Yoshikawa et al., 2004b), porém são sensíveis ao congelamento (-20°C) e calor excessivos (40-50°C).

Até o presente momento, a única forma considerada infectante é o cisto (Tan, 2008). A capacidade de infecção desta forma foi demonstrada experimentalmente em cobaias, ratos da linhagem *Wistar*, infectados por via oral. Neste estudo foi verificado que 10 cistos da cepa RN94-9 isolada de um rato norueguês foram capazes de infectar alguns ratos *Wistar* de laboratório (Yoshikawa et al., 2004d).

Todavia, é importante salientar que a literatura dispõe de poucas informações sobre a transição de um estágio morfológico para outro ao longo do ciclo evolutivo.

1.8. Ciclo Biológico

O ciclo biológico de *Blastocystis* sp. ainda não foi completamente elucidado. Acredita-se que o ciclo tenha início através da ingestão de água e alimentos contaminados com a forma cística (Suresh et al., 1993; Villar et al., 1998; Chen et al., 1999). Após a sua ingestão, ocorre o desencistamento no intestino, perdendo a camada fibrilar, desencadeado pelo pH ácido do estômago e pela ação das enzimas intestinais, dando origem à forma vacuolar. Subsequentes divisões binárias originam as principais formas: amebóide, granular ou a forma cística (Tan, 2008). Outras formas de reprodução foram propostas, incluindo a reprodução sexuada (Zhang et al., 2012), porém não existe evidência convincente na literatura sobre esse tipo de reprodução por *Blastocystis* sp. durante o seu ciclo de vida.

Assim, o segundo ciclo proposto e aceito pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) inicia-se através da ingestão de cistos de parede espessa, que dão origem à forma vacuolar, a qual se multiplicam assexuadamente. Através da divisão binária, as formas vacuolares podem se desenvolver em formas multivacuolares ou amebóides, antes de se tornarem pré-cisto através da esquizogonia, podendo desenvolver-se em cisto de parede fina e levar à auto-infecção do hospedeiro (Parija & Jeremiah, 2013) ou dar origem ao cisto de parede espessa, que será eliminado nas fezes contaminando o ambiente (Singh et al., 1995). No entanto, faltam informações precisas sobre a transformação da forma amebóide para a forma vacuolar e da forma vacuolar para a forma cística (Figura 3).

Desta forma, a discrepância em relação aos ciclos biológicos propostos pode ser atribuída aos vários tipos, já citados na literatura, de reprodução do parasito (Zierdt et al., 1991; Boreham & Stenzel, 1993; Zhang et al., 2012) A divisão binária tem como característica a divisão da célula mãe em duas células-filha idênticas; a reprodução por brotamento é caracterizada pelo aumento de um dos lados da célula, ocorrendo o prolongamento da membrana plasmática e originando outra célula. Na esquizogonia, uma célula grande com várias estruturas semelhantes a núcleos dá origem a outras células menores (Tan, 2008). Entretanto, a descrição detalhada do ciclo biológico de *Blastocystis* sp. ainda carece de confirmação.

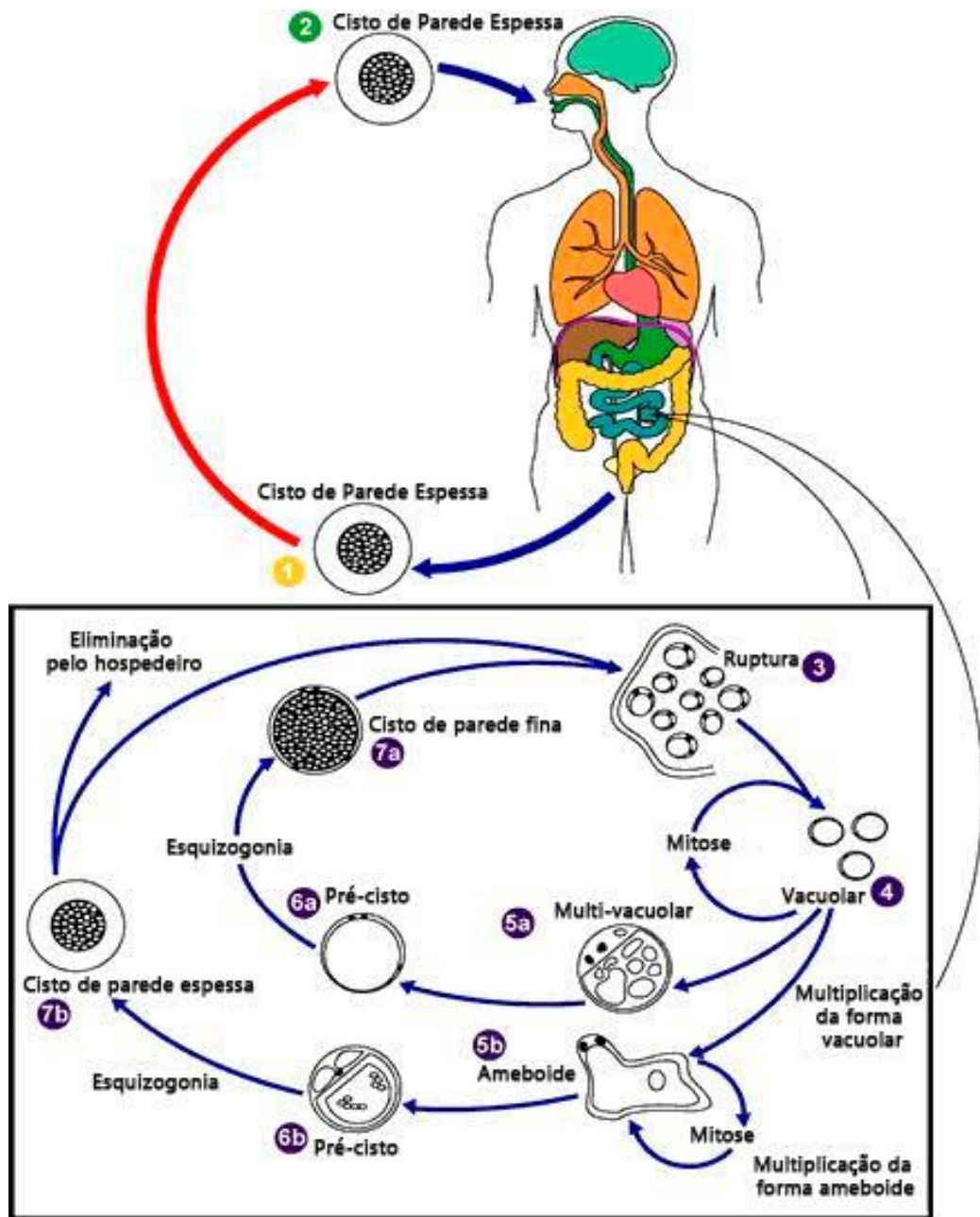


Figura 3: Ciclo biológico de *Blastocystis* sp. (Adaptado de www.cdpx.cdc.gov/html)

*O cisto de parede espessa é eliminado pelo hospedeiro contaminando o ambiente (1); o cisto de parede espessa é considerado a forma infectante de *Blastocystis* sp. (2); no intestino ocorre a ruptura do cisto, liberando as formas vacuolares, que se multiplicam assexuadamente (3 e 4); podendo dar origem a forma multivacuolar ou ameboide por divisão binária (5a,b); se desenvolvem em pré-cisto (6a,b) e por meio da esquizogonia darão origem ao cisto de parede fina (7a), possível responsável pela auto-infecção, ou ao cisto de parede espessa (7b), que será eliminado pelo hospedeiro no ambiente.

1.9. Diagnóstico laboratorial

Convencionalmente, o diagnóstico laboratorial é realizado através do exame parasitológico de fezes, baseado nos critérios morfológicos das principais formas evolutivas de *Blastocystis* sp. A análise coproscópica de fezes frescas ou conservadas pode ser realizada, empregando técnicas de concentração ou pelo exame direto. Estas técnicas podem ser associadas a métodos de coloração temporária utilizando o corante lugol ou pelos métodos de coloração permanente, tais como: tricromo de Masson, giemsa e hematoxilina férrica (De Carli, 1994; Eymael et al., 2010). Segundo Windsor e colaboradores (2002), 73% das amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp. não foram detectadas pelo exame direto quando comparado a coloração permanente com tricromo de Masson.

O diagnóstico de *Blastocystis* sp. nas fezes apresenta melhores resultados quando são utilizadas técnicas de colorações permanentes, como hematoxilina férrica ou tricromo (Amato Neto et al., 2004). O método direto a fresco corado com o lugol tem como desvantagem a presença de detritos fecais, que dificulta a visualização das estruturas internas do parasito. É importante ressaltar que a sensibilidade do exame direto é dependente da carga parasitária. Além disso, é recomendado o exame de múltiplas amostras de fezes, a fim de aumentar a eficiência do diagnóstico de *Blastocystis* sp., tendo em vista que a eliminação de cistos ocorre de forma intermitente (Suresh et al., 2009) e, sobretudo, saber diferenciar as formas do parasito de outras células e outros parasitos.

Diversos estudos apontam que os métodos de flutuação ou sedimentação espontânea não são eficazes na busca por *Blastocystis* sp. nas fezes, uma vez que o contato deste organismo com a água acarreta a lise do mesmo, produzindo, portanto, resultados falso-negativos (Amato Neto et al., 2004; Nascimento & Moitinho, 2005).

A técnica de sedimentação espontânea utilizando água, apesar da fragilidade das formas vacuolares, pode ser empregada em amostras conservadas com formol a 10% (Velásquez et al., 2005). Além disto, tem sido proposto que o método de concentração baseado no princípio de sedimentação por centrifugação usando a formalina e acetato de etila aumenta a sensibilidade de detecção do parasito (Zaman & Khan, 1994). No entanto, outros estudos reportaram que o método de concentração utilizando acetato de etila apresenta baixa sensibilidade na detecção de *Blastocystis* sp. (Suresh & Smith, 2005; Stensvold et al., 2007).

Em contrapartida, a cultura de fezes é o método que apresenta maior sensibilidade diagnóstica quando comparado ao exame parasitológico de fezes (Santin et al., 2011; Clark et al., 2013), mas não é utilizado rotineiramente em laboratórios clínicos, somente no âmbito da pesquisa científica. Leelayoova e colaboradores (2002) mostraram que a cultura *in vitro* apresenta sensibilidade significativamente maior quando comparada à detecção de *Blastocystis* sp. através do exame direto e técnicas de concentração. A vantagem deste método é que mesmo com baixa carga parasitária, os isolados podem ser cultivados, ampliados e, posteriormente, utilizados em outros testes (Suresh & Smith, 2004).

Outros métodos também foram avaliados quanto a sensibilidade de detecção, e foi constatado que o método direto de esfregaços fecais apresentou 9,4% de sensibilidade, enquanto que a técnica de PCR a partir de fezes e da cultura de *Blastocystis* sp. obteve 19,4% e 66,7%, respectivamente. Outro estudo comparando métodos de detecção para o diagnóstico de infecções por *Blastocystis* sp. revelou que 98% e 52% foram positivos usando cultura *in vitro* e detecção por PCR diretamente das fezes, respectivamente (Termmathurapoj et al., 2004). Assim, a cultura *in vitro* é considerada padrão-ouro na detecção deste parasito. Todavia, este método diagnóstico possui a desvantagem de ser considerada trabalhosa e demorada, tornando-se uma ferramenta inviável para o cenário do diagnóstico laboratorial. Além disso, é uma técnica seletiva, tendo em vista que alguns subtipos são refratários a este método, subestimando a prevalência destes em estudos epidemiológicos (Parkar et al., 2007; Yan et al., 2007).

Ademais, em decorrência do polimorfismo do parasito, da inexperiência na identificação e da falta de padronização de métodos diagnósticos observam-se resultados discrepantes entre diferentes estudos descritos na literatura (Utzinger et al., 2010; Dogruman-Al et al., 2010). Estudos direcionados sobre o aspecto morfológico de *Blastocystis* sp. são de fundamental importância na padronização dos métodos de diagnóstico, assim como a capacitação profissional dos microscopistas. O conhecimento da dinâmica das variações morfológicas do parasito é essencial para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos acurados e para a obtenção de dados epidemiológicos contundentes.

O diagnóstico sorológico efetivo para *Blastocystis* sp. não foi estabelecido até o presente momento. Acreditava-se que a infecção por este parasito não gerava resposta humoral (Chen et al., 1987). De fato, existem poucos trabalhos acerca deste tema, entretanto o teste de ELISA foi capaz de detectar anticorpos anti-IgG *Blastocystis* em

pacientes infectados (Santos & Rivera, 2009). Os testes de anticorpos séricos utilizando antígeno celular foram desenvolvidos para fins de pesquisa e mostraram correlação entre a resposta de anticorpos no soro e a Blastocistose sintomática (Hussain et al., 1997; Mahmoud et al., 2003). Além disso, a avaliação de soros de pacientes assintomáticos através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) mostrou 70% de positividade para este parasito (Kaneda et al., 2000). Entretanto, este método não está disponível para aplicação clínica.

Poucos estudos abordam a avaliação de métodos de diagnóstico e a identificação de *Blastocystis* sp. nas fezes. A maioria dos trabalhos realizados utilizam diferentes metodologias, o que dificulta uma análise comparativa dos resultados obtidos. Além disso, é importante ressaltar que a detecção de *Blastocystis* sp. pode ser dificultada, assim como as reais taxas de prevalência podem ser subestimadas, devido aos diferentes métodos diagnósticos empregados em estudos epidemiológicos, principalmente àqueles que utilizam, exclusivamente, a microscopia ótica para diagnóstico.

1.10. Marcadores moleculares para *Blastocystis* sp.

Os marcadores moleculares são sequências de nucleotídeos, podendo ser também de aminoácidos, que revelam polimorfismos entre indivíduos geneticamente relacionados (Ferreira et al., 2003). No estudo da epidemiologia molecular, são genes ou sequências empregadas com o intuito de rastrear a transmissão de linhagens específicas de agentes etiológicos, indicar microorganismos responsáveis por doenças infecciosas, determinar suas fontes de infecção, além de suas relações biológicas (filogenéticas) (Levin et al., 1999).

No âmbito da epidemiologia molecular no estudo de *Blastocystis* sp., vários métodos de diagnóstico molecular baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) das fezes ou das amostras de cultivo de espécimes fecais foram descritos (Santin et al., 2011; Abe et al., 2003; Scicluna et al., 2006; Yoshikawa et al., 2004c; Stensvold et al., 2006). No entanto, estas técnicas são de uso restrito na pesquisa científica (Tabela 2), uma vez que possui alto custo e maior complexidade de interpretação dos resultados.

A detecção de *Blastocystis* sp. por PCR em fezes é pouco sensível (Termmathurapoj et al., 2004), tendo em vista que alguns ácidos biliares inibem a ação

da DNA polimerase. Além disso, outros componentes como o grupo heme e seus produtos metabólicos também podem interferir no processo de amplificação (Walderich et al., 2007). Em um estudo sobre a eficiência desta técnica molecular, os autores descobriram que a PCR não conseguiu detectar 25% das amostras que foram positivas em cultura (Souppart et al., 2009). Entretanto, é importante ressaltar que as técnicas moleculares apresentam maior sensibilidade de detecção deste organismo quando comparadas à microscopia (Stensvold et al., 2006, Roberts et al., 2011).

A maioria dos estudos moleculares é baseada na análise de sequências parciais da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU-DNAr) do parasito (Santin et al., 2011; Stensvold et al., 2012), permitindo, inclusive, a identificação molecular de 17 subtipos de *Blastocystis* sp. (Stensvold et al., 2006). Esta abordagem é amplamente utilizada por vários grupos de pesquisa, no entanto são utilizadas diferentes regiões do gene SSU-RNAr como marcadores (Scicluna et al., 2006; Stensvold et al., 2006; Parkar et al., 2010; Santin et al., 2011), o que pode comprometer a comparação dos resultados.

O DNA ribossômico tem a função de codificar as diferentes moléculas do RNA ribossômico, que possui extrema importância no processo de tradução de proteínas. A ampla utilização deste gene em inferências filogenéticas pode ser atribuída à principal característica deste alvo, que apresenta regiões mais variáveis e outras mais conservadas, sendo, portanto, considerado um ótimo marcador para estudos sobre relações evolutivas entre organismos (Hillis & Dixon, 1991).

Em eucariotos, as sequências de DNA que codificam genes ribossômicos constituem unidades de transcrição localizadas em cromossomos nucleares que são organizadas para formar uma família multigênica, com alto número de cópias repetidas. De forma geral, cada unidade de repetição do DNAr eucarioto consiste de um espaçador externo transcrito (ETS), uma região que codifica para o RNAr 18S, dois espaçadores internos transcritos (ITS1-2), separados por uma região que codifica o RNA 5.8S e uma região que codifica para o RNAr 28S (Favell & O'Dell, 1979). Este gene também tem sido utilizado como alvo molecular do "código de barra" (*barcoding*) para a identificação dos subtipos, amplificando uma região de aproximadamente 30% do SSU-RNAr (Scicluna et al., 2006). Todavia, os iniciadores desenvolvidos para este fim apresentam baixa especificidade, pois são capazes de amplificar o DNA de outros eucariotos, principalmente fungos, sendo necessária a clonagem molecular para a tipagem de *Blastocystis* sp. (Stensvold et al., 2013a). Outros alvos moleculares que foram descritos são: o fator alfa de alongação (EF-1a) (Ho et al., 2000; Arisue et al., 2003; Noel et al.,

2005), espaçadores transcritos internos 1 e 2 (ITS1-2) do rDNA (Villalobos et al., 2014) e a organela semelhante a mitocôndria (MLO) (Poirier et al., 2014).

O gene codificador do fator de alongação 1 alfa (EF-1a) é responsável pela ligação do aminoacil-RNAt ao sítio A do ribossomo, atuando na fase de alongamento da síntese proteica. Este gene é altamente conservado, sendo bastante utilizado para estudos filogenéticos de organismos não muito próximos (Tan et al., 2002). Um estudo empregando a análise da sequência de aminoácidos do EF-1 alfa evidenciou que, de fato, *Blastocystis* sp. não compartilha o mesmo ancestral comum do reino Fungi e que sua divergência ocorreu antes da dos gêneros *Trypanosoma*, *Euglena*, *Dictyostelium* e outros eucariotos (Nakamura et al., 1996). A análise da sequência nucleotídica deste gene demonstrou que os isolados *Blastocystis* sp. de humanos e de animais são proximamente relacionados (Ho et al., 2000). Além disso, um estudo comparando os alvos SSU-RNAr e EF-1 alfa mostrou que os 13 isolados analisados apresentaram resultados concordantes quanto à topologia das árvores filogenéticas. No entanto, a partir da divergência genética observada entre as sequências de ambos os alvos, os autores sugeriram a existência de, possivelmente, mais de 12 espécies distintas dentro do gênero *Blastocystis* sp. (Noel et al., 2005).

Em relação aos espaçadores internos transcritos, ITS1 e ITS2, estes evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, sendo, por esse motivo, de grande interesse para os estudos filogenéticos de gêneros, espécies e até populações. Para diferenciação entre espécies, ITS1-2 do rDNA, são considerados excelentes marcadores, principalmente no caso de parasitos eucariotos (Pelandakis et al., 2000). Recentemente, a análise de ITS1-2 identificou duas variantes de subtipo 1 de *Blastocystis* (Villalobos et al., 2014) da sequência de código de barra (Scicluna et al., 2010).

Recentemente, o gene de cópia única, polimórfico, que codifica a SSU-RNAr da organela semelhante à mitocôndria (MLO-DNAr) mostrou ser um alvo em potencial para a identificação dos subtipos. Todavia, os resultados observados com este marcador para alguns subtipos foram discordantes quando comparados aos com o marcador SSU-RNAr (Poirier et al., 2014).

Outra abordagem que tem sido utilizada é a amplificação de DNA empregando um par de iniciadores “subtipo específico” envolvendo, portanto, sete reações da PCR para cada um dos iniciadores-STs de *Blastocystis*, sem a necessidade de sequenciamento (Yoshikawa et al., 2004c). Entretanto, esta abordagem identifica somente de ST1 a ST7 e os iniciadores que flanqueiam regiões específicas para cada subtipo apresentam baixa

sensibilidade (Stensvold et al., 2013a). É importante destacar que estes iniciadores foram desenvolvidos para diagnóstico dos STs de *Blastocystis* sp., baseados em sequências previamente identificadas de ST1-ST7. Em decorrência da falta de conhecimento sobre a variabilidade genética dos subtipos, é justificável que alguns isolados não sejam amplificados por esta abordagem metodológica.

Tabela 2: Alvos moleculares utilizados para identificação e filogenia de *Blastocystis* e suas características

Alvos moleculares	Características	Referências
SSU-RNAr	São utilizadas várias regiões; é altamente conservado a nível de espécies; é o alvo mais utilizado em estudos moleculares e filogenéticos, permitindo a identificação dos 17 STs existentes.	Yoshikawa et al., 2004; Scicluna et al. 2006; Santin et al. 2011; Parkar et al., 2010
ITS 1-2	Considerados excelentes marcadores, principalmente no caso de parasitos eucariotos; permitiu a identificação de 2 variantes do subtipo 1.	Villalobos et al., 2014
EF-1a	Altamente conservado, muito utilizado em estudos filogenéticos, isolados de animais e humanos são proximamente relacionados.	Ho et al., 2000
MLO-DNAr	Gene de cópia única; polimórfico; codifica a SSU-RNAr da organela semelhante a mitocôndria; apresentou discordantes quando comparados aos com SSU-RNAr.	Poirier et al., 2014

Embora exista hoje um consenso de que os critérios baseados na filogenia molecular são a melhor forma de classificação, essa abordagem deve ser padronizada. É comum observar estudos que empregam diferentes alvos moleculares, gerando assim, resultados dúbios quando comparados, o que pode comprometer a identificação baseada na taxonomia molecular. Assim, a validade dos dados analisados para determinar a infecção de *Blastocystis* sp., sobretudo a prevalência deste parasito, deve ser questionada, pois os diferentes resultados obtidos podem ser inerentes aos métodos de diagnóstico utilizados (Stensvold et al., 2009c).

1.11. Tratamento

No que concerne ao tratamento para a Blastocistose, também existem muitas dúvidas sobre a escolha do fármaco a ser administrado. O tratamento é geralmente proposto quando o paciente apresenta diarreia persistente e nenhum outro patógeno além de *Blastocystis* sp. é identificado nas fezes (Coyle et al., 2012). Muitos parasitologistas afirmam que se a carga parasitária for alta no exame de fezes, mesmo com a ausência de sintomas ou de outro patógeno conhecido deve-se propor o tratamento (Tan et al., 2002; Dinleyici et al., 2011).

Atualmente, o metronidazol é o medicamento de primeira escolha (Moghaddam et al., 2005; Kurt et al., 2016). Entretanto, o modo de atuação deste fármaco ainda não foi descrito claramente (Coyle et al., 2012; Stensvold et al., 2010). Embora existam diversos relatos na literatura sobre a eficácia deste medicamento no tratamento da Blastocistose (Moghaddam et al., 2005; Bálliant et al., 2014), ainda há um número crescente de trabalhos relatando que o metronidazol não é efetivo na erradicação deste parasito (Stensvold et al., 2010; Nigro et al., 2003; Cassano et al., 2005).

Um dos estudos realizados com o fármaco metronidazol relatou a cura clínica em 88% dos pacientes no grupo tratado com a eliminação do parasito em 80% dos casos (Nigro et al., 2003). No entanto, em alguns pacientes, os sintomas persistiram, sem a erradicação do parasito, o que sugere que esses indivíduos estavam infectados por subtipos resistentes ou menos sensíveis às drogas utilizadas.

Algumas hipóteses têm sido atribuídas a sua ineficácia: i) a droga não atinge altas concentrações no lúmen do cólon (Stensvold et al., 2010); ii) altos riscos de reinfecção em regiões endêmicas (Nigro et al., 2003); iii) isolados de *Blastocystis* sp. de diferentes regiões apresentam graus distintos de resistência (Hareh et al., 1999) e a iv) interação do parasito com a flora intestinal (Wawrzyniak et al., 2013; Scanlan et al., 2014; Nourrisson et al., 2014). Segundo Stensvold e colaboradores (2010), é mais adequado relatar sua baixa eficácia do que atribuir o resultado à resistência. No entanto, em 2011, foi observada a presença de genes no genoma de *Blastocystis* ST7 que codificam proteínas responsáveis pela resistência a múltiplas drogas (Denoëud et al., 2011).

A segunda opção de tratamento é o antibiótico Trimetopim-Sulfametazol (TPM-SMX) (Ok et al., 1999; Stensvold et al., 2008), porém é considerado um medicamento de eficácia limitada em alguns pacientes (Moghaddam et al., 2005). O TMP-SMX não teve eficácia superior ao tratamento com placebo em crianças infectadas por *Blastocystis* sp.

com dor abdominal recorrente (Heyland et al., 2012). Por sua vez, o fármaco *Paramomycin* possui amplo espectro antimicrobiano, sendo também administrado em casos de infecção por *Blastocystis* sp. A atuação deste fármaco ainda é controversa, sendo sugerido que o efeito é superior ao metronidazol (Van Hellemond et al., 2013). Sua eficácia foi observada em pacientes com urticária crônica (Kick et al., 2002; Valsecchi et al., 2004). A Nitazoxanida também é uma alternativa, mas este medicamento apresenta efeito de curta duração (Tan et al., 2010).

Outros fármacos também são eficazes na erradicação de *Blastocystis* como: tinidazol, ornidazol, secnidazol, cetoconazol, quinina, iodoquinol e emetina. Este último tem seu uso atualmente limitado, devido aos sérios efeitos colaterais (Sekar et al., 2013). O probiótico *Saccharomyces boulardii*, fungo não patogênico, também tem sido empregado no tratamento, e atua como regulador da homeostase no intestino, prevenindo, portanto, a colonização da mucosa intestinal por agentes patogênicos (Vandenplas et al., 2015). Embora tenha sido mostrada maior eficácia de *S. boulardii* quando comparada ao metronidazol (Dinleyici et al., 2011), são necessários mais estudos para avaliar a real eficácia deste probiótico na erradicação do parasito.

Além disso, diversos estudos realizados *in vivo* e *in vitro* testaram a eficácia de alguns compostos fitoterápicos no combate a alguns distúrbios gastrointestinais (Rokaya et al., 2014). A escolha dos extratos naturais foi atribuída a sua atividade antimicrobiana e composição química. O extrato da planta *Nigella sativa* teve efeito inibitório sobre *Blastocystis* sp. *in vitro* e preveniu o efeito citopático em camundongos infectados oralmente (Eida et al., 2016). Outros extratos também foram testados para este parasito e os autores concluíram que o gengibre e o alho são benéficos no tratamento contra a Blastocistose. Segundo Abdel-Hafeez e colaboradores (2015), o tratamento de camundongos infectados com alho e gengibre reduziu significativamente a eliminação de cistos quando comparados ao grupo infectado não tratado. Recentemente, outros dois extratos naturais, *Origanum majorana* e *Foeniculum vulgare*, conhecidos popularmente por manjerona e erva-doce respectivamente, foram testados quanto à eficácia contra *Blastocystis* sp. (Méabed et al., 2018). Os autores verificaram que ambos os extratos apresentaram efeito tempo-dependente contra o parasito com eficácia de 96% e 100% para *O. majorana* e 56,4% e 70,7% para *F. vulgare* em 48 e 72 h, respectivamente. Contudo, é importante ressaltar que embora os resultados tenham sido positivos no tratamento da infecção por *Blastocystis* sp., são necessários mais estudos a respeito da eficácia destes extratos.

II. JUSTIFICATIVA

Ainda existem muitas dúvidas acerca da biologia de *Blastocystis* sp. e, conseqüentemente diversas questões, principalmente em relação a sua taxonomia, patogenicidade e potencial zoonótico permanecem inconclusivas. Para alcançarmos as respostas sobre importantes questões a respeito deste parasito são necessários, inicialmente, estudos sobre a caracterização molecular dos subtipos de *Blastocystis* sp. e sua distribuição em diferentes hospedeiros e regiões. Desta forma, a realização de trabalhos no âmbito da epidemiologia molecular poderá contribuir para aprimorar o conhecimento das potenciais fontes e rotas de transmissão dos STs de *Blastocystis* sp., além de proporcionar o melhor entendimento sobre a diversidade deste parasito.

No Brasil, diversos inquéritos parasitológicos pontuais e dirigidos para outros enteroparasitos demonstraram elevados percentuais de prevalência de *Blastocystis* sp. em humanos em diversas regiões. Todavia, não existem estudos consolidados sobre o tema em diferentes hospedeiros. Além disso, os trabalhos sobre a caracterização molecular deste organismo ao redor do mundo utilizam marcadores moleculares distintos, o que pode comprometer estudos comparativos. Portanto, avaliar o desempenho dos alvos descritos na literatura para a caracterização molecular de *Blastocystis* sp. é essencial para a realização de estudos comparativos futuros sobre a sua epidemiologia. Posto isto, este trabalho teve como objetivo caracterizar os isolados de *Blastocystis* sp. de origem animal e humana através da análise do alvo SSU-RNAr. E, posteriormente, a partir de uma subamostragem dos isolados previamente identificados pelo SSU-RNAr, os mesmos foram sequenciados utilizando também os alvos ITS1-2 e MLO-DNAr. Assim, foi possível avaliar o potencial de cada alvo empregado na identificação de *Blastocystis* sp., além de investigar a distribuição e ocorrência dos subtipos em diferentes hospedeiros nas áreas estudadas.

III. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Caracterizar geneticamente os isolados de *Blastocystis* sp. buscando correlacionar a distribuição dos genótipos obtidos com os hospedeiros de origem e avaliar o desempenho dos alvos SSU-RNAr, ITS1-2, MLO-DNAr para a caracterização molecular deste organismo.

3.2 Específicos:

- Cultivar *Blastocystis* sp. de amostras de fezes em meio poliaxênico;
- Padronizar as Reações em Cadeia da Polimerase para os alvos: SSU-RNAr, ITS1-2 e MLO-DNAr e para os iniciadores dos subtipos específicos (STs);
- Caracterizar os subtipos de *Blastocystis* sp. empregando os alvos SSU-RNAr, ITS1-2, MLO-DNAr através do sequenciamento de DNA e avaliar o potencial de cada alvo na identificação do genótipo;
- Comparar os genótipos obtidos com os descritos na literatura a fim de avaliar a relação entre os STs e correlacionar com os hospedeiros de isolamento;
- Avaliar a variabilidade genética *inter* e *intra*-subtipos do alvo SSU-RNAr de *Blastocystis* sp.
- Comparar os resultados obtidos entre os diferentes alvos utilizados para a caracterização molecular de *Blastocystis* sp.

IV. METODOLOGIA

4.1. Coleta de amostras

4.1.1 Fezes de humanos

No total, foram utilizadas para este estudo 180 amostras fecais humanas previamente cultivadas, oriundas de um inquérito parasitológico da população vinculada a uma unidade de saúde mental no Município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, e 294 espécimes de moradores do Município de Sumidouro, RJ, configurando uma comunidade urbana e uma rural, respectivamente (Figura 4). Ambos os inquéritos desenvolvidos possuem aprovação pelo Comitê de Ética Humana da FIOCRUZ (CEP/FIOCRUZ n° 632/11 e (CEP/UFF n° 926.229). A escolha dos locais de estudo deveu-se ao fato de já serem locais estudados pela co-orientadora do presente trabalho em colaboração com pesquisadores que desenvolvem outros projetos de pesquisa nas respectivas áreas. Nos estudos prévios realizados nestas duas comunidades, o cultivo de fezes foi realizado e alíquotas das culturas positivas para *Blastocystis* sp. foram congeladas a -20°C para a posterior identificação dos subtipos.

As amostras provenientes de Duque de Caxias são de pacientes e seus familiares do Centro de Atenção Psicossocial (CAPS) do município em questão. Os CAPS são unidades especializadas em saúde mental para o tratamento e reinserção social de indivíduos com transtorno mental grave e persistente. São compostos por assistentes sociais, psicólogos, psiquiatras, entre outros especialistas que oferecem atendimento interdisciplinar a pacientes internados nas diversas unidades no estado do Rio de Janeiro, financiados pelo Ministério da Saúde. O encaminhamento para as unidades da CAPS possui caráter aberto e comunitário, tendo em vista que são feitos através de demanda espontânea (<http://www.rio.rj.gov.br/web/sms/caps>).

Em relação ao município de Sumidouro, as amostras foram coletadas na área rural do município, pertencente ao estado do Rio de Janeiro. A cidade de Sumidouro está localizada nas montanhas da região central do Rio de Janeiro, na fronteira continental da Serra do Mar, com altitudes que variam de 264 metros a 1300 metros. A região tem clima mesotérmico úmido (Nimer, 1989), com precipitação normal entre 153,5 mm e 269,4 mm. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), Sumidouro tem 14.900 habitantes, sendo que a maioria (87,7%) vive na área rural, demonstrando uma estreita relação com a produção agrícola. A agricultura de Sumidouro

pode ser considerada como meio de subsistência, sendo importante atividade econômica, uma vez que distribui para outras cidades, como Rio de Janeiro, Sapucaia, Nova Friburgo e Teresópolis.

4.1.2. Fezes de animais

Em relação às amostras de animais, foram analisadas 374 amostras fecais de diferentes grupos de animais vertebrados e invertebrados, dos quais 89 eram de primatas não humanos (*Cebus apella xanthosternos*, *Macaca nemestrina*, *Ateles* sp, *Chlorocebus* sp, *Leontopithecus chrysomelas*, *Lagothrix lagotricha*, *Saguinus imperator*, *Papio* sp, *Pan troglodytes*, *Alouatta* sp, *Macaca fuscata*, *Aotus* sp, *Macaca mulatta*, *Saimiri sciureus*, *Macaca fascicularis*), 39 de porcos domésticos (*Sus scrofa*), 26 de marsupiais (*Metachinus nudicaudatus* e *Didelphis aurita*), 11 de roedores (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Oligoryzomys nigripes*, *Trinomys eliasi*, *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus*), 57 de aves (*Gallus gallus*, *Anas domesticus* e *Cairina moschata*), duas de guaxinins (*Procyon lotor*), 40 amostras de felinos (*Felis catus*), 13 de répteis (*Geochelone carbonaria*) e uma amostra de tatu (*Dasyus septemcinctus*). Além disso, 96 amostras de baratas (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*) também foram examinadas.

Os espécimes fecais foram coletados de diferentes locais no Estado do Rio de Janeiro, tais como o Zoológico do Rio de Janeiro (RioZoo); o Instituto Científico e Tecnológico de Biomodelos da Fiocruz (ICTB), o Campus Fiocruz Mata Atlântica (CFMA) (22°56'18"S 43°24'11"W), os Parques Estaduais da Serra da Tiririca (PEST) e da Pedra Branca (PEPB) (22°55'57"S 43°26'34"W); os Municípios de Rio Claro-RJ (RC) (Lidice - 22°52'30.6"S 44°12'34.9"W e Morro do Estado - 22°43'12.5"S 44°8'21.6"W), Sumidouro-RJ (SUMID) (22°02'46"S 42°41'21"W), Niterói-RJ (NIT) (22°52'39.81"S 43° 3'4.16"O) e São Gonçalo-RJ (SG) (22°47'26.41"S 42°59'19.23"O) e o distrito de São Pedro da Serra-RJ (SPS) (22°19'21.43"S 42°20'23.02"O) (Figura 4).

O RioZoo é o zoológico mais tradicional e antigo do Brasil, localizado no bairro de São Cristóvão na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Possui área de 55 mil m² e um plantel de cerca de 1.300 animais, entre aves, primatas, répteis, peixes e felinos. Entre períodos de prosperidade e dificuldades financeiras, o RioZoo, até 2016, estava ligado à prefeitura municipal do Rio de Janeiro. Em outubro deste ano, passou à gestão do Grupo Cataratas,

empresa privada especializada em gestão de atrativos naturais, de conservação, educação e pesquisa (<http://www.riozoo.com.br/>).

O ICTB, Instituto Científico e Tecnológico de Biomodelos da Fiocruz, é uma unidade técnico-científica, responsável pela produção e fornecimento de biomodelos, dentre eles, animais de laboratório, sangue e hemoderivados para estudos científicos experimentais dos laboratórios de pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz. A equipe técnica é composta por funcionários veterinários, técnicos e biológicos capacitados e especializados nas diversas áreas do bioterismo (<https://www.ictb.fiocruz.br/>).

O Campus Fiocruz Mata Atlântica (CFMA), localizado na área da Colônia Juliano Moreira, em Jacarepaguá, na zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro, foi implantado em 2003 e tem como principal objetivo a pesquisa de fármacos, a conservação da biodiversidade e controle de zoonoses (<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/campus-fiocruz-mata-atlantica>).

O Parque Estadual da Serra da Tiririca (PEST) está inserido entre os municípios de Niterói e Maricá no estado do Rio de Janeiro. É uma unidade de conservação criada pela Lei nº 1.901, de 29/11/1991 com o objetivo de proteger a Mata Atlântica, preservando a cobertura vegetal, as nascentes dos rios e riachos, além da fauna. O PEST é o único dentre as unidades de conservação da região metropolitana do Rio de Janeiro, que nasceu da vontade popular, por meio de movimentos comunitários organizados. Abrange uma área aproximada de 2.400 hectares, incluindo uma parte marinha de 1.700 metros mar adentro. A Serra da Tiririca apresenta cobertura vegetal correspondente ao domínio da Mata Atlântica, do tipo floresta ombrófila densa, sendo classificada como Mata Atlântica Baixo-Montana ou Submontana. Em 10/10/1992 a Serra da Tiririca foi homologada pela UNESCO como parte integrante da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, um reconhecimento internacional da importância dos ecossistemas que abriga. Apesar da importância do remanescente de Mata Atlântica e de ser reconhecido internacionalmente como Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, o Parque Estadual da Serra da Tiririca encontra-se muito ameaçado pela especulação imobiliária por localizar-se em áreas valorizadas (Barros, 2008).

O Parque Estadual da Pedra Branca (PEPB), criado em 1974, está situado na zona Oeste do município do Rio de Janeiro e está cercado por 17 bairros. É considerada uma das maiores reservas florestais em área urbana do mundo, com seus 12.393 hectares e cerca de 80 Km de perímetro, totalmente inseridos no município. As matas e os mananciais hídricos encontrados dentro dos limites dessa área protegida ajudam a

amenizar o clima da região, conhecida pelo forte calor, principalmente na vertente norte, melhorando a qualidade de vida dos moradores do entorno. Em seu interior é possível encontrar diversas espécies nativas de flora e fauna, algumas ameaçadas de extinção (INEA, 2013).

O município de Rio Claro está localizado na região do Médio Paraíba no estado do Rio de Janeiro, ocupando uma área de 834,691 km². Sua população aferida em 2010 contava com 17.425 habitantes apresentando densidade demográfica de 20,68 hab/km². O início do município de Rio Claro se deve ao incentivo à agricultura, devido à queda na atividade de mineração e ampliação da população da corte. A produção de café se estruturou utilizando grandes extensões de terra e trabalho escravo, marcando o início da produção em larga escala do café da região de Rio Claro (IBGE, 2010).

Niterói é um município da região metropolitana do Rio de Janeiro com população estimada em 499.479 habitantes, segundo dados do IBGE de 2016. Compreende uma área de 129,3 km² e possui o mais elevado índice de desenvolvimento humano municipal do Rio de Janeiro (Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil, 2010). É considerado um dos principais centros financeiros e comerciais do estado do Rio de Janeiro (IBGE, 2010).

O município de São Gonçalo também faz parte da região metropolitana do Rio de Janeiro, sendo considerado o segundo município mais populoso do estado. Sua população é de 1.044.058 habitantes com densidade demográfica de 4.190 habitantes/km² (IBGE, 2016). Possui um vasto setor comercial com importantes fábricas, produção de diferentes produtos agrícolas e muitas empresas de comércio e prestação de serviço (<http://www.saogoncalo.rj.gov.br/>).

São Pedro da Serra é o sétimo distrito pertencente ao município de Nova Friburgo, tendo, atualmente, cerca de três mil habitantes. No entanto, estima-se que possua população flutuante adicional em determinadas épocas, devido ao turismo, de cerca de mil pessoas. A região é montanhosa e está situada em área de Mata Atlântica, apresentando temperaturas que variam entre 6 e 32°C. O distrito descobriu que possui vocação turística, o que vem permitindo o desenvolvimento de uma estrutura de serviços específicos, valorizando a gastronomia, o artesanato local e os meios de hospedagem disponibilizados (<http://novafriburgo.rj.gov.br/nova-friburgo/dados-gerais>).

As coletas dos materiais fecais dos roedores, marsupiais e do tatu foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz em diferentes pontos do estado do Rio de Janeiro (Município de Rio Claro e Sumidouro, PEPB, CFMA, PEST), os répteis, primatas não

humanos, patos e guaxinins em parceria com o Zoológico do Rio de Janeiro, além de outras amostras de primatas provenientes do ICTB-Fiocruz. Todos os animais utilizados neste estudo estavam de acordo com as diretrizes definidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Brasil (LW5/16; LW - 066/08; LW - 049/08, LW 81/12, LW -39/14). Os animais silvestres foram capturados sob a autorização do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade e Conservação do Governo do Brasil (ICMBIO, número de licença 13373 e 46934-1) e do Instituto de Meio Ambiente do Estado do Rio de Janeiro (INEA, número da licença 020/2011).

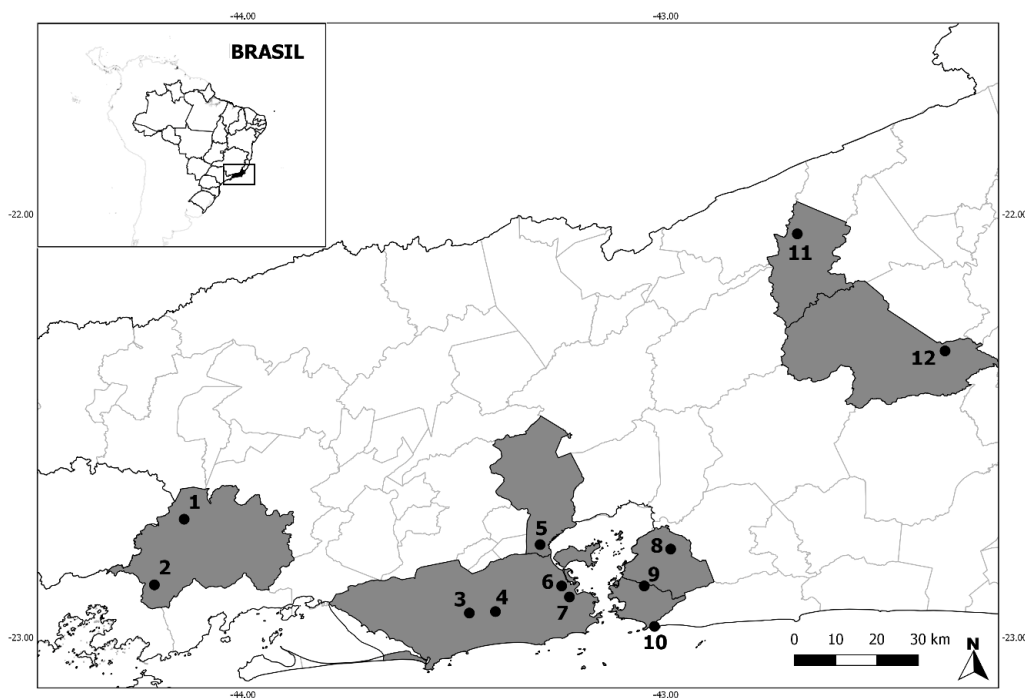


Figura 4: Mapa do estado do Rio de Janeiro com os pontos de coleta do presente estudo

- 1 - Município de Rio Claro-RJ. Localidade Morro do Estado
- 2 - Município de Rio Claro-RJ. Localidade Lídice
- 3 - Município do Rio de Janeiro-RJ. Localidade Parque Estadual Pedra Branca (PEPB)
- 4 - Município do Rio de Janeiro-RJ. Localidade Campus Fiocruz Mata Atlântica (CFMA)
- 5 - Município de Duque de Caxias-RJ. Localidade CAPS Duque de Caxias
- 6 - Município do Rio de Janeiro-RJ. Localidade Instituto Científico e Tecnológico de Biomodelos da Fiocruz (ICTB)
- 7 - Município do Rio de Janeiro-RJ. Localidade Zoológico do Rio de Janeiro (RioZoo)
- 8 - Município de São Gonçalo-RJ.
- 9 - Município de Niterói-RJ.
- 10 - Município de Niterói-RJ. Localidade Parque Estadual da Serra da Tiririca (PEST)
- 11 - Município de Sumidouro-RJ.
- 12 - Município de Nova Friburgo-RJ. Localidade distrito de São Pedro da Serra-RJ (SPS)

A captura e coleta dos outros animais foram feitas juntamente com a coorientadora do presente estudo, a Dra. Helena Lucia Carneiro Santos, em diferentes cidades e municípios do RJ. As amostras de suínos foram coletadas em chiqueiros individuais durante monitoramento dos animais. Logo após a defecação, o material fecal era cuidadosamente recolhido e acondicionado em frascos plásticos para serem transportados para o laboratório. Quanto à amostragem de baratas do estudo, as mesmas foram coletadas, manualmente, através de buscas ativas em redes de esgoto e, posteriormente, dissecadas para a obtenção do conteúdo intestinal, um dia após a coleta. As aves foram confinadas por alguns minutos até defecarem em grades de ferro forradas com plástico transparente, possibilitando a coleta das fezes. A cada ave colocada na gaiola era feita a limpeza do plástico com álcool 70%, a fim de não contaminar a nova amostra com o material fecal anterior (Figura 5).



Figura 5: Coleta de material fecal das aves

*Jaula de grade coberta por um plástico no fundo para coleta das fezes e posterior higienização

4.1 Procedimentos laboratoriais

4.1.1 Preparo das amostras fecais e análise através da microscopia ótica

Quando necessário, no caso de fezes solidificadas ou com grande concentração de detritos fecais (fibras alimentares, sementes, etc), a amostra foi homogeneizada e diluída em tampão fosfato-salino (150 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.2) e filtradas em recipiente descartável contendo uma gaze sobre o mesmo. O material fecal processado e filtrado foi acondicionado em tubos plásticos em temperatura ambiente. Posteriormente, era retirada uma alíquota deste sedimento e colocada entre lâmina e lamínula para a observação em microscópio ótico com aumento de 400X. No entanto, para a confirmação da positividade, todas as amostras foram inoculadas para cultivo *in vitro*.

4.1.2 Cultivo *in vitro* das amostras fecais

Todas as amostras de fezes foram inoculadas em meio *Pavlova* (1,29 g/L de fosfato de sódio dibásico, 0,42 g/L de fosfato de potássio monobásico, 7,27 g/L de cloreto de sódio e 1,46 g/L de extrato de levedura) suplementado com 10% de soro bovino inativado, 0,2 ml de penicilina-estreptomicina (500 µg/mL), além de 20 µL de amido de arroz e incubadas a 37 °C. A positividade das amostras de cultura de *Blastocystis* sp. foi verificada através da microscopia de luz padrão nos primeiros 15 dias de incubação em intervalos de 2 a 3 dias. Quando observadas as formas evolutivas do parasito, alíquotas da cultura de *Blastocystis* sp. foram congeladas a -20°C para a caracterização molecular. Algumas amostras positivas foram criopreservadas para serem depositadas na Coleção de Protozoários da Fiocruz (COLPROT, www.colprot.fiocruz.br) para realização de estudos futuros.

4.1.3 Caracterização molecular dos isolados

A partir das amostras positivas para *Blastocystis* sp. no cultivo, foi realizada a extração de DNA utilizando o kit QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, Calif), seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras positivas foram submetidas à amplificação de um fragmento do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp., seguindo o protocolo descrito por Santin e colaboradores (2011). Para os demais alvos, o gene da menor subunidade do RNA ribossômico da organela mitocôndria-like (MLO-DNAr) e o ITS1-2, foram selecionadas, randomicamente, aproximadamente 10 amostras de cada subtipo previamente caracterizadas pelo alvo SSU-RNAr para a identificação com estes alvos, seguindo condições descritas por Poirier e colaboradores (2014) e Villalobos e colaboradores (2014), respectivamente. No entanto, embora previamente descritas, foram feitas novas padronizações da concentração de MgCl₂ e gradientes de temperatura, com o intuito de adaptar as condições do laboratório (Tabela 3).

Amplificação de sequência parcial do gene SSU-RNAr: a reação de PCR foi realizada seguindo o protocolo previamente descrito por Santin e colaboradores (2011), utilizando um volume final de 50 µL e cada reação continha 10 mM de TrisHCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 10 pmol de iniciador, 1,5 U de TaqDNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,05% de albumina de soro bovino (BSA) e 5 µL de amostra de DNA alvo. As etapas do ciclo foram compostas por um passo inicial de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 54°C por 30 s e 72 °C durante 2 min, além da etapa de extensão final a 72 °C por 7 min.

Amplificação de sequência parcial do gene MLO-DNAr: para cada reação seguindo o protocolo descrito por Poirier e colaboradores (2014), com volume final de 50 µL continha 10 mM de TrisHCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 10 pmol iniciador, 1,5 U de TaqDNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,05% de BSA e 5 µL de amostra de DNA. O processo de ciclagem consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, 56°C por 45 s, 72 °C por 45 s e uma etapa de extensão final por 7 min a 72°C.

Amplificação de sequência parcial do ITS1-2: cada reação de PCR, previamente descrita por Villalobos e colaboradores (2014), continha 10 mM de TrisHCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 10 pmol de iniciador, 1,5 U de TaqDNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,05% de BSA e 5 µL de amostra de DNA. Em relação às etapas de ciclagem, a primeira desnaturação a 94 °C por 5 min foi seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 30 s, finalizando com uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min.

Tabela 3: Os diferentes alvos moleculares utilizados no estudo, as respectivas sequências de ambos os iniciadores (oligonucleotídeo direto e reverso), a temperatura de *melting* e o tamanho do fragmento amplificado

Alvos	Iniciadores	Tm	Tamanho do fragmento amplificado	Referência
SSU-RNAr	D: GGAGGTAGTGACATAAATC	53° C	~500 pb	Santin et al., 2011
	R: TGCTTTCGCACTTGTTTCATC	56,4° C		
MLO-DNAr	D: GACATTGATAGACGAAAG	49,3° C	~440 a 536pb	Poirier et al., 2014
	R: GTAGCACATGTGTAGCCC	56,3° C		
ITS1-2	D: GAAGGTGAAGTCGTAACAAG	56,4° C	~530 a 620	Vilalobos et al., 2014
	R: CAGCAGGTCTTCTTRCTTGA	56,4° C a 58,4° C		

*D: oligonucleotídeo direto; R: oligonucleotídeo reverso; Tm: Temperatura de *melting*

Além disso, outro protocolo de PCR foi empregado utilizando iniciadores específicos para cada subtipo, como proposto por Yoshikawa e colaboradores (2004) (Tabela 4). Cada reação continha 10 mM de TrisHCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 2 (ST1) e 3 (ST3) mM de MgCl₂, 200 µM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 10 pmol de iniciador, 1,5 U de TaqDNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,05% de BSA. O processo de ciclagem consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 95°C durante 40 s, 58° C por 30 s, 72°C por 30 s e uma etapa de extensão final por 7 min a 72°C. A concentração de MgCl₂ estabelecida para ST1 e ST3 foi 2 mM e 3 mM, respectivamente, e a temperatura de anelamento para ambos foi 58° C. Todavia, é importante mencionar que não conseguimos realizar a padronização dos iniciadores ST2, ST4 e ST5. Em relação a ST6 e ST7, não foi feita a

tentativa de padronização, tendo em vista a ausência de isolados identificados com esses dois subtipos.

Tabela 4: Conjunto de iniciadores utilizados no estudo, as respectivas seqüências dos iniciadores (oligonucleotídeo direto e reverso), a temperatura de *melting*, o tamanho do fragmento amplificado e a correspondência dos STs

Subtipos (2004)	Subtipos (2007)	Tamanho do fragmento amplificado	Tm	Seqüência dos Iniciadores (D: direto e R: reverso)
1	1	351	58,4° C	D: GAAGGACTCTCTGACGATGA
			53,8° C	R: GTCCAAATGAAAGGCAGC
2	5	650	55° C	D: ATCAGCCTACAATCTCCTC
			49,9° C	R: ATCGCCACTTCTCCAAT
3	3	526	54,3° C	D: TAGGATTTGGTGTGTTGGAGA
			58,4° C	R: TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAG
4	7	338	59,2° C	D: GCATCCAGACTACTATCAACATT
			55,4° C	R: CCATTTTCAGACAACCACTTA
5	6	704	60,1° C	D: TGTTCTTGTGTCTTCTCAGCTC
			56,4° C	R: TTCTTTCACACTCCCCTCAT
6	4	317	59,5° C	D: GTGGGTAGAGGAAGGAAAACA
			59,2° C	R: GAACAAGTCGATGAAGTGAGAT
7	2	487	60,1° C	D: GTCTTTCCTGTCTATTCTGCA
			56,4° C	R: AATTCGGTCTGCTTCTTCTG

*D: oligonucleotídeo direto; R: oligonucleotídeo reverso; Subtipos (2004): nomenclatura dos subtipos de *Blastocystis* sp. utilizada por Yoshikawa et al. (2004); Subtipos (2007): nomenclatura dos subtipos de *Blastocystis* sp. a partir de consenso por Stensvold et al., (2007)

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 1,5% em tampão TBE (1M Tris-borato, 0,01 M EDTA, pH 8,4), corados com Gelred (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e fotografados sob transiluminação UV. Os produtos amplificados foram purificados, utilizando o kit Wizard® SV (Promega, Madison, WI, EUA) e sequenciados em ambas as direções usando o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA) no sequenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As seqüências bidirecionais foram montadas e editadas utilizando o programa SeqMan (pacote de software DNASTAR, DNASTAR Inc., Madison, WI, EUA). As seqüências obtidas foram comparadas com as previamente depositadas no banco de dados Genbank, utilizando a ferramenta BLASTN do servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Além disso, foram construídos alinhamentos múltiplos de seqüências através do algoritmo ClustalW do software MEGA versão 6.0 (Tamura et al., 2013).

A partir do alinhamento das sequências consenso do SSU-RNAr, foram realizadas análises filogenéticas por Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB), utilizando os programas PHYML (Guindon & Gascuel, 2003) e MrBayes (Huelsenbeck et al., 2005), respectivamente, com o intuito de explorar as relações entre os táxons. O grupo externo utilizado foi *Proteromonas lacertae* (comensal de répteis e anfíbios) considerando a sua posição intimamente relacionada à *Blastocystis* sp. em estudos anteriores (Silberman et al., 1996).

Para a análise de MV, os valores de *bootstrap* foram calculados pela análise de 1.000 repetições, com o intuito de avaliar a veracidade dos ramos e a topologia da árvore. Para a análise de IB, foram realizadas duas corridas, sendo cada uma com quatro cadeias de *Markov*. As quatro cadeias foram executadas por 10^7 gerações e amostradas a cada 100^{a} geração. A convergência das duas cadeias foi avaliada verificando a média do desvio padrão das frequências menores que 0,01. Posteriormente, foram descartadas 25% das árvores filogenéticas amostradas inicialmente e a topologia da árvore consenso foi estimada a partir dos valores de probabilidade posterior.

Além disso, com o intuito de avaliar a variabilidade genética existente dentro e entre os diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. foram realizadas análises pelo método de distância genética par-a-par entre sequências obtidas no estudo e sequências do Genbank. Os resultados foram plotados em gráficos. Para cada subtipo (ST1-ST9), uma sequência do Genbank foi usada como referência (Tabela 5), com a finalidade de comparar a distância genética entre ela e as demais sequências.

Tabela 5: Sequências obtidas no Genbank utilizadas como referência para construção dos gráficos de distância genética par-a-par

Subtipo	Sequência Referência (código do Genbank)
1	HQ641598.1
2	KU147358.1
3	HQ641653.1
4	HQ641621.1
5	KF410609.1
6	HQ641658.1
7	KF447172.1
8	KF002528.1
9	AF408426.2

E, a fim de compreender a variabilidade genética entre as diferentes cópias do SSU-RNAr de um isolado do ST7 (Poirier et al., 2014), as 17 cópias (KF447157.1 - KF447173.1) completas do gene em questão foram também analisadas por este método, além de compararmos também as diferentes regiões descritas por Scicluna e colaboradores (2006), Parkar e colaboradores (2010) e Santin e colaboradores (2011). As análises foram executadas no programa RStudio3.4.4 utilizando o pacote *Ape* e um *script* previamente desenvolvido pela Dra. Silvia Justi do Walter Reed Biosystematics Unit Smithsonian Institute MSC.

Os modelos de substituição de nucleotídeo foram selecionados baseados no *Akaike Information Criterion* (AIC) para MV e *Bayesian Information Criterion* (BIC) para BI, ambos no programa jModeltest (Posada et al., 2004). As três reconstruções filogenéticas (Caxias, Sumidouro e Animais) e as análises de distância genética no estudo foram conduzidas utilizando o modelo HKY (Hasegawa-Kishino-Yanov et al., 1985).

Para essas análises foram incluídas algumas sequências publicadas no Genbank (Anexo 9.1).

V. RESULTADOS

5.1. Cultivo de fezes

Do total de 848 amostras fecais examinadas, sendo 474 de humanos e 374 de animais, 309 (36,4%) apresentaram alguma forma evolutiva de *Blastocystis* sp. na cultura. Das amostras positivas, 62,8% (194/309) eram de hospedeiros humanos. Comparando ambas as populações estudadas, a prevalência foi maior no município de Sumidouro, com 44,2% contra 35,5% na população estudada de Caxias (Tabela 6). Somando ambas as populações, 40,9% (194/474) dos indivíduos examinados estavam positivos para *Blastocystis* sp.

Tabela 6: Resultado da pesquisa de *Blastocystis* sp. por cultivo de amostras fecais de humanos

Populações estudadas	Amostras examinadas	Amostras positivas
Caxias	180	64 (35,5%)
Sumidouro	294	130 (44,2%)
Total	474	194 (40,9%)

Quanto aos hospedeiros animais, 30,7% (115/374) dos animais estavam positivos para este parasito. No geral, a prevalência observada foi de 100% em tatu (1/1), 81% em marsupiais (21/26), 77% em suínos (30/39), 69% em répteis (9/13), 64% em roedores (7/11), 37% em primatas não humanos (33/89), 21% em aves (12/57) e 2% em baratas (2/96). O único grupo, do qual todas as amostras foram negativas foi o dos felinos (Tabela 7).

Tabela 7: Resultado da pesquisa de *Blastocystis* sp. por cultivo de amostras fecais de animais

Animais	Amostras examinadas	Amostras positivas
Aves	57	12 (21%)
Baratas	96	2 (2%)
Felinos	40	0
Guaxinim	2	0
Jabutis	13	9 (69%)
Marsupiais	26	21 (81%)
Primatas não humanos	89	33 (37%)
Roedores	11	7 (64%)
Suínos	39	30 (77%)
Tatu	1	1 (100%)
Total	374	115(30,7%)

5.2. Identificação dos subtipos de *Blastocystis* sp. através da PCR/sequenciamento empregando o alvo SSU-RNAr

Todos os isolados de *Blastocystis* sp. foram analisados com o alvo em questão e os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 8:

Tabela 8: Resultado da PCR/sequenciamento com o alvo SSU-RNAr das populações humanas e de animal estudadas

Populações estudadas	Amostras não amplificadas	Sequências de boa qualidade	Sequências descartadas	Picos duplos no eletroferograma
Caxias	0	55 (86%)	0	9 (14%)
Sumidouro	34 (26,1%)	85 (64,9%)	7 (5,4%)	4 (3,1%)
Animais	34 (29,6%)	52 (45,2%)	20 (17,4%)	9 (7,8%)
Total	68 (22%)	192 (61,9%)	27 (8,7%)	22 (7,1%)

*Sequências de boa qualidade: picos definidos no eletroferograma; Sequências descartadas: sequências curtas ou com múltiplos picos irregulares com a mesma altura ou alturas diferentes, sobrepostos uns aos outros

A partir da análise deste alvo, foi possível a identificação quanto ao subtipo de *Blastocystis* sp. em 200 amostras positivas, destas 84 eram provenientes do município de Sumidouro, 55 de Duque de Caxias, 52 de hospedeiros animais e nove amostras com infecção mista provenientes da população de Caxias, nas quais foi possível a identificação de ambos os ST1 e ST3. No geral, o subtipo mais prevalente do estudo foi o ST3, seguido pelo ST1, ST2, ST8, ST5 e ST4, além de um isolado (ID 210), que não foi possível detectar o subtipo de acordo com os STs já conhecidos.

5.2.1. Identificação dos subtipos de *Blastocystis* sp. através da PCR/sequenciamento dos isolados de hospedeiros humanos

5.2.1.1. População humana do CAPS de Duque de Caxias (artigo publicado no anexo 9.3)

Das 180 amostras examinadas pelo método de cultivo de fezes, 64 (35,5%) foram positivas para *Blastocystis* sp. na população estudada. Do total de amostras positivas foram geradas 55 sequências de DNA de 400 pb, o que permitiu a identificação de infecção simples nessas amostras, ou seja, por apenas um único subtipo. Os percentuais de identidade no BLAST destas sequências obtidas variaram de 97% a 100% quando comparadas as sequências de *Blastocystis* sp. previamente publicadas no Genbank. Desta forma, foi possível a identificação de quatro subtipos, no qual o ST3 foi o mais prevalente, seguido pelo ST1, ST2 e ST4 (Tabela 9). Nove amostras (9/64) apresentaram picos duplos no eletroferograma, indicando a presença de infecção mista, por mais de um subtipo. Nestas amostras foram detectados os ST1 e ST3 através da PCR utilizando os iniciadores subtipos específicos.

Ambas as abordagens filogenéticas (MV e IB) utilizando as 55 sequências de DNA e 21 sequências do Genbank agruparam-se formando quatro grupos monofiléticos com altos valores de suportes estatísticos (*bootstrap* e probabilidade posterior) (Figura 6). Mais precisamente, 23 sequências formaram um grupo correspondente ao ST1, quatro sequências ao ST2, 27 sequências ao ST3 e uma sequência formou um clado que corresponde ao ST4. Os ST1 e ST2 compartilham o mesmo ancestral comum, assim como o ST4 e ST8 também apresentam um ancestral comum. Os subtipos ST6, ST7 e ST9 estão relacionados entre si.

Além disso, através da formação de pequenos clados com alto suporte estatístico no interior dos clados dos subtipos 1 e 3, foi possível observar a existência de variabilidade genética intra-subtipos.

As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no Genbank sob os números de acesso KU892222–KU892276.

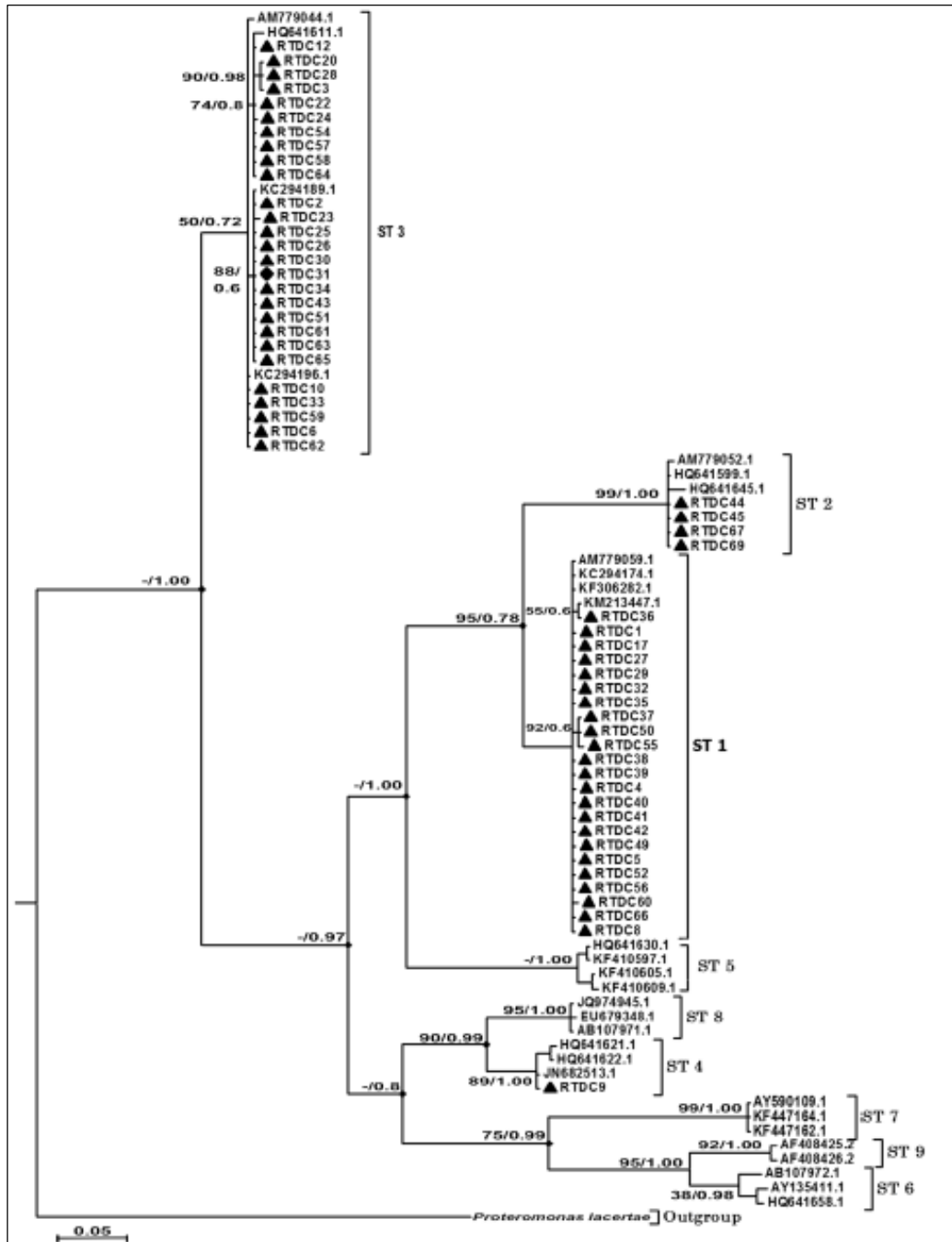


Figura 6: Arvóre filogenética de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (BI) baseada nas sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados da população humana de Caxias, RJ (▲). Os números ao longo dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap*/valores de probabilidade posterior (valores acima de 50% são mostrados).

5.2.1.2. População humana da região rural de Sumidouro (artigo publicado no anexo 9.4)

No total, 294 indivíduos residentes da região de Sumidouro participaram do estudo. Destes, 130 (44,2%) estavam infectados por *Blastocystis* sp., sendo obtidas 85 sequências de DNA de 437 pb. O sequenciamento parcial do gene SSU-RNAr revelou a presença dos ST1 (n=23), ST2 (n=23), ST3 (n=29), ST4 (n=3), ST8 (n=6), além de uma amostra (ID 210), cuja identificação quanto ao subtipo não foi possível (Tabela 9). O subtipo mais prevalente foi o ST3 (34,5%), seguido pelo ST1 e ST2 (mesma prevalência – 27,4%), ST8 (7,1%), ST4 (3,6%). As sequências obtidas neste estudo apresentaram valor de identidade na ferramenta BLAST variando de 98% a 100%, em contrapartida a ID 210 teve valor de identidade igual a 93% com uma sequência identificada como ST7 (código de acesso: AB107973.1). Ademais, sete sequências desta população foram descartadas por não apresentarem qualidade adequada no sequenciamento e 34 amostras não amplificaram, além de quatro apresentarem picos duplos no eletroferograma, o que sugere a infecção mista. É importante ressaltar que a amplificação com os iniciadores ST-específicos também foi empregada nas amostras com picos duplos desta população, no entanto não se obteve sucesso na amplificação.

A topologia de ambas as árvores filogenéticas (MV e IB) construídas com as sequências desta população mostrou a infecção pelos subtipos 1, 2, 3, 4, 8, além de um ST não identificado, tendo em vista que o isolado ID 210 não agrupou a nenhum clado de subtipo conhecido, embora esteja evolutivamente mais próximo do ST7 (Figura 7). Todos os outros isolados alocaram aos seus respectivos clados de subtipos com altos valores de suporte estatístico. É importante ressaltar que foram utilizadas sequências do Genbank previamente identificadas como ST1-ST9 para a construção das árvores filogenéticas. Ademais, é possível observar diversidade genética intra-subtipos nos ST1, ST2 e ST3, devido à formação de pequenos clados no interior destes três grupos. Todas as sequências obtidas desta população de estudo foram depositadas no Genbank sob os números de acesso KX523972 - KX524055 e MG309719.

Tabela 9: Subtipos de *Blastocystis* sp. identificados em ambas as populações humanas estudadas

Hospedeiro	Localidade	Subtipos de <i>Blastocystis</i> (ST)						
		ST1	ST2	ST3	ST4	ST8	Novel-ST	Picos duplos no eletroferograma
Humano	Caxias	23	4	27	1	0	-	9*
	Sumidouro	23	23	29	3	6	1	4
Total		46	27	56	4	6	1	13

* ST1 e ST3 identificados através da amplificação com os iniciadores STs específicos para cada ST

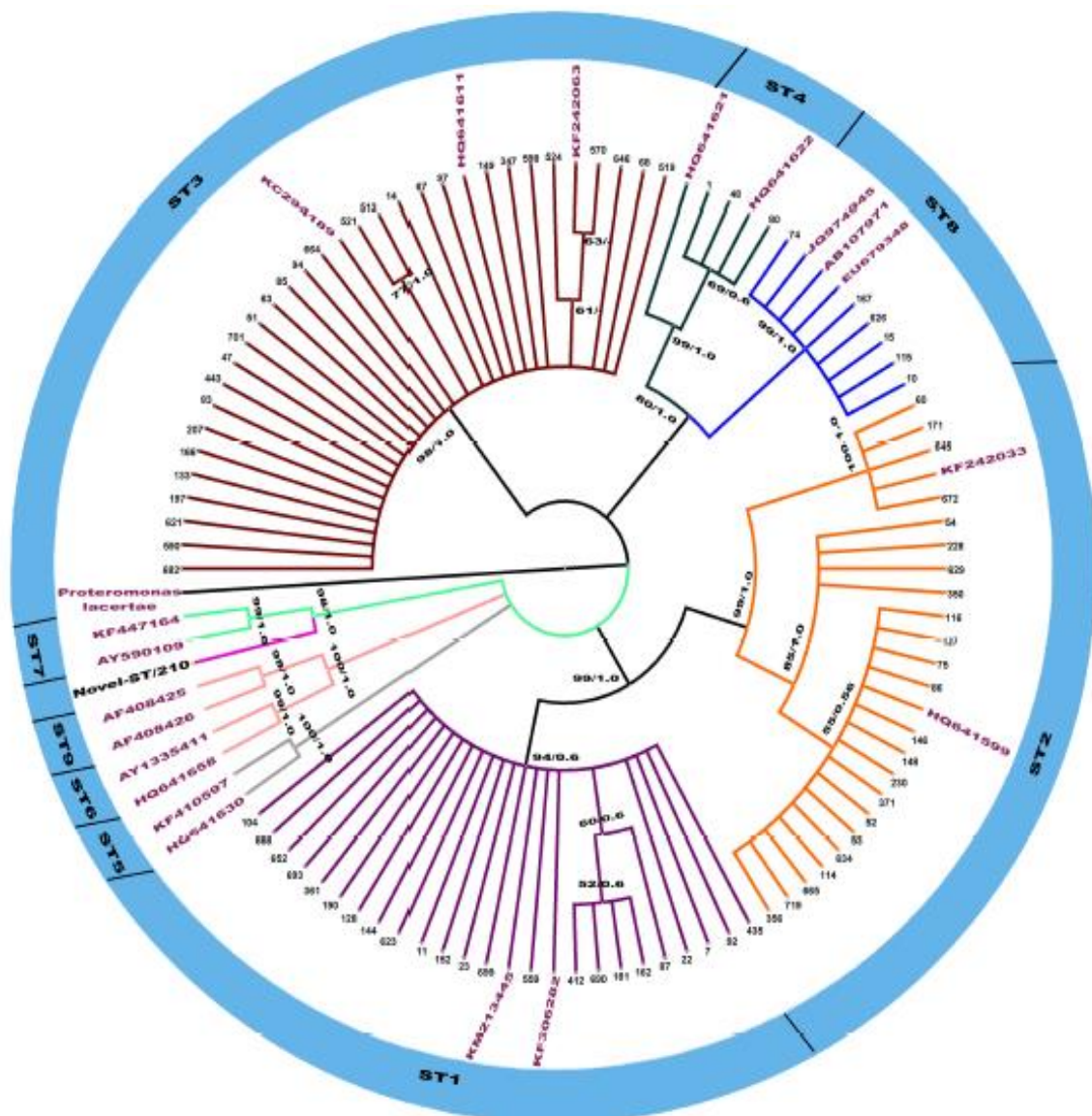


Figura 7: Arvore filogenética de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (BI) baseada nas sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados da população humana de Sumidouro, RJ. Os números ao longo dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap*/valores de probabilidade posterior (valores acima de 50% são mostrados).

5.2.2. Identificação dos subtipos de *Blastocystis* sp. através da PCR/sequenciamento dos isolados de hospedeiros animais

De um total de 374 amostras de fezes obtidas de 28 gêneros de diferentes animais e submetidas ao cultivo *in vitro*, 115 (34,4%) foram positivos para *Blastocystis* sp. (Tabela 10). No geral, a prevalência observada de infecções por este parasito foi de 100% em tatu (1/1), 81% em marsupiais (21/26), 77% em suínos (30/39), 69% em répteis (9/13), 64% em roedores (7/11), 37% em primatas não humanos (33/89), 21% em aves (12/57) e 2% em baratas (2/96). No entanto, 34 isolados não foram amplificados pelos iniciadores utilizados neste estudo, dos quais 13 eram de marsupiais, nove de répteis, quatro de PNHs, quatro de roedores, dois de suínos e dois de aves.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram depositadas na base do banco de dados do Genbank sob os números de acesso MG280720-MG280771. Foram obtidas 52 sequências de DNA de isolados de *Blastocystis* sp. de animais e seis subtipos foram identificados pela ferramenta BLAST e adicionalmente confirmados por análises filogenéticas (MV e IB).

O subtipo mais comum no estudo foi ST5 (28,8%), seguido de ST2 (21,1%), ST1 (19,2%) e ST8 (19,2%), ST3 (7,7%), ST4 (3,8%), além de nove amostras que apresentaram picos sobrepostos no eletroferograma sugerindo infecção mista (Tabela 10). As sequências obtidas mostraram valor de identidade na ferramenta BLAST, que variou de 97-100% com sequências depositadas no Genbank. Sete sequências apresentaram 99% de identidade e 42 apresentaram 100%. Apenas uma sequência de um isolado de PNH do Zoo Rio (ID = ZOO7) apresentou 97% de identidade e duas sequências, também de isolados de PNHs, sendo um do Zoo Rio (ID = ZOO6) e outra do ICTB (ID = AG149), apresentaram 98% de identidade.

Quanto à distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp., ST1, ST2, ST3 e ST8 foram identificados em primatas não humanos e em suínos foram identificados os ST1, ST4, ST5 e ST8. Além disso, foram encontrados ST3 e ST8 em duas espécies de roedores, ST1 e ST8 em gambás e ST8 na única amostra de tatu analisada. As aves estavam infectadas com *Blastocystis* ST1 e ST5 e ST4 foi identificado em uma barata. (Tabela 10).

Ambas as árvores filogenéticas (MV e IB) identificaram nove clados que corresponderam exatamente aos ST1 a ST9 e as sequências obtidas no estudo agruparam em clados dos ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 e ST8 com altos valores de *bootstrap* e

probabilidade posterior. Alguns isolados formaram pequenos clados no interior dos ST1, ST2, ST3 e ST5, indicando a existência de variabilidade intra-subtipos (Figura 8).

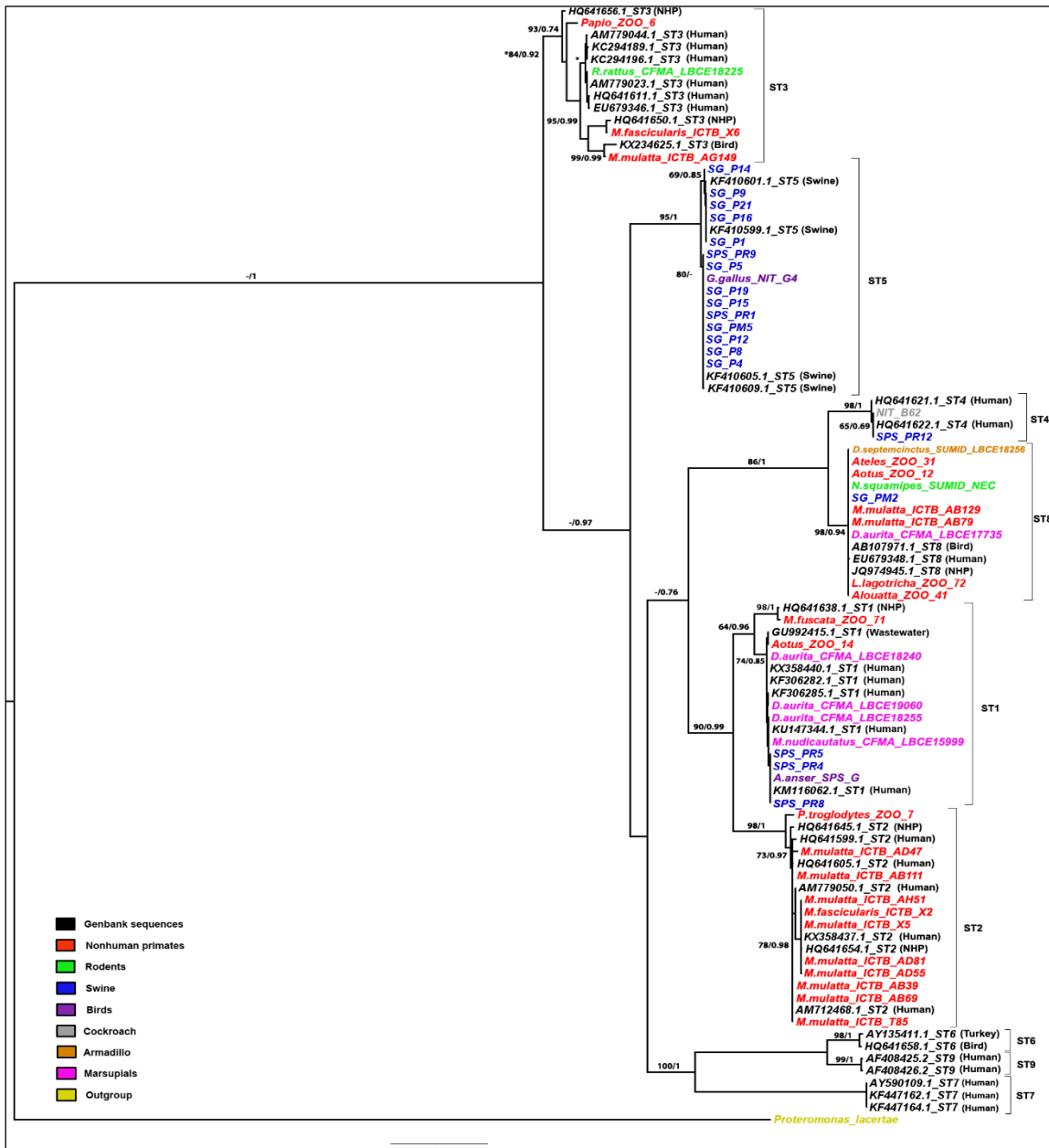


Figura 8: Arvore filogenética de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (BI) baseada nas sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados de animais de RJ. Os números ao longo dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap*/valores de probabilidade posterior (valores acima de 50% são mostrados).

Tabela 10: Subtipos de *Blastocystis* sp. identificados em animais

Hospedeiros	Local de coleta	Nome científico	N°	N° pos	Subtipos de <i>Blastocystis</i> (ST)						
					ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5	ST 8	IND
Primates não humanos	1	<i>Cebus apella xanthosternos</i>	3	0	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Macaca nemestrina</i>	1	0	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Ateles</i> sp	1	1	-	-	-	-	-	1	-
		<i>Chlorocebus</i> sp	2	0	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	2	0	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Lagothrix lagotricha</i>	2	1	-	-	-	-	-	1	-
		<i>Saguinus imperator</i>	6	0	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Papio</i> sp	3	1	-	-	1	-	-	-	-
		<i>Pan troglodytes</i>	1	1	-	1	-	-	-	-	-
		<i>Alouatta</i> sp	2	1	-	-	-	-	-	1	-
		<i>Macaca fuscata</i>	2	1	1	-	-	-	-	-	-
	<i>Aotus</i> sp	4	2	1	-	-	-	-	1	-	
	2	<i>Macaca mulatta</i>	30	18	-	9	1	-	-	2	-
<i>Saimiri sciureus</i>		10	0	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Macaca fascicularis</i>		20	7	-	1	1	-	-	-	3	
Guaxinim	1	<i>Procyon lotor</i>	2	0	-	-	-	-	-	-	
Roedores	3	<i>Akodon cursor</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	
		<i>Rattus rattus</i>	1	1	-	-	1	-	-	-	
	4	<i>Akodon cursor</i>	1	0	-	-	-	-	-	-	
		<i>Akodon montensis</i>	2	2	-	-	-	-	-	-	
		<i>Oligoryzomys nigripes</i>	1	0	-	-	-	-	-	-	
	5	<i>Nectomys squamipes</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	
		<i>Nectomys squamipes</i>	2	2	-	-	-	-	-	1	
		<i>Oligoryzomys nigripes</i>	1	0	-	-	-	-	-	-	
6	<i>Trinomys eliasi</i>	1	0	-	-	-	-	-	-		
Marsupiais	3	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	
		<i>Didelphis aurita</i>	10	9	3	-	-	-	-	1	
	7	<i>Didelphis aurita</i>	7	3	-	-	-	-	-	-	
4	<i>Didelphis aurita</i>	8	8	-	-	-	-	-	-		
Tatu	5	<i>Dasytus septemcinctus</i>	1	1	-	-	-	-	1	-	
Aves	8	<i>Gallus gallus</i>	12	1	-	-	-	-	1	-	
		<i>Anas domesticus</i>	4	1	-	-	-	-	-	-	
	1	<i>Anas domesticus / Cairina moschata</i>	40	9	-	-	-	-	-	2	
9	<i>Anser anser</i>	1	1	1	-	-	-	-	-		
Suínos	10	<i>Sus scrofa</i>	27	22	-	-	-	-	12	1	
	9		12	8	3	-	-	1	2		
Felinos	8	<i>Felis catus</i>	40	0	-	-	-	-	-		
Baratas	8	<i>Periplaneta americana / Blatella germanica</i>	60	2	-	-	-	1	-		
	11		36	0	-	-	-	-	-		
Répteis	1	<i>Chelonoidis</i> sp	13	9	-	-	-	-	-		
Total			374	115	10	11	4	2	15	10	

* 1: Zoológico do Rio de Janeiro; 2: Instituto de Ciência e Tecnologia de Biomodelos, Fiocruz; 3: Campus Fiocruz Mata Atlântica, Fiocruz; 4: Município de Rio Claro; 5: Município de Sumidouro; 6: Parque Estadual da Serra da Tiririca; 7: Parque Estadual da Pedra Branca; 8: Município de Niterói; 9: Distrito de São Pedro da Serra; 10: Município de São Gonçalo; 11: cidade do Rio de Janeiro; IND: sequências que apresentaram picos duplos no eletroferograma

5.3. Variabilidade genética *intra* e *inter* subtipos do alvo SSU-RNAr de *Blastocystis* sp.

Foram obtidos 14 gráficos de distância genética par-a-par entre os isolados obtidos no presente estudo e sequências do Genbank (Figura 9-22). Para cada gráfico construído, utilizou-se uma sequência do Genbank de cada um dos subtipos (ST1-ST9) como referência. E, além disso, a fim de tentar identificar a amostra 210 de Sumidouro, foi construído um gráfico utilizando a sequência 210 como referência comparando com as demais.

Ao analisar o gráfico correspondente a ST1, é possível observar que a distância genética intra-subtipo variou entre 5% e 10%. Quando comparado aos demais subtipos, esse percentual ficou acima de 10% para ST2 e 30% para ST7 (Figura 8). ST2 é o mais próximo, ao passo que ST7 apresenta a maior distância genética de ST1. A variabilidade genética intra-subtipo 2 é de 5%, enquanto que entre os subtipos variou em, aproximadamente, 10% (ST1) e 30% (ST7) (Figura 9). Quanto ao gráfico correspondente a ST3, a divergência genética entre as sequências do ST3 atinge quase 10%. A distância genética de ST3 para ST4 e ST8 é semelhante, estando entre 15% e 20%, sendo considerados os mais próximos. Em contrapartida, ST7 é o mais distante geneticamente (>30%) (Figura 10).

Analisando os gráficos correspondentes a ST4-ST9, a variabilidade genética intra-subtipos é inferior a 5%. ST4 difere de ST8 em aproximadamente 10%, assim como ST6 de ST9. Em contrapartida, ST7 está mais distante geneticamente, cerca de 30%, dos subtipos 4 e 8. Quanto a ST5, quando comparado aos demais subtipos, a distância genética variou entre, aproximadamente, 20% e 25%, com exceção da amostra 210 que diferiu em mais de 25% deste subtipo. No que concerne ST6, o subtipo mais distante geneticamente é ST3, além de alguns isolados de ST2. Em relação ao ST7, é importante destacar que a amostra 210 teve o dobro da distância genética das demais sequências de ST7 (Figura 11-16).

Ademais, ao avaliarmos o gráfico obtido comparando a sequência 210 com as outras sequências, a mesma diferiu em mais de 10% de ST7 e entre 25% e 40% dos demais subtipos (Figura 17). Em relação à análise realizada com as 17 cópias da sequência total do gene SSU-RNAr de ST7, observamos uma divergência genética entre elas maior que 1,5%. Além disso, quando comparamos os diferentes fragmentos do gene SSU-RNAr, frequentemente utilizados na literatura, foi possível observar diferenças nos percentuais

de variabilidade genética, compreendendo até 1% para a região “*barcode*” (Scicluna et al., 2006), >2% para a região desenhada por Parkar e colaboradores (2010) e 3,5% para Santin e colaboradores (2011) (Figura 19-22).

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp. usando como referência o ST1

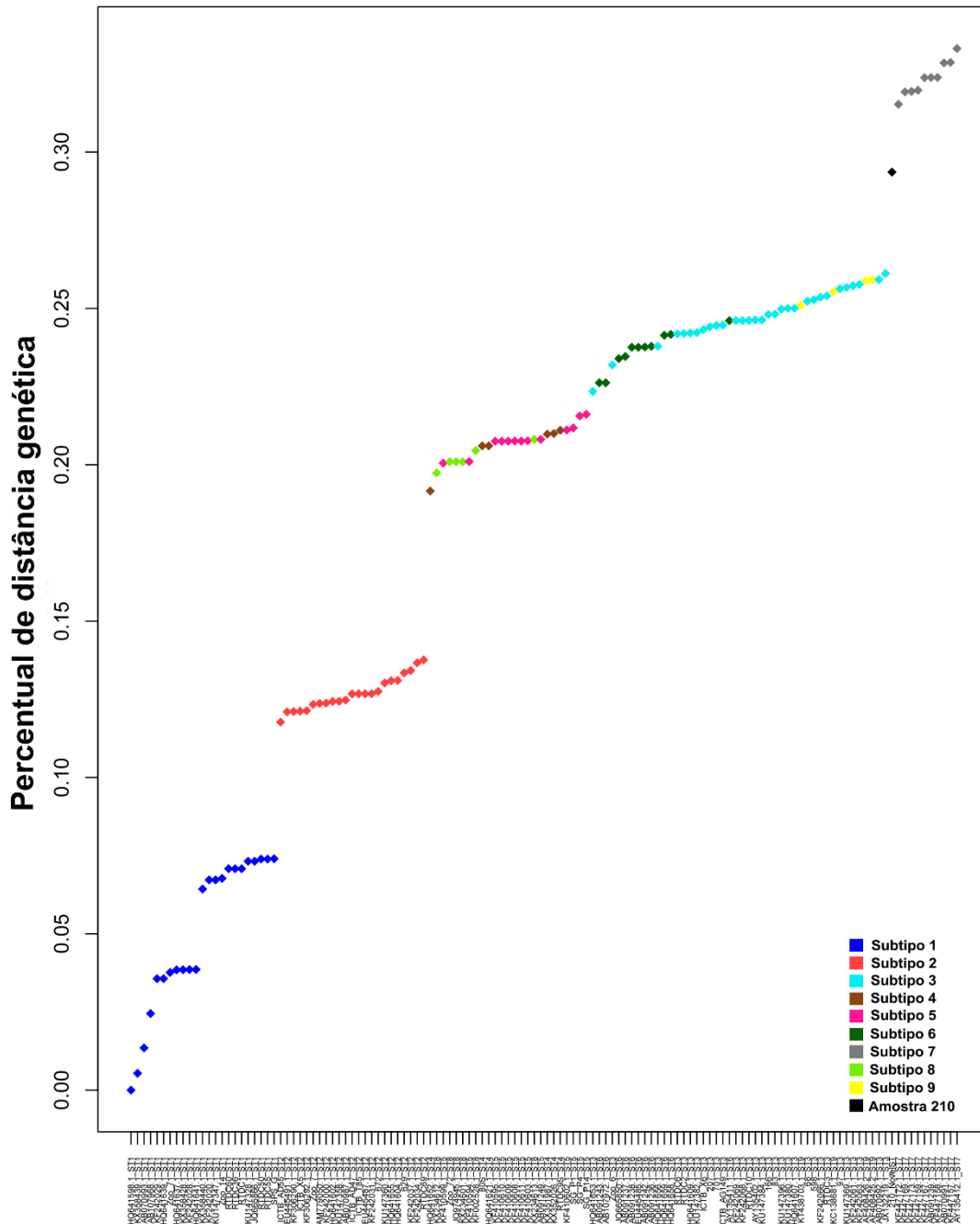


Figura 9: Gráfico de distância genética par-a-par do ST1

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp. usando como referência o ST2

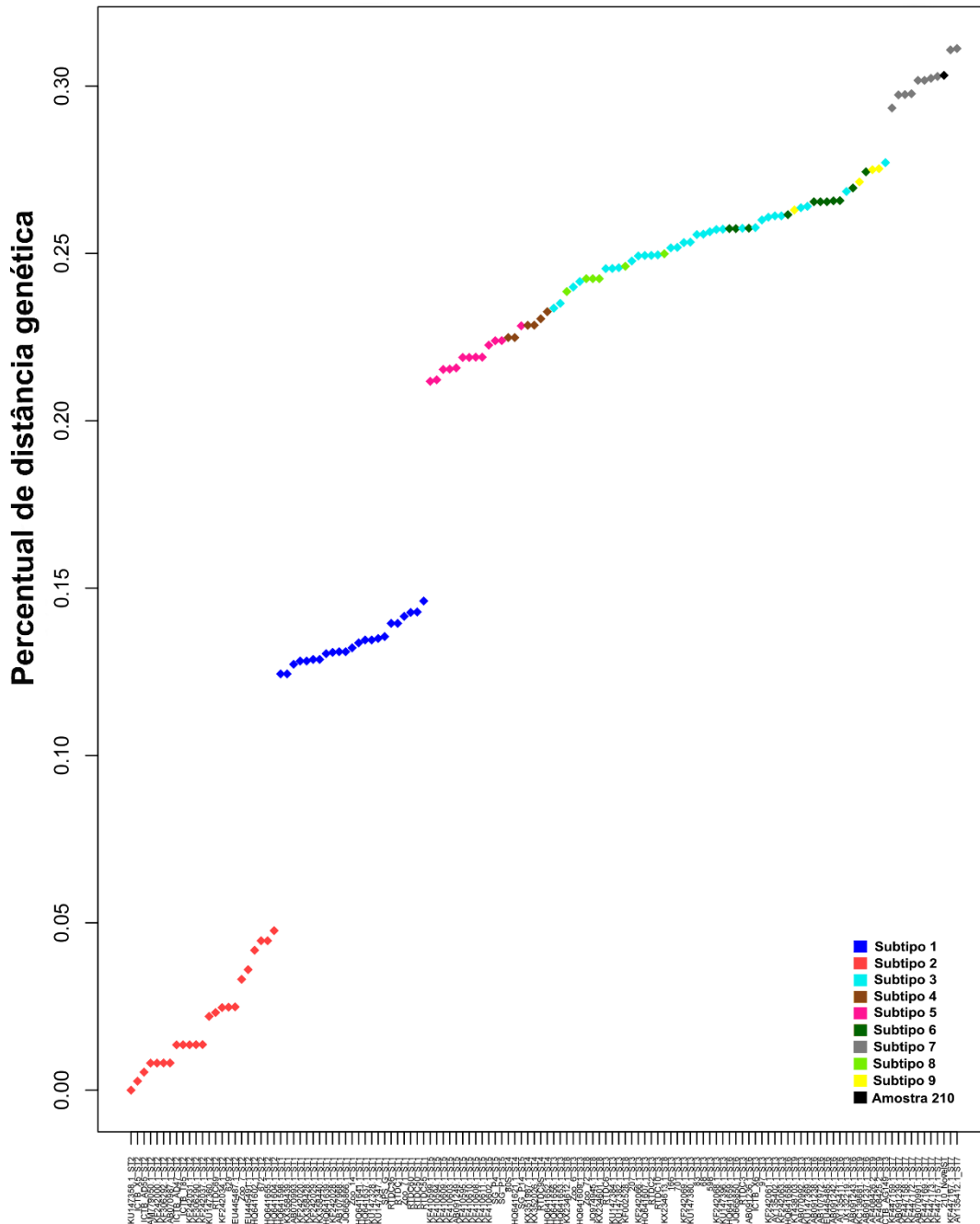


Figura 10: Gráfico de distância genética par-a-par do ST2

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNA de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp. usando como referência o ST3

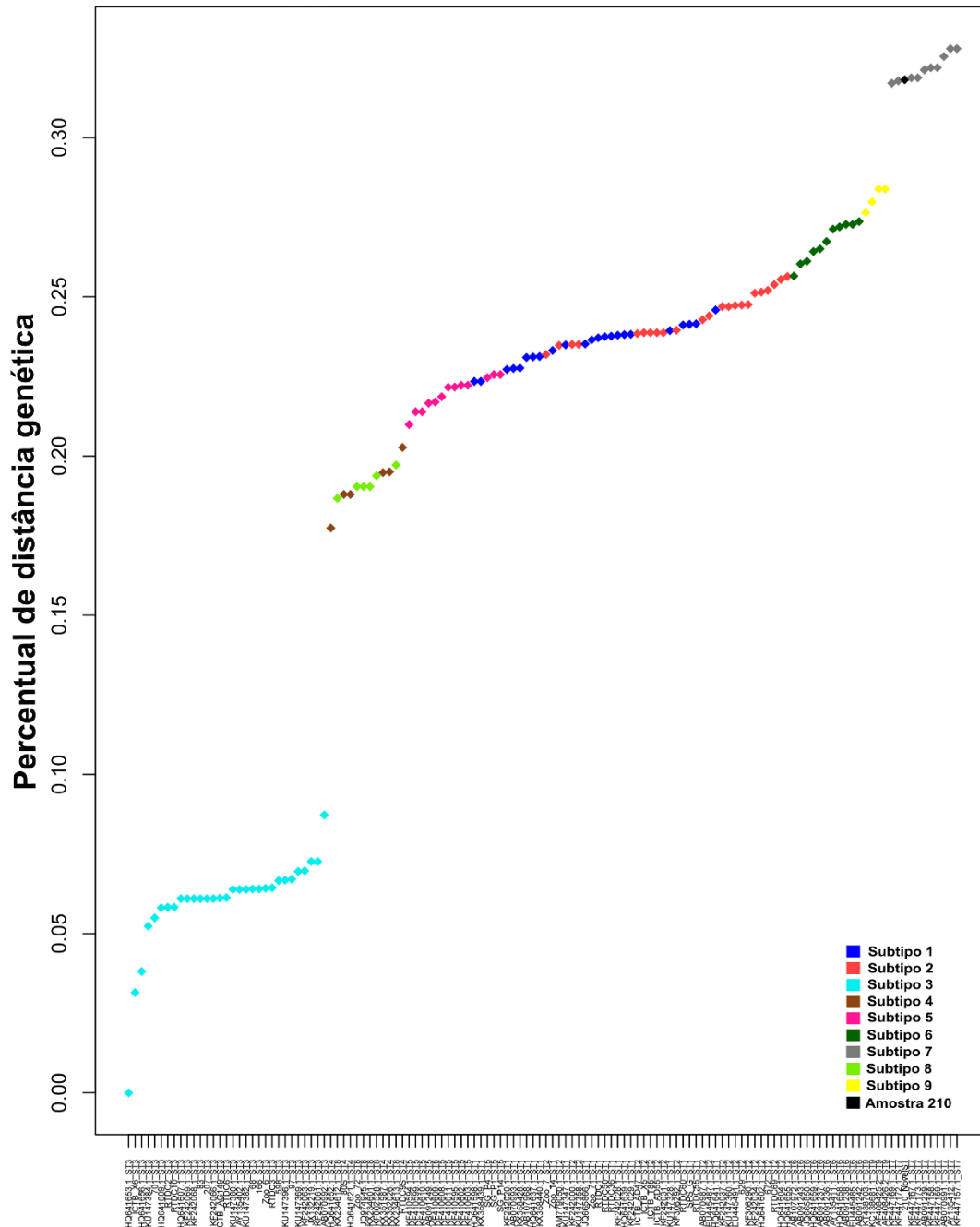


Figura 11: Gráfico de distância genética par-a-par do ST3

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp.usando como referência o ST4

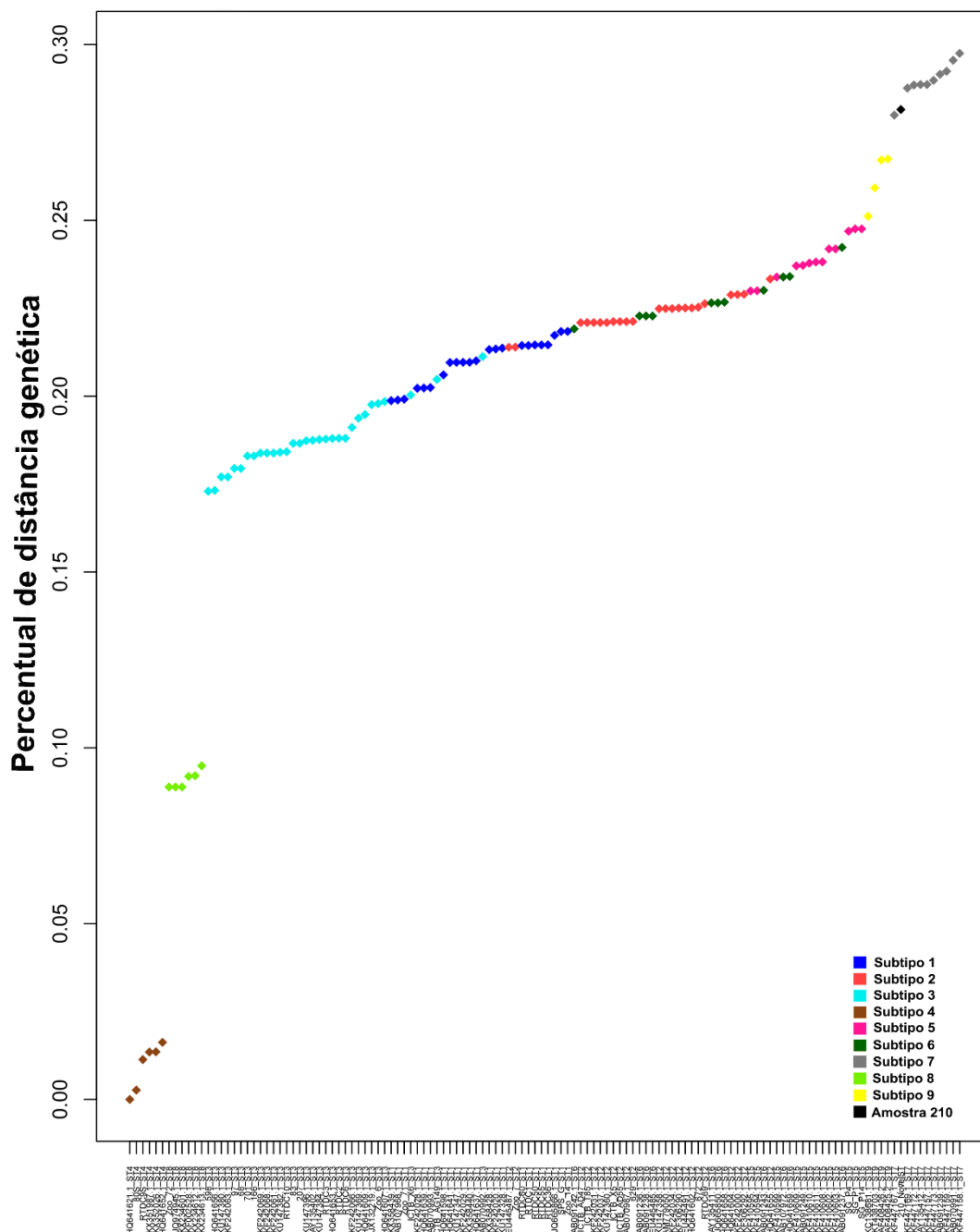


Figura 12: Gráfico de distância genética par-a-par do ST4

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp. usando como referência o ST5

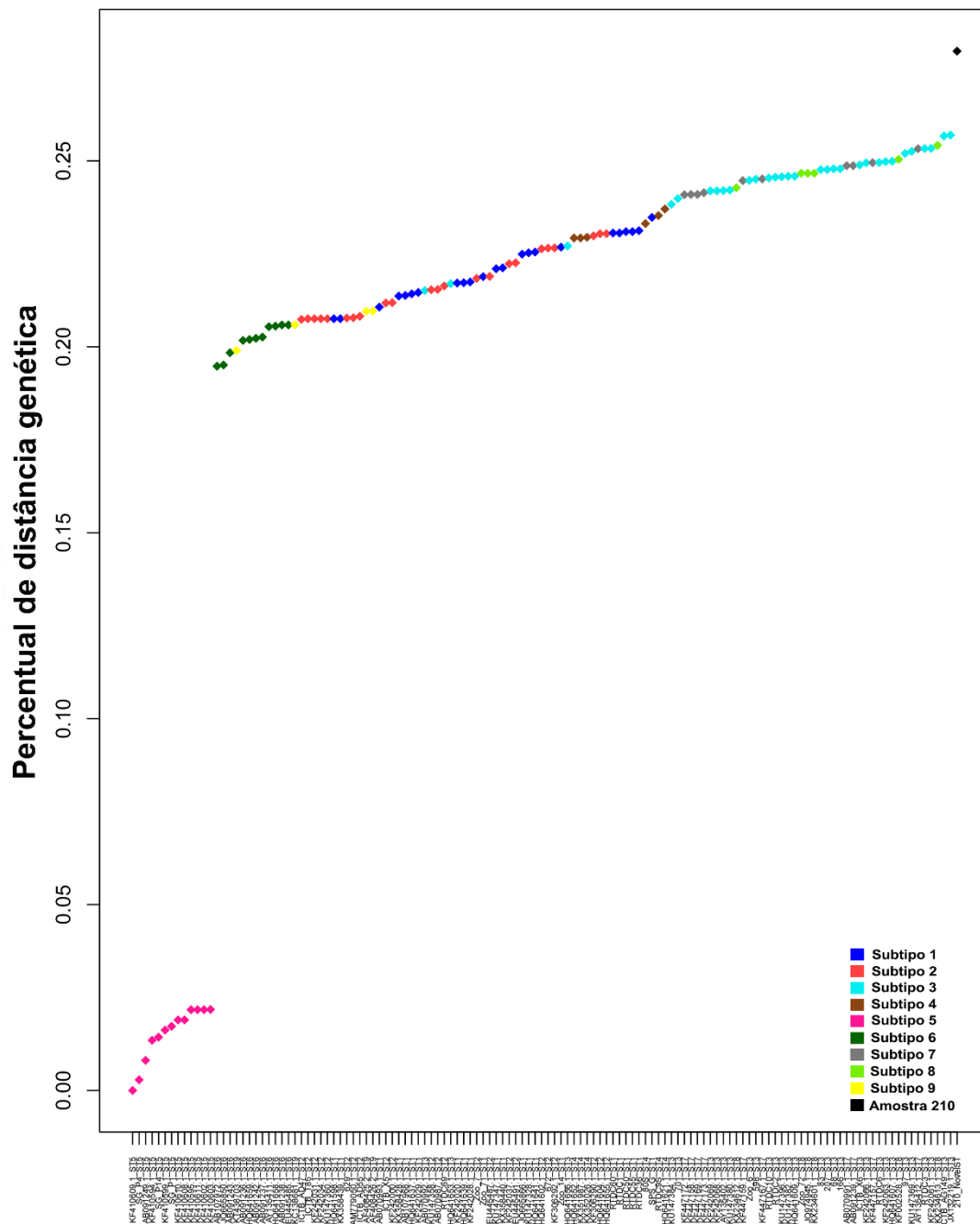


Figura 13: Gráfico de distância genética par-a-par do ST5

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp. usando como referência o ST6

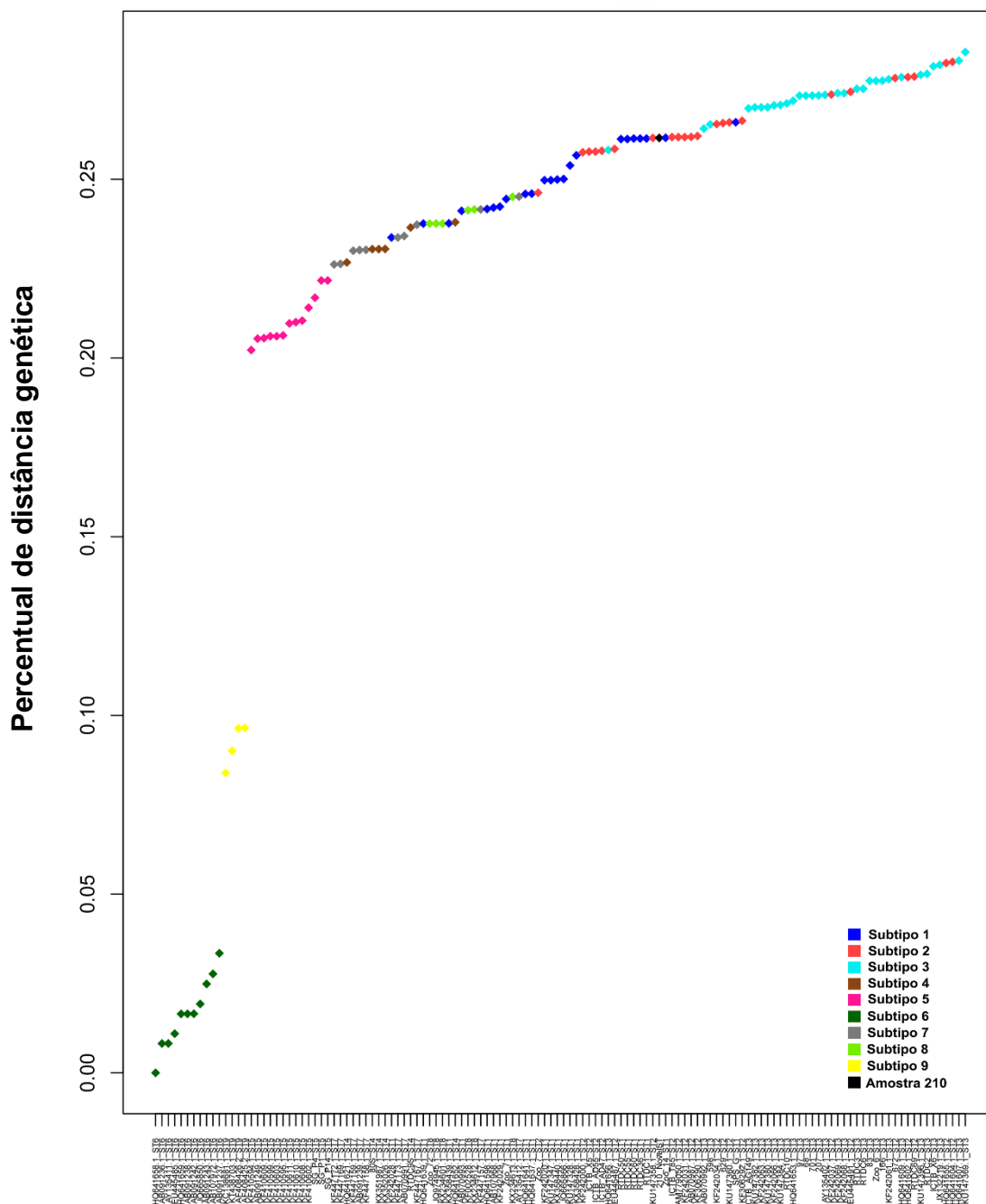


Figura 14: Gráfico de distância genética par-a-par do ST6

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp. usando como referência o ST7

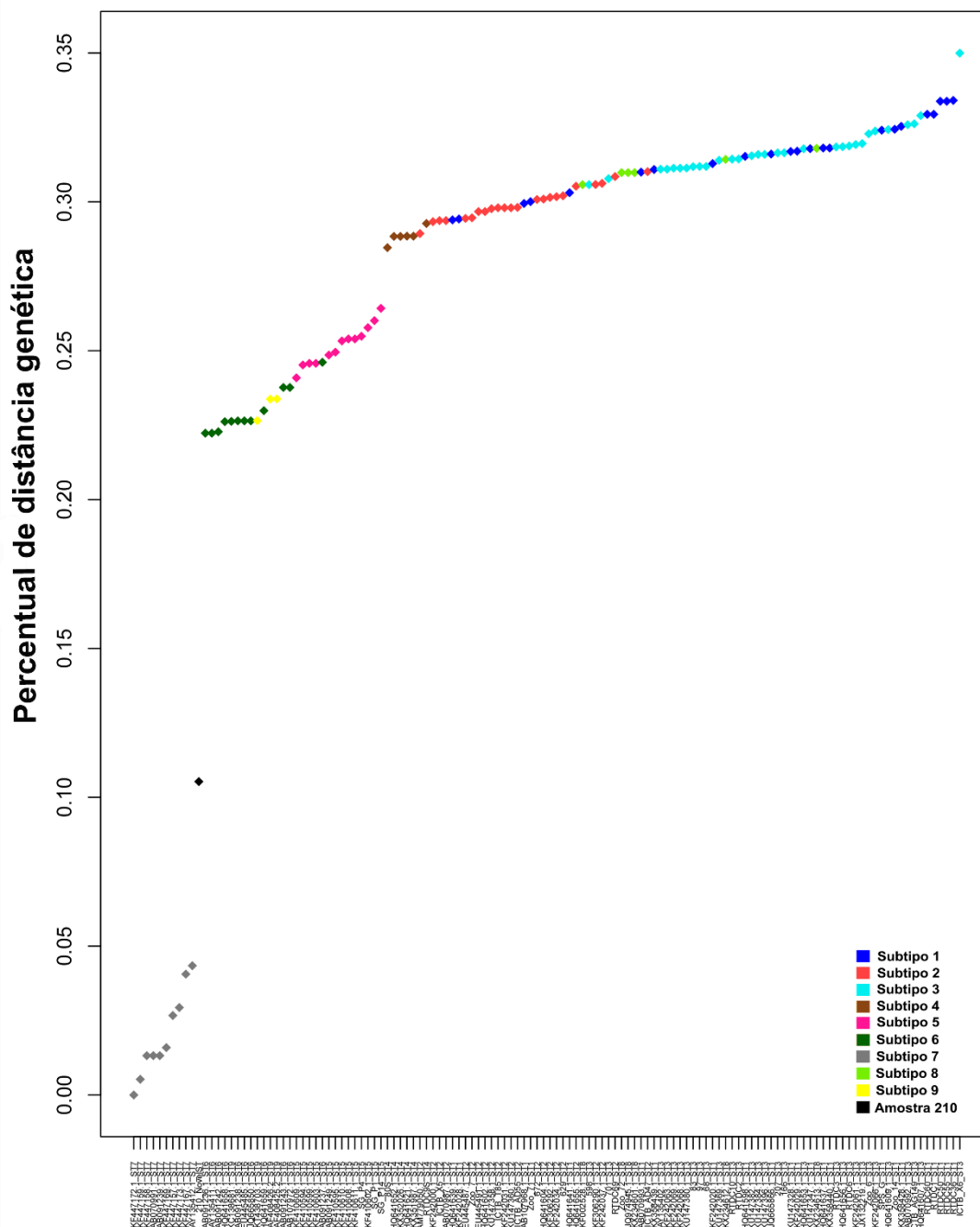


Figura 15: Gráfico de distância genética par-a-par do ST7

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNA de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp. usando como referência o ST8

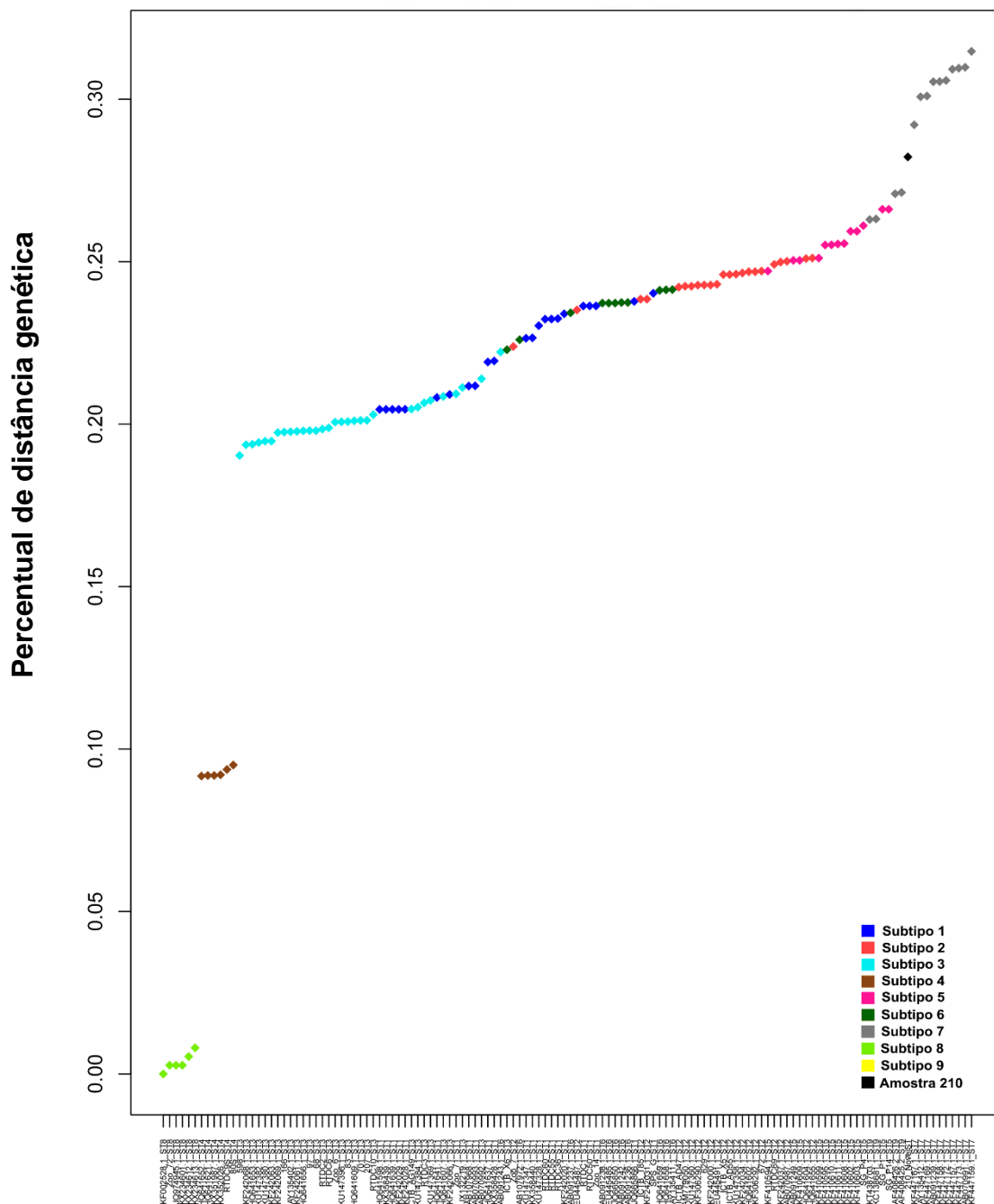


Figura 16: Gráfico de distância genética par-a-par do ST8

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp. usando como referência o ST9

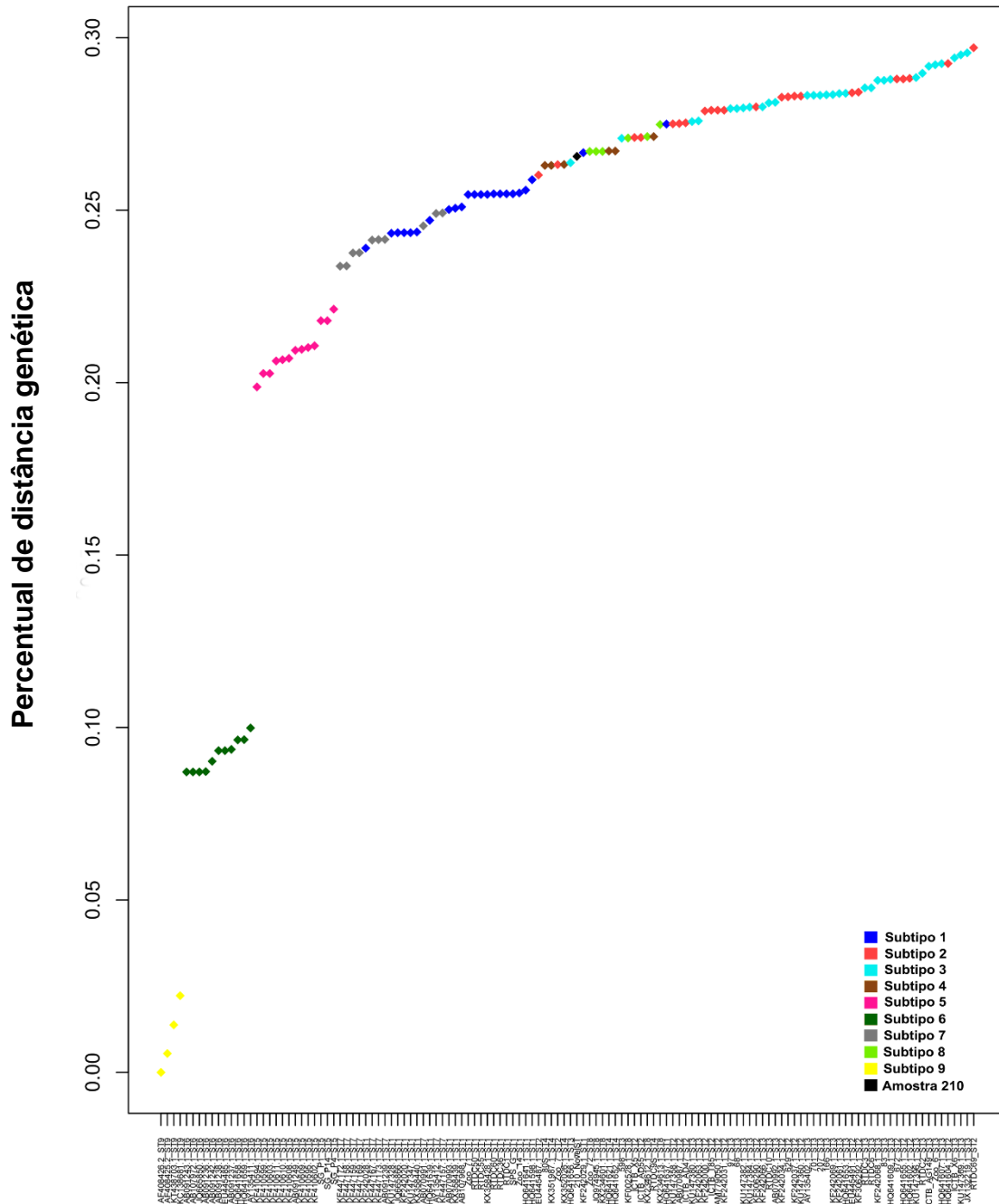


Figura 17: Gráfico de distância genética par-a-par do ST9

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre os isolados e sequências do Genbank de *Blastocystis* sp. usando como referência a amostra 210

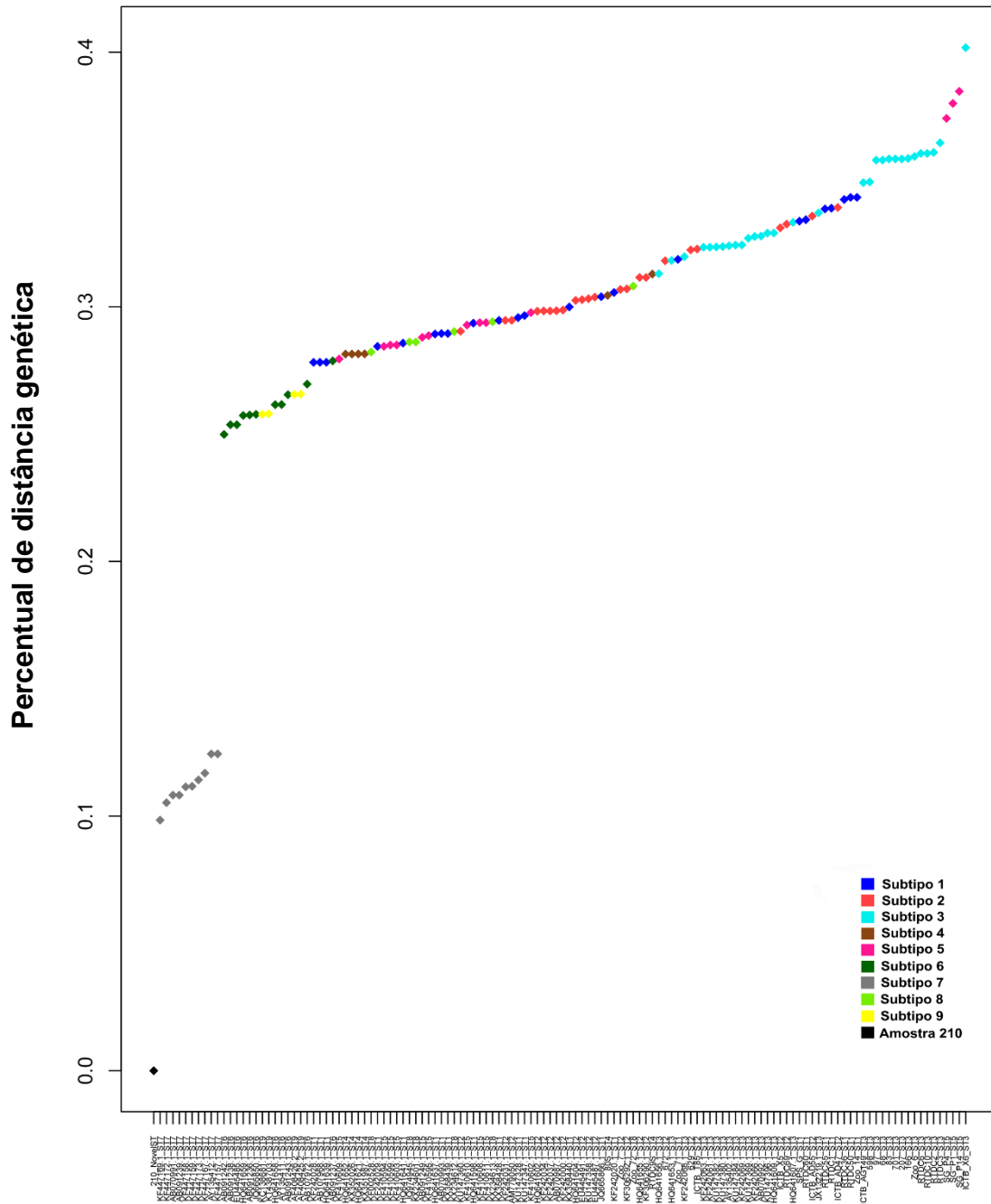


Figura 18: Gráfico de distância genética par-a-par da amostra 210

*Eixo X: sequências parciais do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. de isolados de humanos e animais obtidos no estudo e do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre as sequências das 17 cópias do gene SSU-RNAr do ST7 de *Blastocystis* sp.

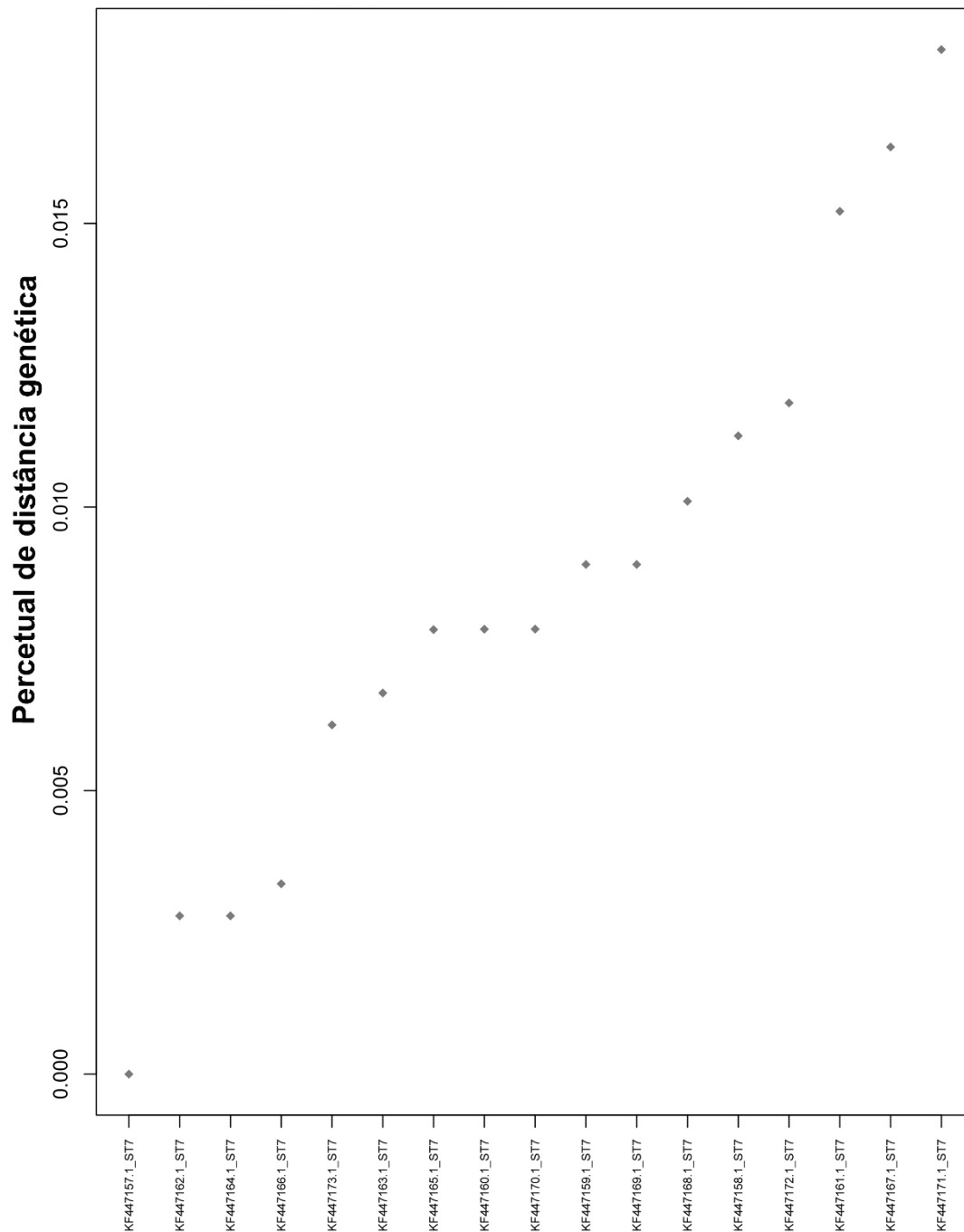


Figura 19: Gráfico de distância genética par-a-par entre as 17 cópias do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp.

*Eixo X: sequências completas do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre as sequências das 17 cópias do gene SSU-RNAr do ST7 de *Blastocystis* sp. do fragmento descrito por Scicluna et al., 2006

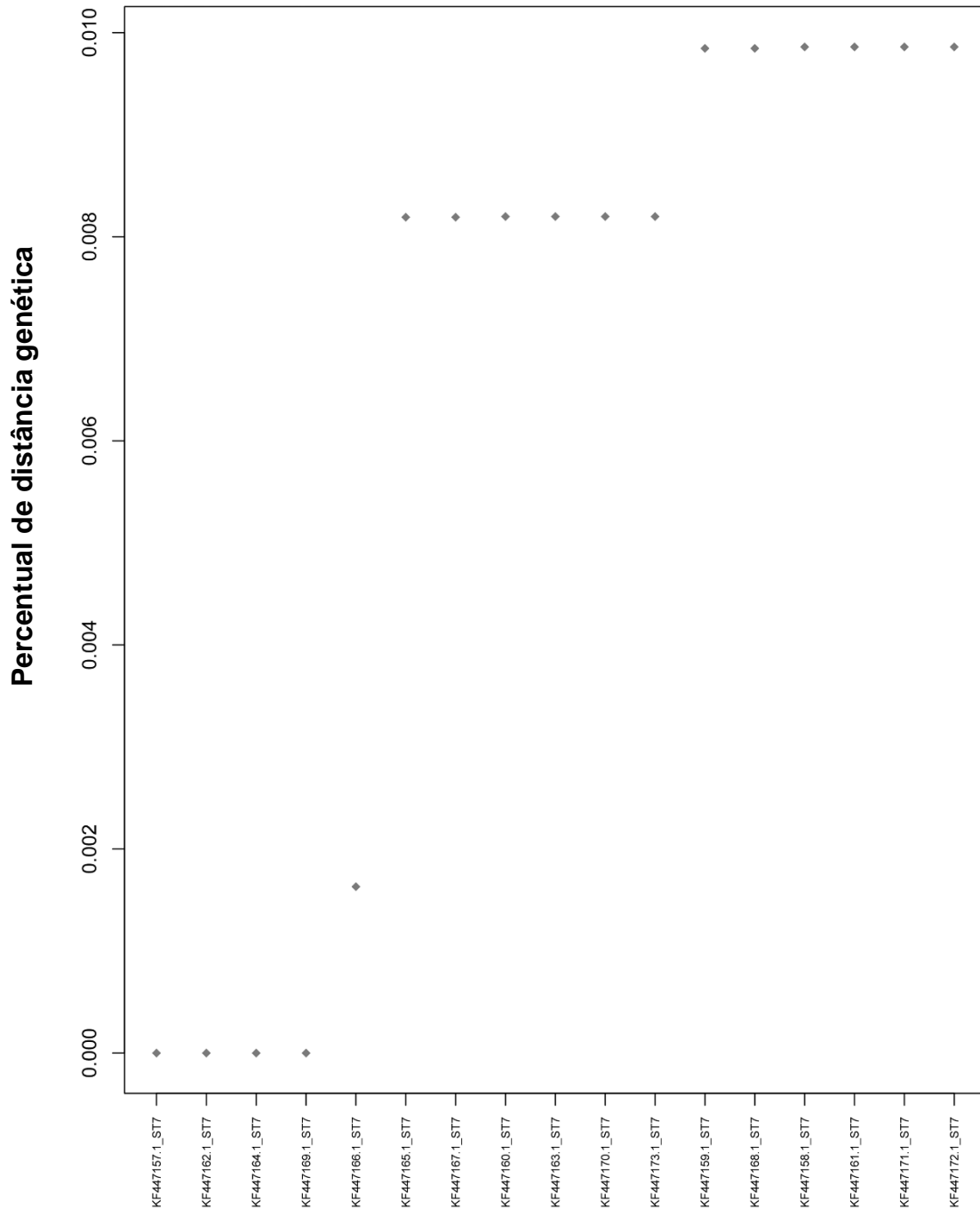


Figura 20: Gráfico de distância genética par-a-par entre as 17 cópias do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. utilizando o fragmento descrito por Scicluna et al., (2006)

*Eixo X: sequências do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre as sequências das 17 cópias do gene SSU-RNAr do ST7 de *Blastocystis* sp. do fragmento descrito por Parkar et al., 2010

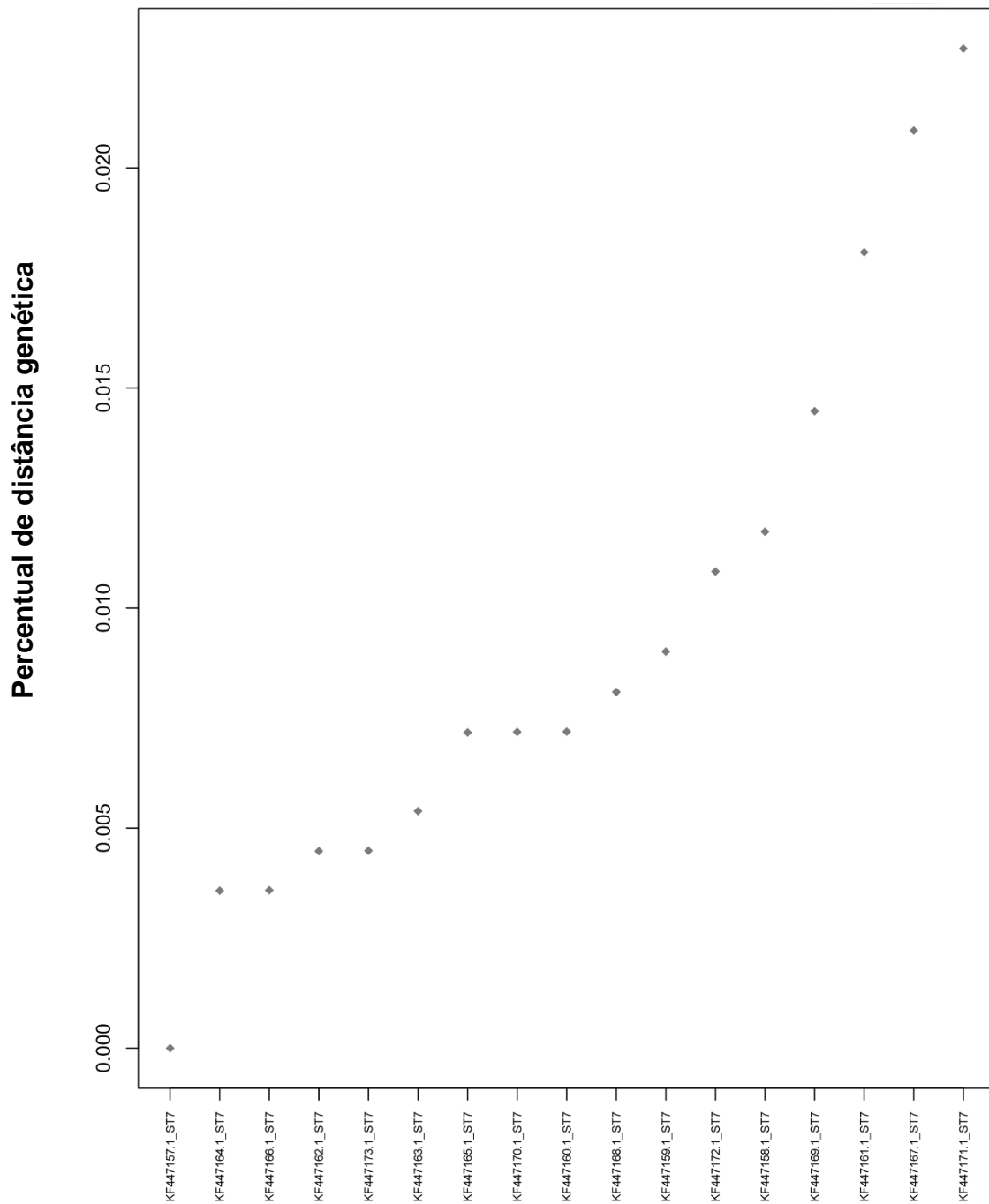


Figura 21: Gráfico de distância genética par-a-par entre as 17 cópias do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. utilizando o fragmento descrito por Parkar et al., (2010)

*Eixo X: sequências do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

Distância genética par-a-par entre as sequências das 17 cópias do gene SSU-rRNA do ST7 de *Blastocystis* sp. do fragmento descrito por Santin et al., 2011

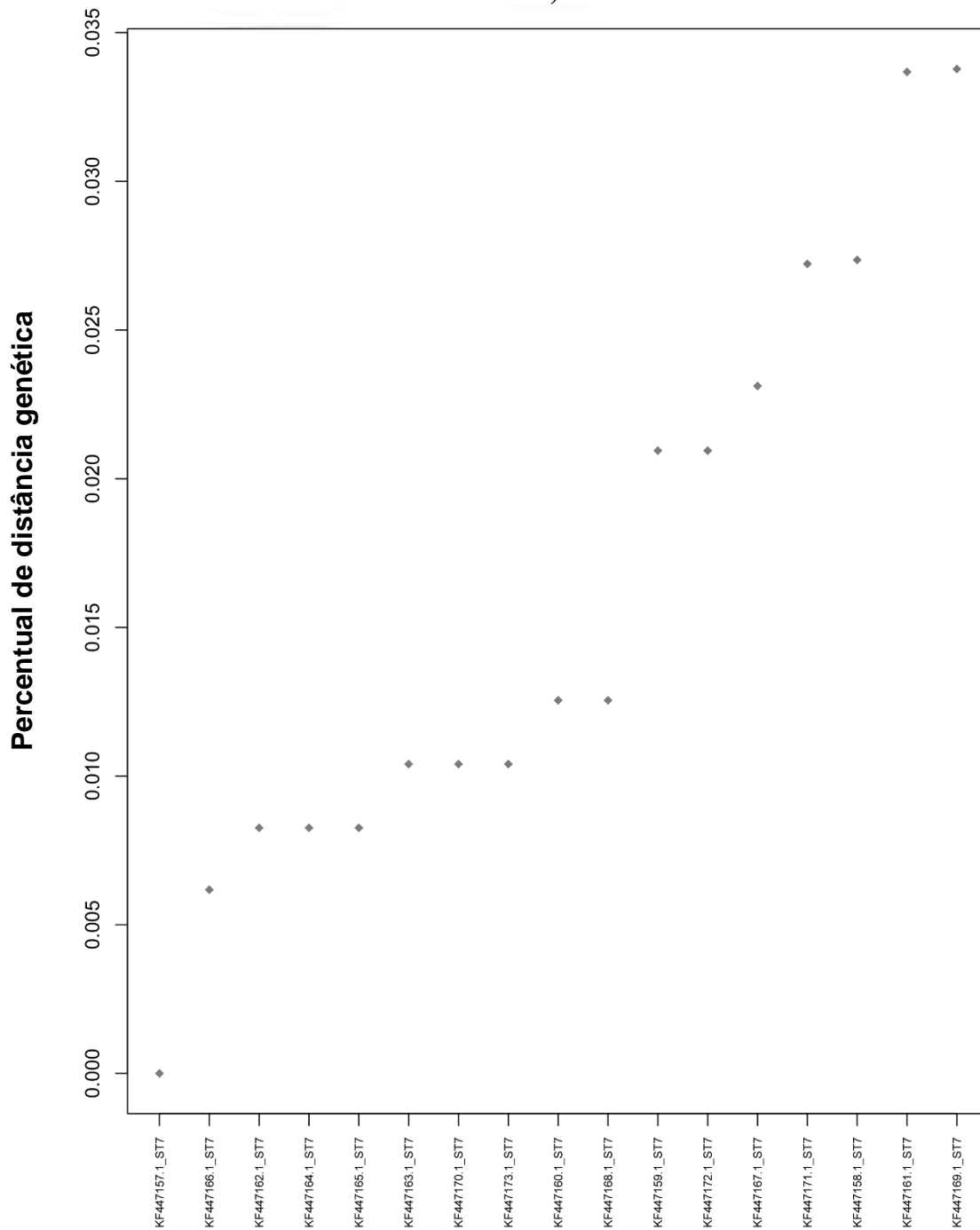


Figura 22: Gráfico de distância genética par-a-par entre as 17 cópias do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. utilizando o fragmento descrito por Santin et al., (2011)

*Eixo X: sequências do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* sp. do Genbank; Eixo Y: percentual de distância genética

5.4. Demais alvos moleculares

5.4.1. SSU-RNAr

Foram selecionadas randomicamente amostras dos subtipos 1, 2, 3, 4, 5 e 8 previamente identificadas pelo alvo SSU-RNAr, além da amostra 210 (*Novel-ST*), para a amplificação e sequenciamento com os demais alvos (Tabela 11).

Tabela 11: Número de amostras selecionadas previamente identificadas pelo SSU-RNAr para a amplificação dos alvos MLO-DNAr e ITS1-2.

Subtipos	Nº
ST1	12
ST2	13
ST3	9
ST4	6
ST5	9
ST8	11
<i>Novel-ST</i>	1
Total	61

5.4.2 MLO-DNAr

No total, foram analisadas 61 amostras de diferentes hospedeiros, sendo que 59 foram identificadas com o alvo MLO-DNAr e duas amostras não foram obtidas sequências de boa qualidade. Além disso, foram identificados os subtipos 1, 2, 3, 4, 5 e 8. Das 59 sequências obtidas, 41 (69,5%) apresentaram resultados concordantes para ambos os alvos SSU-RNAr e MLO-DNAr (Tabela 12). Além disso, a amostra 210 que apresentou valor de identidade de 93% no BLAST com sequências do SSU-RNAr previamente descritas como ST7 no Genbank e que não agrupou no clado de ST7 em ambas as análises filogenéticas (MV e IB), apresentou 98% de identidade com o alvo MLO-DNAr de ST7.

Tabela 12: Resultados concordantes entre as sequências identificadas a partir de SSU-RNAr e MLO-DNAr

Amostras	Hospedeiro	ST MLO-DNAr	ST SSU-RNAr	Identidade MLO-DNAr	Identidade SSU-RNAr
RTDC35	Humano	1	1	99%	99%
<i>Aotus</i> sp_ZOO_14	PNH	1	1	99%	99%
RTDC41	Humano	1	1	99%	100%
<i>A. anser</i> _SPS_G	Ganso	1	1	99%	100%
SPS_PR5	Suíno	1	1	99%	99%
<i>P. troglodytes</i> _ZOO_7	PNH	2	2	95%	97%
53Sumid	Humano	2	2	95%	100%
228 Sumid	Humano	2	2	95%	99%
RTDC67	Humano	2	2	95%	100%
RTDC45	Humano	2	2	95%	100%
<i>M. mulatta</i> _ICTB_AB39	PNH	2	2	99%	100%
<i>M. mulatta</i> _ICTB_AB111	PNH	2	2	95%	100%
645Sumid	Humano	2	2	95%	99%
629 Sumid	Humano	2	2	95%	99%
<i>Papio</i> sp_ZOO_6	PNH	3	3	100%	98%
<i>R. rattus</i> _CFMA ICTB_18225	Roedor	3	3	87%	99%
701Sumid	Humano	3	3	99%	99%
RTDC30	Humano	3	3	100%	100%
RTDC31	Humano	3	3	99%	100%
RTDC62	Humano	3	3	100%	99%
47Sumid	Humano	3	3	100%	98%
RTDC9	Humano	4	4	94%	100%
NIT_B62	Barata	4	4	99%	100%
48Sumid	Humano	4	4	100%	99%
80Sumid	Humano	4	4	99%	99%
SG_P4	Suíno	5	5	95%	100%
SG_P9	Suíno	5	5	94%	100%
SG_P5	Suíno	5	5	94%	100%
SG_P1	Suíno	5	5	94%	100%
SG_P8	Suíno	5	5	94%	100%
SG_PM5	Suíno	5	5	95%	100%
SPS_PR9	Suíno	5	5	95%	100%
<i>N. squamipes</i> _SUMID_NEC	Roedor	8	8	100%	100%
<i>Aotus</i> sp_ZOO_12	PNH	8	8	99%	99%
<i>Ateles</i> sp_ZOO_31	PNH	8	8	99%	100%
<i>Alouatta</i> sp_ZOO_41	PNH	8	8	99%	100%
626Sumid	Humano	8	8	100%	99%
<i>L. lagotricha</i> _ZOO_72	PNH	8	8	99%	100%
<i>M. mulatta</i> _ICTB_AB79	PNH	8	8	100%	100%
<i>M. mulatta</i> _ICTB_AB129	PNH	8	8	100%	100%
SG_PM2	Suíno	8	8	99%	100%

*RTDC: Residência terapêutica de Duque de Caxias; ZOO: Zoológico do RJ; PNH: primatas não-humanos; SPS: Distrito de São Pedro da Serra, RJ; Sumid: Município de Sumidouro, RJ; ICTB: Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Fiocruz, RJ; CFMA: Campus Fiocruz Mata Atlântica, Fiocruz, RJ; NIT: Município de Niterói, RJ; SG: Município de São Gonçalo, RJ

Em contrapartida, 17 (28,8%) sequências analisadas apresentaram resultados discordantes em relação à identificação dos subtipos. Em relação aos percentuais de identidade obtidos de ambos os alvos moleculares, observamos que os mesmos foram variáveis, compreendendo de 87% a 100% (Tabela 13).

Tabela 13: Resultados discordantes entre as sequências identificadas com os alvos SSU-RNAr e MLO-DNAr

Amostras	Hospedeiro	ST SSU- RNAr	ST MLO- DNAr	Identidade SSU- RNAr	Identidade MLO- DNAr
<i>M. fuscata_ZOO_71</i>	PNH	1	8	99%	99%
<i>D. aurita_CFMA_LBCE18255</i>	Marsupial	1	3	100%	87%
<i>M. nudicaudatus_CFMA_LBCE15999</i>	Marsupial	1	3	100%	86%
<i>D. aurita_CFMA_LBCE19060</i>	Marsupial	1	3	100%	87%
144Sumid	Humano	1	2	99%	95%
634Sumid	Humano	2	1	99%	95%
75Sumid	Humano	2	3	99%	100%
86 Sumid	Humano	2	8	99%	100%
127Sumid	Humano	2	1	99%	99%
67Sumid	Humano	3	2	99%	95%
94Sumid	Humano	3	1	99%	99%
1Sumid	Humano	4	3	100%	99%
SPS_PR12	Suíno	4	1	100%	99%
SPS_PR1	Suíno	5	1	100%	98%
<i>G.gallus_NIT_G4</i>	Galinha	5	7	100%	94%
<i>D. septemcinctus_SUMID_LBCE18256</i>	Tatu	8	3	100%	87%
<i>D. aurita_CFMA_LBCE17729</i>	Marsupial	8	3	99%	86%

*RTDC: Residência terapêutica de Duque de Caxias, RJ; ZOO: Zoológico do RJ; PNH: primatas não-humanos; SPS: Distrito de São Pedro da Serra; Sumid: Município de Sumidouro, RJ; ICTB: Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Fiocruz, RJ; CFMA: Campus Fiocruz Mata Atlântica, Fiocruz, RJ; NIT: Município de Niterói, RJ; SG: Município de São Gonçalo, RJ.

5.4.3. ITS 1-2

Com o intuito de avaliar o potencial do alvo molecular ITS1-2, os mesmos isolados amplificados com o alvo MLO-DNAr, também foram usados na subtipagem com o ITS1-2. Entretanto, das 61 amostras analisadas, 27 foram identificadas como subtipos 1, 2, 3 e 7, sendo que destas 16 apresentaram resultados discordantes com o alvo SSU-RNAr e ITS1-2 e 11 foram concordantes (Tabela 14 e 15). Os percentuais de identidade também foram variáveis, compreendendo de 79% a 99%. Além disso, quatro amostras não amplificaram na PCR, incluindo a amostra 210, e 30 não foram obtidas sequências de boa qualidade.

Tabela 14: Resultados discordantes entre as sequências identificadas com os alvos SSU-RNAr e ITS1-2

Amostras	Hospedeiro	ST SSU- RNAr	ST ITS1-2	Identidade SSU-RNAr	Identidade ITS1-2
<i>N. squamipes</i> _SUMID_NEC	Roedor	8	1B	100%	83%
<i>Papio</i> sp_ZOO_6	PNH	3	1B	98%	83%
<i>Ateles</i> sp_ZOO_31	PNH	8	1B	100%	83%
<i>Alouatta</i> sp_ZOO_41	PNH	8	1B	100%	82%
<i>L.lagotricha</i> _ZOO_72	PNH	8	1B	100%	83%
<i>M. mulata</i> _ICTB_AB79	PNH	8	1B	100%	83%
<i>M. mulata</i> _ICTB_AB129	PNH	8	1B	100%	83%
94Sumid	Humano	3	1B	99%	97%
86Sumid	Humano	2	1B	99%	82%
SG_PM5	Suíno	5	2	100%	84%
67Sumid	Humano	3	2	99%	98%
<i>D. aurita</i> _CFMA_LBCE19060	Marsupial	1	3	100%	80%
1Sumid	Humano	4	3	100%	98%
<i>D. aurita</i> _CFMA_LBCE17729	Marsupial	8	3	99%	81%
75Sumid	Humano	2	3	99%	99%
SG_P1	Suíno	5	7	100%	79%

*RTDC: Residência terapêutica de Duque de Caxias, RJ; ZOO: Zoológico do RJ; PNH: primatas não-humanos; SPS: Distrito de São Pedro da Serra, RJ; Sumid: Município de Sumidouro, RJ; ICTB: Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Fiocruz, RJ; CFMA: Campus Fiocruz Mata Atlântica, Fiocruz, RJ; NIT: Município de Niterói, RJ; SG: Município de São Gonçalo, RJ.

Tabela 15: Resultados concordantes entre as sequências identificadas com os alvos SSU-RNAr e ITS1-2

Amostras	Hospedeiro	ST SSU- RNAr	ST ITS1-2	Identidade SSU-RNAr	Identidade ITS1-2
RTDC41	Humano	1	1B	100%	98%
<i>P. troglodytes</i> _ZOO7	PNH	2	2	97%	98%
53Sumid	Humano	2	2	100%	97%
228Sumid	Humano	2	2	99%	96%
<i>M. mulatta</i> _ICTB_AB 39	PNH	2	2	100%	98%
<i>M. mulatta</i> _ICTB_AB 111	PNH	2	2	100%	97%
127Sumid	Humano	2	2	99%	93%
<i>R. rattus</i> _CFMA_LBCE18225	Roedor	3	3	99%	80%
RTDC30	Humano	3	3	100%	99%
RTDC62	Humano	3	3	99%	98%
47Sumid	Humano	3	3	98%	98%

*RTDC: Residência terapêutica de Duque de Caxias, RJ; ZOO: Zoológico do RJ; PNH: primatas não-humanos; SPS: Distrito de São Pedro da Serra, RJ; Sumid: Município de Sumidouro, RJ; ICTB: Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Fiocruz, RJ; CFMA: Campus Fiocruz Mata Atlântica, Fiocruz, RJ; NIT: Niterói, RJ; SG: Município de São Gonçalo, RJ;

Por fim, é importante ressaltar que 16 amostras, das quais 12 pertenciam ao grupo dos marsupiais (*D. aurita*) e quatro a roedores (*N. squamipes* e *A. montensis*), não foram amplificadas (11 marsupiais e três roedores) ou não foram obtidas sequências de boa qualidade (um de marsupial e um de roedor) com o alvo SSU-RNAr. Entretanto, foram amplificadas e sequenciadas com o alvo MLO-DNAr e 11 destas com ITS1-2, como mostra a tabela 16.

Tabela 16: Resultados dos isolados que não amplificaram e não foram obtidas sequências de boa qualidade com o alvo SSU-RNAr, mas foram identificadas com os alvos MLO-DNAr e ITS1-2.

Amostras	Hospedeiro	ST MLO-DNAr	ST SSU-RNAr	ST ITS1-2	Identidade MLO-DNAr	Identidade SSU-RNAr	Identidade ITS1-2
<i>D. aurita</i> _CFMA_LBCE15998	Marsupial	3	-	-	92%	-	-
<i>D. aurita</i> _CFMA_LBCE18254	Marsupial	3	-	-	92%	-	-
<i>D. aurita</i> _CFMA_LBCE19565	Marsupial	3	-	3	87%	-	81%
<i>N. squamipes</i> _SUMID_LBCE19525	Roedor	4	-	7	100%	-	80%
<i>A. montensis</i> _RC_LBCE19534	Roedor	3	-	-	86%	-	-
<i>D. aurita</i> _RC_LBCE19548	Marsupial	3	-	7	88%	-	80%
<i>D. aurita</i> _RC_LBCE19536	Marsupial	3	-	7	86%	-	82%
<i>A. montensis</i> _RC_LBCE19542	Roedor	3	-	3	87%	-	81%
<i>D. aurita</i> _RC_LBCE19546	Marsupial	3	-	7	86%	-	82%
<i>D. aurita</i> _RC_LBCE19549	Marsupial	3	-	7	87%	-	82%
<i>D. aurita</i> _RC_LBCE19547	Marsupial	3	-	7	87%	-	81%
<i>D. aurita</i> _CFMA_LBCE19528	Marsupial	3	-	3	89%	-	81%
<i>N. squamipes</i> _RC_LBCE19535	Roedor	3	-	3	87%	-	81%
<i>D. aurita</i> _RC_LBCE19537	Marsupial	3	-	-	86%	-	-
<i>D. aurita</i> _PEPB_LBCE19563	Marsupial	3	-	-	87%	-	-
<i>D. aurita</i> _PEPB_LBCE19560	Marsupial	3	-	3	92%	-	80%

*RTDC: Residência terapêutica de Duque de Caxias, RJ; ZOO: Zoológico do RJ; PNH: primatas não-humanos; SPS: Distrito de São Pedro da Serra, RJ; Sumid: Município de Sumidouro, RJ; ICTB: Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Fiocruz, RJ; CFMA: Campus Fiocruz Mata Atlântica, Fiocruz, RJ; NIT: Município de Niterói, RJ; SG: Município de São Gonçalo, RJ; RC: Município de Rio Claro; PEPB: Parque Estadual da Pedra Branca, RJ

VI. DISCUSSÃO

6.1 SSU-RNAr

Atualmente, as análises moleculares têm permitido uma abordagem mais específica, além de aprimorar a sensibilidade de detecção da infecção por *Blastocystis* sp., ajudando no melhor entendimento de sua epidemiologia. A caracterização dos subtipos de *Blastocystis* sp. é essencial para a compreensão da diversidade genética do parasito e para a identificação das potenciais fontes de infecção e vias de transmissão em diferentes regiões do mundo.

No presente estudo, investigamos a prevalência e a distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. em duas populações humanas, uma rural e outra urbana, e em diferentes grupos de animais. Nossos resultados revelaram a alta prevalência de *Blastocystis* sp., compreendendo 41,1% das amostras positivas e 30,7% oriundas de animais. Em trabalhos epidemiológicos realizados no Brasil, a prevalência da infecção humana por este parasito é consideravelmente variável, sendo relatada entre 2% e 86% (Guimarães & Sogayar, 1993; Nascimento & Moitinho, 2005; Aguiar et al., 2007; Mine & Rosa, 2008; Borges et al., 2009; Takizawa et al., 2009; Malheiros et al., 2011; Branco et al., 2012; Gil et al., 2013; Cabrine-Santos et al., 2015; David et al., 2015; Rebolla et al., 2016; Faria et al., 2017; Oliveira-Arbex et al., 2018). Esta grande diferença pode ser devido às características da população estudada e, principalmente aos métodos diagnósticos empregados. Por exemplo, em 2016, Oliveira-Arbex e colaboradores avaliaram 123 amostras fecais de crianças, 44 de seus familiares e 14 de funcionários da creche por exame microscópico e detectaram que 8,9% estavam infectadas por *Blastocystis* sp. Em estudo posterior com o mesmo grupo de crianças, os autores relataram que 40,7% foram positivas para este parasito através da técnica de PCR (Oliveira-Arbex et al., 2018). Desta forma, ressalta-se a importância da padronização de métodos diagnósticos para a detecção de *Blastocystis* sp.

No que diz respeito a caracterização molecular dos isolados de *Blastocystis* sp. obtidos no presente estudo, o sequenciamento parcial do gene SSU-RNAr revelou que o ST3 foi o subtipo mais prevalente, seguido por ST1, ST2, ST8, ST5 e ST4, além de um isolado de humano de subtipo desconhecido. Ao analisarmos cada um dos dendogramas do estudo, foi possível observar que a topologia das árvores filogenéticas manteve o mesmo padrão normalmente observado na literatura, corroborando também os resultados

obtidos pelo método de distância genética. ST4 e ST8 estão relacionados entre si, assim como ST1 e ST2, além de ST6, ST7 e ST9 que também estão mais próximos evolutivamente (Whipps et al., 2010; Petrasova et al., 2011; Forsell et al., 2012; Alfellani et al., 2013a; Abdulsalam et al., 2013; Pandey et al., 2015; Alfonso et al., 2017; Sanpool et al., 2017; Villegas-Gomes et al., 2017; Song et al., 2017; Zhao et al., 2017). Embora alguns autores já tenham relatado certa diferença na topologia de árvores filogenéticas quanto a ST7 (Roberts et al., 2013), nossos resultados mostraram que este subtipo está, de fato, relacionado a ST6 e ST9, assim como também observado nos gráficos de distância genética.

Em relação aos isolados de humanos, ST3 foi o mais prevalente, seguido por ST1, ST2, ST8 e ST4. Vale ressaltar que houve diferença na ocorrência dos demais subtipos nas duas populações: Sumidouro teve a segunda maior prevalência pelos subtipos 1 e 2 (mesma prevalência), seguido por ST4 e ST8, e Duque de Caxias por ST1, seguido por ST2 e ST4. Em uma população indígena da Amazônia brasileira, o ST1 foi o mais prevalente seguido por ST2 e ST3 (Malheiros et al., 2011), ao passo que um estudo realizado em duas pequenas aldeias de pescadores de baixo poder aquisitivo situadas ao longo do rio Tietê, no Estado de São Paulo, os autores encontraram maior incidência de isolados de ST3, seguido por ST1, ST7 e ST6 (David et al., 2015). No trabalho realizado na América do Sul, o subtipo 3 também foi o mais prevalente no Brasil, apresentando a segunda maior prevalência os subtipos 1, 8 e possíveis novos subtipos (*Novel-ST*) e, em terceiro lugar, ST7 (Ramirez et al., 2016); embora seja importante ressaltar o reduzido número de amostras provenientes do território brasileiro (n=22) analisadas neste estudo. Em outro estudo em São Paulo, ST3 apresentou maior prevalência, seguido por ST1, ST2 e ST6 de isolados de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (Melo et al., 2017). Recentemente, Oliveira-Arbex e colaboradores (2018), também na cidade de São Paulo, descreveram a prevalência de *Blastocystis* sp. em crianças de uma creche, seus familiares e cães, além dos funcionários da mesma. Os autores relataram a maior ocorrência de ST1, seguido por ST3, ST2 e ST7, porém nenhum cão estava infectado pelo parasito.

Em geral, os subtipos 1, 2 e 3 são frequentemente encontrados em humanos em diversos países (Scicluna et al., 2006; Yan et al., 2006; Li et al. 2007; Stensvold et al., 2007; Rene et al., 2009; Malheiros et al., 2011; Alfellani et al., 2013b; Abu-Madi et al. 2015; Popruk et al., 2015; Vargas-Sanches et al., 2015; Villegas-Gómez et al. 2016; Sanpool et al., 2017). No entanto, o subtipo 3 é considerado o mais predominante na

população humana (Yoshikawa et al., 2000; Scicluna et al., 2006; Yan et al., 2006; Li et al., 2007; Ozyurt et al., 2008; Wong et al., 2008; Menounos et al., 2008; Rene et al., 2009; Souppart et al., 2009; Vassalos et al., 2010; Souppart et al., 2010; Meloni et al., 2011; Forsell et al., 2012; Alfellani et al., 2013; Bart et al., 2013; Roberts et al., 2013; Pandey et al., 2015; Popruk et al., 2015; Vargas-Sanches et al., 2015; Villegas-Gómez et al., 2016; Melo et al., 2017). Embora tenha sido sugerido que este subtipo seja o único de origem humana (Tan, 2008; Wong et al., 2008), o mesmo já foi detectado em diversos outros hospedeiros, incluindo primatas não humanos, suínos e equinos (Stensvold et al., 2009b; Santin et al., 2011; Alfellani et al., 2013b; Roberts et al., 2013; Ramirez et al., 2014; Wang et al., 2014; Zhao et al., 2017). Sendo assim, a partir de vários estudos sobre a distribuição de *Blastocystis* sp. em diferentes regiões, foi possível constatar que não existe nenhum grupo exclusivo de humanos (Abe, 2004; Stensvold et al., 2009; Parkar et al., 2010; Roberts et al., 2013; Ramirez et al., 2014), exceto o ST9 que, até o momento, foi encontrado somente em humanos (Stensvold et al., 2009a).

ST1 e ST2, de acordo com os nossos resultados, também tiveram elevada incidência na população de Sumidouro. Estes subtipos têm baixa especificidade de hospedeiro, sendo encontrados em grande variedade de animais domésticos e sinantrópicos, incluindo cães, suínos, roedores, primatas não humanos, equinos, bovinos e aves (Arisue et al., 2003; Abe, 2004; Stensvold et al., 2009b; Parkar et al., 2010; Roberts et al., 2013). Os hábitos comportamentais destes animais poderiam facilitar a transmissão de *Blastocystis* sp. para os humanos (Ramirez et al., 2014; Schar et al., 2014). Na região de Sumidouro, por se caracterizar uma região rural, os indivíduos mantêm contato direto com animais, sejam eles de criação, domésticos ou silvestres que, frequentemente, circulam próximos aos domicílios, o que também explica a maior diversidade de subtipos encontrados nesta população.

A maioria da população de Sumidouro vive na área rural e as atividades econômicas mais importantes da região são a criação de gado e plantação de vegetais (IBGE, 2010). Os indivíduos que residem em comunidades rurais, geralmente consomem alimentos crus, não possuem fonte de água potável e tratada e normalmente possuem hábitos de higiene inadequados, aumentando, assim, as chances de adquirirem uma infecção parasitária (Boonjaraspinyo et al., 2013; Wongthamarin et al., 2018). É relevante ainda considerar que, a maioria da população local por exercer atividade agrícola, mantém contato direto com o solo, outra fonte de infecção de *Blastocystis* sp. (Londoño-Franco et al., 2014).

No caso da população de Caxias, ST1 também apresentou alta prevalência, ao contrário do ST2. Embora seja considerado um dos subtipos mais comuns em infecções humanas, em diversos estudos ST2 foi o menos detectado quando comparado a ST1 e ST3, sendo até mesmo ausente em algumas populações (Alfellani et al., 2013; Pandey et al., 2015; Villegas-Gómez et al., 2016; Oliveira-Arbex et al., 2018). Nesta população, a transmissão da infecção por *Blastocystis* sp. pode ter sido facilitada pela convivência dos pacientes em ambiente coletivo, mantendo contato estreito entre eles e compartilhando hábitos precários de higiene. No geral, os ambientes coletivos são caracterizados por maus hábitos de higiene e contato interpessoal extensivo, o que proporciona condições favoráveis para a circulação e transmissão de parasitos, aumentando a suscetibilidade a infecções parasitárias (Khalili et al., 2013). As infecções parasitárias em centros de reabilitação mental são um grave problema de saúde pública, tendo em vista que a maioria das instituições é lotada e existe grande dificuldade em promover comportamentos saudáveis adequados por parte dos pacientes (Sharif et al., 2010). Todavia, considerando que o percentual de prevalência da infecção por *Blastocystis* sp. nos familiares e pacientes tenha sido semelhante (32,5% em pacientes e 38% em familiares), é provável que a principal forma de transmissão seja, de fato, através de água contaminada por cistos. O consumo de água contaminada é considerado a principal fonte de infecção por *Blastocystis* sp (Taamasri et al., 2000; Leelayoova et al., 2008; Eroglu & Koltas, 2010).

Ademais, em ambas as populações humanas estudadas, ST4 teve a menor prevalência dentre os subtipos encontrados, representando o primeiro relato de ocorrência deste subtipo no Brasil (Valença-Barbosa et al., 2017). Este subtipo é o segundo mais comum no Reino Unido e é frequentemente encontrado no continente europeu (Scicluna et al., 2006; Rene et al., 2009; Dominguez-Marquez et al., 2009; Stensvold et al., 2009; 2011; Forsell et al., 2012; Alfellani et al., 2013), porém é raro na África, Ásia e nas Américas (Alfellani et al., 2013b). Especula-se que a inserção deste subtipo na população humana tenha ocorrido relativamente em tempos mais recentes quando comparado ao subtipo 3 e por este motivo a sua ocorrência é menor (Clark et al., 2013). Na América do Sul, ST4 foi relatado em humanos na Colômbia e alguns primatas não humanos na Europa e América do Sul (Dominguez-Márquez et al., 2009; Alfellani et al., 2013; Ramirez et al., 2016).

O Brasil foi o único país da América do Sul, onde ST8 foi identificado em estudo realizado em seis países (Ramirez et al., 2016), apesar de também já ter sido detectado na Dinamarca, Reino Unido, Itália e Austrália (Clark, 1997; Stensvold et al., 2006; Meloni

et al., 2011; Roberts et al., 2013;). De acordo com os nossos achados, seis isolados da população de Sumidouro foram identificados como infectados pelo subtipo 8. É importante mencionar que duas amostras de animais, um roedor, *Nectomys squamipes*, e um tatu, *Dasypus septemcinctus*, obtidas no presente estudo, pertencem ao subtipo 8 e ambas foram coletadas no município de Sumidouro. Na literatura, não existem relatos da ocorrência deste subtipo em ambos os animais. Além disso, ao compararmos as sequências dos isolados de indivíduos de Sumidouro e de ambas as espécies de animais, verificou-se que são idênticas, sugerindo que este subtipo circula tanto na população humana quanto em animais.

O roedor semi-aquático, *Nectomys squamipes*, possui ampla distribuição geográfica no Brasil e habita as margens de córregos, rios e áreas inundadas (Mares & Ernest, 1986). Este roedor já foi relatado como importante fonte de infecção de parasitos intestinais, como o *Schistosoma mansoni*, na região de Sumidouro (D' Andrea et al., 2000; Maldonado et al., 2006) e também pode estar envolvido no ciclo de transmissão de *Blastocystis* sp. na região. De acordo com o relatório da Secretaria de Estado do Meio Ambiente para o Plano Municipal de Saneamento Básico de Sumidouro (SEA, 2014), quase 80% da população desta região não tem acesso a esgoto sanitário e utilizam outras formas de lançamento de efluentes domésticos (fossa rudimentar, vala, rio, lago e outros tipos), representando uma importante fonte de contaminação do solo e da água. Além disso, o *N. squamipes* é, frequentemente, encontrado próximo ao peridomicílio das habitações nesta região (Gentile et al., 2006), podendo ser responsável pela disseminação de *Blastocystis* sp. nestes locais e representando uma fonte de infecção para humanos e, possivelmente, para outros animais.

Em relação ao tatu, esta é a primeira descrição da presença de *Blastocystis* sp. neste animal, embora apenas uma amostra tenha sido analisada. De fato, identificar um tatu da espécie *Dasypus septemcinctus*, mamífero de ampla distribuição na América do Sul (Eisenberg & Redfordt, 1999; Wilson & Reeder, 2005; Gardner, 2007), naturalmente infectado por *Blastocystis* sp., abrem novas oportunidades de pesquisa, incentivando a realização de mais estudos epidemiológicos com diferentes hospedeiros no Brasil. Estes animais, quando não estão em suas tocas, estão forrageando em pastagens com o focinho próximo ao chão (Carter & Encarnação, 1983, Eisenberg & Redford, 1999) e, por ser uma região onde há falta de saneamento básico e as condições de higiene são precárias, este animal pode se infectar pela via orofecal através da ingestão de cistos de *Blastocystis* sp. do solo e, posteriormente, transmitir para humanos e outros animais.

Quanto aos outros animais investigados no presente estudo, a infecção por *Blastocystis* sp. foi identificada em quase todos os grupos. Os marsupiais apresentaram a segunda maior prevalência, seguido pelos porcos domésticos. O gambá de orelha preta, *Didelphis aurita*, é considerado generalista e oportunista, sendo muito abundante em áreas degradadas na Mata Atlântica (Cáceres, 2004; Paglia et al., 2012). O *Metachirus nudicaudatus*, outra espécie de marsupial examinada, conhecida popularmente por cuíca-de-quatro-olhos-marrom, é considerado insetívoro, embora também possa consumir ampla variedade de recursos, tais como pequenos vertebrados, sementes e frutas (Santori et al., 1995, Freitas et al., 1997; Cáceres, 2004). É possível que a dieta alimentar de ambos os animais aumente as chances de ingerirem cistos de *Blastocystis* sp.

Além disso, é importante ressaltar que este é o primeiro relato sobre a infecção deste parasito na espécie de marsupial *Metachirus nudicaudatus*. Assim, é relevante enfatizar que, quanto mais estudos forem realizados, maior será o nosso conhecimento sobre a epidemiologia de *Blastocystis* sp., fornecendo mais informação sobre a especificidade de hospedeiro e a diversidade deste parasito.

Até o momento, os marsupiais, embora de diferentes gêneros e espécies (*Didelphis marsupialis*, *Trichosurus* sp., *Setonix brachyurus*, *Macropus fuliginosus*, *Lasiornhinus latifron*), foram encontrados infectados por ST4, ST8, ST12, ST13 e ST16 (Stensvold et al., 2009b; Parkar et al., 2010; Alfellani et al., 2013; Ramirez et al., 2014; Roberts et al., 2013; Cian et al., 2017). Considerando os nossos achados, ST1 e ST8 foram detectados em ambas as espécies investigadas no estudo, este é o primeiro relato de ST1 neste grupo de animais.

Depois dos marsupiais, os porcos domésticos apresentaram a maior prevalência de *Blastocystis* sp. em nosso estudo. Este parasito é considerado um dos mais prevalentes nestes animais (Snell-Castro et al., 2004; Navarro et al., 2008). Os nossos resultados mostraram que a maioria das amostras positivas foi coletada em uma comunidade carente, Jardim Catarina, localizada no município de São Gonçalo, onde os moradores não possuem saneamento básico, regulamentação do sistema de esgoto e coleta de lixo. É importante ressaltar que o proprietário permitia que seus animais circulassem livremente ao redor da comunidade, alimentando-se de lixo em terrenos baldios e consumiam, habitualmente, águas residuais despejadas irregularmente em um dos rios da região. A água contaminada foi apontada como a principal fonte de infecção por *Blastocystis* sp. (Taamasri et al., 2000; Li et al., 2007; Leelayoova et al., 2008; Eroglu & Koltas, 2010).

Os estudos de caracterização molecular de isolados de suínos, geralmente, identificam dois grupos: os que são infectados por ST1 (Thathaisong et al., 2003; Navarro et al., 2008) e aqueles que são, predominantemente, infectados por ST5 (Abe et al., 2003; Yoshikawa et al., 2004; Yan et al., 2007; Stensvold et al., 2009b; Fayer et al., 2014; Yoshikawa et al., 2016; Song et al., 2017; Udonsom et al., 2018). No entanto, seis STs de *Blastocystis* sp. foram relatados em porcos em todo o mundo (ST1-ST3, ST5-ST7), sendo o ST5 o dominante na maioria dos estudos, assim como foi observado neste estudo (Abe et al., 2002; Yoshikawa et al., 2004b; Alfellani et al., 2013a; Fayer et al., 2014; Noel et al., 2005; Parkar et al., 2010; Santin et al., 2011; Wang et al., 2014; Yoshikawa et al., 2016).

Todavia, no nosso conhecimento, a infecção por ST4 e ST8 neste hospedeiro, até o momento, não foram relatadas na literatura. O isolado de ST4 foi coletado de uma fazenda na área rural em São Pedro da Serra na cidade de Friburgo e o isolado de ST8 da comunidade carente no município de São Gonçalo. Em ambos os locais, os animais têm contato próximo com outros animais, sobretudo com humanos, e vivem em ambientes insalubres. A criação de suínos em locais com precárias condições de higiene pode configurar uma importante fonte de transmissão e circulação de vários parasitos, incluindo *Blastocystis* sp. Além disso, o contato próximo entre outros animais e humanos, poderia explicar o compartilhamento de diferentes subtipos. O risco do potencial zoonótico de porcos para transmitir *Blastocystis* sp. para outros hospedeiros foi relatado em um estudo em Queensland, Austrália, no qual o subtipo ST5 foi detectado em cuidadores de suínos e, simultaneamente nos porcos, sendo, portanto, considerados uma importante fonte de infecção humana por *Blastocystis* sp. (Parkar et al., 2010; Wang et al., 2014).

ST4 é o subtipo mais frequentemente relatado em roedores, sendo propostos como reservatórios de ST4 de *Blastocystis* sp., embora outros STs já tenham sido encontrados neste grupo de hospedeiro (Alfellani et al., 2013; Cian et al., 2017; Katsumata et al., 2018). Em relação a este grupo de animais, no presente estudo, ST3 e ST8 foram detectados em duas espécies distintas de roedores, *Rattus rattus* e *Nectomys squamipes*, respectivamente. A espécie de roedor *R. rattus* possui comportamento sinantrópico, podendo ser comumente encontrado próximo as habitações humanas e representar importante fonte de infecção para humanos. Além disso, a exposição a fezes de roedores é, praticamente, universal, o que contribui para a transmissão de *Blastocystis* sp., principalmente em ambientes com precárias condições de saneamento básico. Já ST8 é

aparentemente raro em outros hospedeiros, embora os grandes gambás americanos e os primatas não humanos já tenham sido encontrados infectados por este subtipo (Alfellani et al., 2013a; Ramirez et al., 2014), sendo, portanto, o primeiro relato deste subtipo nestes animais.

Em relação ao grupo dos primatas não humanos, nosso estudo mostrou a ocorrência de quatro subtipos: ST1, ST2, ST3 e ST8, sendo ST2 de maior prevalência. Os PNHs estão frequentemente infectados por *Blastocystis* sp. e estudos anteriores relataram a incidência de sete subtipos (ST1-ST5, ST8, ST10) nestes animais (Abe et al., 2003; Rivera, 2008; Parkar et al., 2007, 2010; Stensvold et al., 2009b; Petrasova et al., 2011; Alfellani et al., 2013a; Zanzani et al., 2015; Vaisusuk et al., 2017).

Embora ST8 tenha apresentado a segunda maior prevalência neste grupo de animais, este subtipo parece ser mais dificilmente encontrado em primatas, sendo relatado em poucos estudos (Helenbrook et al., 2015; Stensvold et al., 2009b; Alfellani et al., 2013; Cian et al., 2017). No entanto, este subtipo foi relatado em cuidadores de PNHs sugerindo a disseminação zoonótica entre primatas e seus cuidadores (Stensvold et al., 2009). Uma vez que as populações de PNHs do presente estudo são de cativeiro (zoológicos e criação laboratorial) e mantêm contato próximo com os humanos, os subtipos encontrados podem circular em ambos os hospedeiros. A transmissão entre animais e humanos pode ocorrer, principalmente, em jardins zoológicos e santuários de animais (Parkar et al., 2007, 2010; Stensvold et al., 2009b; Yoshikawa et al., 2009) e é provável que os animais se infectem consumindo água contendo cistos de *Blastocystis* sp. A deficiência na infra-estrutura nos jardins zoológicos pode causar a contaminação da água e dos alimentos consumidos pelos animais desempenhando um papel importante na transmissão deste parasito no ambiente do zoológico, inclusive para os cuidadores de animais.

Segundo Parkar e colaboradores (2010), provavelmente, os cuidadores de animais em zoológicos adquiriram a infecção através do contato com a água contaminada durante as tarefas rotineiramente realizadas, como por exemplo, a limpeza das jaulas dos animais. E, além do contato entre humanos e animais, é possível que o contato entre os próprios animais no zoológico facilite a transmissão e circulação de *Blastocystis* sp. É importante mencionar que os dados gerados sobre os subtipos de *Blastocystis* sp. com animais de zoológico e de laboratório devem ser interpretados com cautela, uma vez que estes animais podem estar infectados com STs que estão expostos em cativeiro, podendo não ser o mesmo ST que circula em populações de primatas na natureza (Alfellani et al., 2013b). E, além disso, os estudos de primatas em seu habitat natural são escassos.

No que concerne os isolados de aves do estudo, a prevalência foi de 21%. Estudos prévios realizados, incluindo o Brasil, relataram a ocorrência de 34,6% e 95% neste grupo de animais (Lee & Stenzel, 1999; Bergamo do Bomfim & Machado do Couto, 2013). As galinhas domésticas, patos, gansos e avestruzes foram considerados reservatórios potenciais de transmissão de *Blastocystis* sp. a humanos (Noel et al., 2005; Stensvold et al., 2009b; Alfellani et al., 2013; Cian et al., 2017). De fato, ST6 e ST7 foram concebidos como os típicos "subtipos aviários" (Noel et al., 2005; Stensvold et al., 2007; Forsell et al., 2012), porém nenhum dos dois isolados de aves analisados neste estudo foram identificados como ST6 ou ST7. Nossos resultados mostram a ocorrência de ST1 e ST5 em um ganso (*Anser anser*) e em uma galinha (*Gallus gallus*) coletados em um sítio em São Pedro da Serra e em um sítio em Niterói, respectivamente. É importante ressaltar que ambos os cuidadores permitiam que as aves circulassem livremente durante o dia em contato com outros animais, promovendo a circulação de subtipos de *Blastocystis* sp. entre os diferentes animais, além de manterem contato próximo com o fazendeiro e sua família.

Ademais, é importante ainda mencionar sobre a negatividade de amostras provenientes dos felinos examinados no estudo. Estudos realizados com gatos domésticos têm destacado a ausência de *Blastocystis* sp. corroborando nossos resultados (Chuong et al., 1996; Roberts et al., 2013). O mesmo ocorre com os cães, cuja prevalência é normalmente baixa, variando entre 1,3% e 14,5% (Ruaux & Stang, 2014; Wang et al., 2013; Belleza et al., 2015; La Sala et al., 2015; Osman et al., 2015), tendo sido relatada também a ausência de infecção por *Blastocystis* sp em diversos trabalhos (Abe et al., 2002; Roberts et al., 2013; David et al., 2015; Oliveira-Arbex et al., 2018).

Em relação ao único animal invertebrado analisado no estudo, as baratas, foram obtidas apenas duas amostras positivas de *Blastocystis* sp., apesar do grande número de espécimes fecais analisados. Para explicar esse achado, deve-se considerar a grande diversidade na composição da microbiota intestinal desses insetos (Perez-Cobas et al., 2015) que, possivelmente, comprometeu o crescimento de *Blastocystis* sp. nas culturas, levando à competição nutricional e, conseqüentemente, a condições inadequadas para o desenvolvimento deste parasito. Assim, o único isolado de barata caracterizado no presente estudo foi identificado como ST4, o que contradiz os achados de Yoshikawa e colaboradores (2007, 2016), no qual os autores não conseguiram identificar o subtipo e relataram a presença de um novo clado, que compreendia apenas os isolados de *Blastocystis* sp. deste inseto. Portanto, o isolamento adicional de animais pecilotérmicos

pode também ajudar na elucidação da diversidade genética deste parasito, tão polimórfico geneticamente (Yoshikawa et al., 2016).

É importante ainda salientar que todas as amostras de fezes do estudo foram cultivadas em meio de cultura para o diagnóstico do parasito. O cultivo de *Blastocystis* sp. é uma tarefa complicada, sendo importante equilibrar o crescimento do parasito e de bactérias (Clark & Stensvold, 2016). No entanto, a cultura *in vitro* ainda é considerada o padrão-ouro na detecção deste organismo, ao contrário do esfregaço fecal e da PCR diretamente das fezes (Santos & Rivera, 2013). A detecção por PCR direto das fezes é pouco sensível (Termmathurapoj et al., 2004), tendo em vista que alguns ácidos biliares inibem a ação da DNA polimerase, interferindo no processo de amplificação (Walderich et al., 2007). Os inibidores fecais da PCR incluem polissacarídeos complexos, sais biliares, produtos da degradação da hemoglobina, compostos polifenólicos, dentre outros (Stauffer et al., 2008).

De fato, algumas amostras não foram amplificadas com este alvo, sobretudo os isolados de répteis – uma espécie de jabuti coletado no Rio Zoo (9/9 - 100%) - de marsupiais (12/21 - 57,1%) e de roedores (4/7 - 57,1%), além de 34 isolados (34/130 - 26,1%) de Sumidouro. Considerando que os répteis consomem matéria vegetal em suas dietas (Moskovits & Bjorndal, 1990), este pode ser um fator importante para explicar o porquê dos isolados deste grupo de animais não amplificarem.

Todavia, também não é descartada a hipótese de serem novos subtipos, principalmente em relação aos isolados de répteis. De acordo com Yoshikawa e colaboradores (2016), a análise filogenética dos isolados de *Blastocystis* sp. de diferentes répteis, incluindo jabutis, foram alocados a dois clados adicionais, não agrupando a nenhum clado de subtipo conhecido até então. É relevante ainda mencionar que, quando Santin e colaboradores (2011) desenharam os iniciadores que amplificam uma região do gene SSU-RNAr, os autores utilizaram poucos isolados de diferentes hospedeiros. Logo, a existência de polimorfismo na região de anelamento dos iniciadores também impossibilitaria a amplificação do fragmento.

Ademais, é intrigante ainda pensar que uma amostra de humano da região de Sumidouro não tenha sido identificado o subtipo. A amostra 210 não agrupou a nenhum clado dos subtipos conhecidos, embora pareça estar relacionada ao subtipo 7, assim como também observado no método de distância genética. Contudo, são necessárias análises adicionais para confirmar a existência de um novo ST. Um caso semelhante foi relatado em estudo realizado em seis países da América do Sul, no qual foi observada a ocorrência

de “*novel-ST*”, incluindo no Brasil. Neste caso, a análise filogenética mostrou que os “*Novel-ST*” desse estudo estavam relacionados a ST1 (Ramirez et al., 2016). Além disso, recentemente, um estudo realizado na China identificou possíveis novos STs em cinco isolados de diferentes animais. Através da reconstrução filogenética utilizando dois métodos distintos, máxima verossimilhança e distância genética, os autores constataram que os isolados não agruparam a nenhum subtipo conhecido, nomeando-os de ST18-ST22 (Zhao et al., 2017).

Até o momento, não existe um consenso muito bem definido sobre quão diferente uma sequência precisa ser para considerar que seja um novo subtipo. De acordo com Stensvold (2013b), se uma sequência *barcode* de *Blastocystis* sp. não coincidir com as depositadas no Genbank, apresentando percentuais de identidade inferiores a 97-98%, é sugerido que o gene SSU-RNAr seja completamente sequenciado e submetido a análises filogenéticas, incluindo pelo menos a análise de distância genética e de máxima verossimilhança. Segundo Clark (2013), uma sequência que difere no mínimo em 4% de outra pode ser considerada como um novo subtipo com confiança, mas se este valor for menor que 1,5% é preciso ter cautela, sendo provável que seja apenas o intervalo de variação dentro de um ST conhecido. Por exemplo, a variação genética dentro do subtipo 3 pode chegar a cerca de 3% (Clark, 2013). Porém, ainda assim, o autor sugere que as sequências que apresentarem valores dentro deste intervalo de variação podem ser, provisoriamente, atribuídos novos números de subtipos, estando sujeitos a confirmação em amostragem adicional. No entanto, se observarmos os gráficos de distância genética obtidos no presente estudo, é possível perceber que esses valores são muito maiores do que os descritos por Clark (2013). No caso de ST1 e ST3, a diferença genética *intra*-subtipos é de quase 10%, o que corresponde ao dobro do valor sugerido pelo autor. E se considerarmos a diferença genética entre os distintos subtipos, este valor chega a ser seis vezes maior. Além disso, ao analisarmos os gráficos de distância genética das 17 cópias do SSU-RNAr, no qual foram comparadas as variabilidades genéticas entre as cópias utilizando as diferentes regiões do gene, é possível perceber certa variação entre elas. No caso dos iniciadores desenhados por Santin e colaboradores (2011), a variabilidade genética entre as cópias atinge 3,5%, quase o valor sugerido por Clark (2013) para se considerar novo subtipo. Em contrapartida, as regiões descritas por Scicluna (2006) e Parkar (2010) apresentaram percentuais mais baixos (1% e >2%, respectivamente). Estas diferenças podem ser atribuídas pelas características das regiões escolhidas pelos autores,

sendo algumas mais conservadas e outras mais variáveis, o que pode gerar resultados dúbios quando comparados.

A diversidade genética *intra*-STs parece variar drasticamente entre os subtipos. As sequências de SSU-RNAr de ST4 são consideradas homogêneas geneticamente em comparação as de ST3. Os autores sugerem que ST4 tenha sido inserido na população humana mais recentemente do que ST3, resultado este que pode ser suportado pela baixa frequência de ST4 nesta população, ao contrário de ST3 (Stensvold et al., 2011). De fato, as reconstruções filogenéticas mostram os demais subtipos divergindo de ST3, sendo, portanto, o mais antigo na escala evolutiva, justificando, inclusive, a maior prevalência deste subtipo em estudos epidemiológicos.

Em um estudo feito comparando ST10 com os demais subtipos, a maior distância genética encontrada foi 14,8% quando comparado a ST7, em contrapartida foi observado uma variação de 2,4% entre as próprias sequências de ST10. Estes resultados foram obtidos utilizando os iniciadores desenvolvidos por Scicluna e colaboradores (2006). No entanto, a mesma análise também foi feita utilizando os iniciadores desenvolvidos por Stensvold e colaboradores (2006), no qual os valores de distância genética encontrados foram completamente diferentes, compreendendo 11,9% e 0,4%, respectivamente (Stensvold et al., 2009b). Assim, diferentes metodologias podem gerar resultados controversos, o que evidencia ainda mais a necessidade de padronização de métodos para a identificação de *Blastocystis* sp.

Ademais, 8,7% do total de amostras positivas para *Blastocystis* sp. foram excluídas das análises, devido à baixa qualidade do sequenciamento, compreendendo sequências curtas ou com múltiplos picos irregulares com a mesma altura ou alturas diferentes, sobrepostos uns aos outros. Este resultado poderia ser explicado por possíveis problemas durante o sequenciamento das amostras, além de quantidade insuficiente de DNA molde na reação de sequenciamento. Durante o processo de purificação do produto amplificado, existem etapas de lavagem do produto em coluna contendo membrana de sílica, que pode levar a perda de parte do DNA. Considerando que não foram feitas quantificações dos produtos da PCR após a purificação, é provável que parte dessas amostras tinham, de fato, baixa quantidade de DNA, resultando em sequências de baixa qualidade.

Em relação as infecções mistas, a prevalência relatada no presente estudo foi de 7,8% e 6,7% nos hospedeiros animais e humanos, respectivamente. As infecções mistas são comuns em seres humanos e também já foram relatadas em animais, porém não são

identificadas por PCR convencional e sequenciamento (Li et al., 2007; Souppart et al., 2009; Huelsenbeck et al., 2005; Meloni et al., 2011; Alfellani et al., 2013; El Safadi et al., 2014; Wang et al., 2014; Scalan et al., 2015; Badparva et al., 2015; Helenbrook et al., 2015). As infecções simples são tipicamente relatadas, ao passo que infecções mistas são reportadas em menos da metade dos estudos, causando a subestimação dos dados e comprometendo a validade dos resultados e a interpretação de estudos epidemiológicos (Alfellani et al., 2013).

É importante ainda salientar que, o conjunto de iniciadores comumente utilizados para a detecção dos STs de *Blastocystis* sp. em amostras com infecções mistas é insuficiente para os subtipos já descritos na população humana, tendo em vista que o método permite a detecção de ST1 a ST7. E, além disso, apresentam baixa sensibilidade, já tendo sido relatado falhas na amplificação de isolados de *Blastocystis* sp. (Stensvold et al., 2013a). Segundo Clark e colaboradores (2013), os iniciadores “subtipos-específicos” amplificaram apenas um dos dois clados de ST4, ou seja, a especificidade dos iniciadores não foi verdadeiramente explorada. Considerando que existe variabilidade *intra*-subtipos, a amplificação das variantes dos STs poderia ser comprometida, o que justificaria a falha na amplificação de alguns isolados no presente estudo. É relevante ainda destacar que a falha na padronização dos iniciadores STs-específicos (ST2, ST4 e ST5) pode ser explicado pela utilização de nomenclaturas distintas, tendo em vista que Yoshikawa e colaboradores (2004) descreveram esta metodologia antes do consenso em relação a terminologia de *Blastocystis* sp. em 2007 (Stensvold et al., 2007). Ao analisarmos os subtipos que são amplificados pelos iniciadores descritos por Yoshikawa e colaboradores (2004), é possível perceber que eles não são correspondentes a nova nomenclatura de subtipos.

Outro ponto importante que deve ser considerado para a análise das infecções mistas no presente estudo é que, a presença de mais de um subtipo pode ser resultado da exposição repetida a material fecal contaminado cotidianamente, além do contato próximo com múltiplas fontes de infecção, como, por exemplo, outros animais e humanos. Este fato foi observado nas populações estudadas, aumentando ainda mais a complexidade nos estudos epidemiológicos de *Blastocystis* sp.

Por fim, ao nosso conhecimento, as informações sobre a epidemiologia molecular de *Blastocystis* sp. na América do Sul ainda são escassas, principalmente em relação a ocorrência e caracterização molecular deste parasito em diferentes hospedeiros e sua diversidade genética. Nossos resultados revelaram grande diversidade de subtipos de

Blastocystis sp., além de um possível novo subtipo, reforçando a necessidade de realização de mais estudos sobre a sua diversidade. Quanto mais estudos sobre este tema forem desenvolvidos, mais informações sobre variabilidade genética, regiões polimórficas serão obtidas e, conseqüentemente, metodologias de identificação deste parasito poderão ser aprimoradas, melhorando a eficiência de detecção.

Ademais, considerando a extensa variabilidade genética existente entre alguns subtipos, é possível inclusive, que sejam espécies distintas e que estas apresentem perfis diferenciados de especificidade de hospedeiro, potencial zoonótico e, sobretudo, de virulência. Por exemplo, a distância genética reportada entre duas espécies de amebas, *Entamoeba histolytica* e *E. distar*, sabendo que a primeira é patogênica e a segunda, até o momento, é considerada comensal, é de 1,7% para esse mesmo alvo (Novati et al., 1996). Se compararmos com a distância genética obtida entre as próprias sequências de ST3 (~10%) no presente trabalho, é possível perceber que este valor é quase 6 vezes maior. Assim, é provável que a contínua controvérsia sobre a patogenicidade de *Blastocystis* sp., seja, em parte, devido aos estudos comparando variantes distintas deste parasito. Desta forma, para reexaminar o papel de *Blastocystis* sp. na capacidade de causar doença ou não, seria necessário também levar em consideração essa diversidade genética.

Nosso trabalho foi o primeiro a gerar e analisar isolados de *Blastocystis* sp. de hospedeiros animais no Brasil, sobretudo em distintos lugares do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. É notável que há uma considerável sobreposição entre os subtipos e sua distribuição nos hospedeiros, o que sugere a ocorrência de transmissão zoonótica e baixa especificidade de hospedeiro. No entanto, é importante que se intensifiquem os estudos eco-epidemiológicos deste parasito, utilizando um maior número de amostras de diferentes hospedeiros, principalmente no território brasileiro. Desta forma, acreditamos que esses achados poderão auxiliar em estudos futuros que explorem ainda mais as características genéticas de *Blastocystis* sp. em diferentes hospedeiros no Brasil, além de contribuir para a identificação mais eficiente das fontes de infecção, propiciando em última instância, a melhor compreensão dos aspectos biológicos deste parasito e preenchendo as diversas lacunas no conhecimento sobre este organismo.

6.2 Demais alvos moleculares

Recentemente, Poirier e colaboradores (2014) descreveram um novo marcador que mostrou ser um alvo em potencial para a identificação dos subtipos de *Blastocystis* sp. Este marcador está localizado no gene da menor subunidade do RNA ribossômico na organela mitocôndria-like (MLO-DNAr) deste parasito. Os genes mitocondriais evoluem a taxas superiores aos genes nucleares, o que se torna uma vantagem para estudos de táxons muito próximos evolutivamente (DeSalle et al., 1987; Monteiro & Pierce, 2001). E, além de haver várias organelas por célula, o que facilita a subtipagem quando a carga parasitária é baixa, o MLO-DNAr existe em apenas uma cópia no genoma circular, diferentemente do SSU-RNAr (Wawrzyniak et al., 2008; Poirier et al., 2014), evitando possíveis problemas de interpretação dos eletroferogramas.

Desta forma, para a análise comparativa dos alvos moleculares no presente estudo, 59 isolados previamente identificados pelo SSU-RNAr também foram caracterizados pelo MLO-DNAr, dos quais 69,5% apresentaram resultados concordantes quanto aos subtipos encontrados com ambos os alvos. Embora mais da metade dos isolados analisados pertençam ao mesmo subtipo, é possível observar percentuais de identidade inferiores a 97%. Assim como o alvo SSU-RNAr, Stensvold e colaboradores (2012) observaram que o MLO-DNAr também apresenta variabilidade genética intra-subtipos, inclusive capaz de formar clados distintos dentro dos subtipos analisados. Devido a baixa quantidade de sequências depositadas no banco de dados para este alvo, é provável que durante a busca no BLAST, a sequência obtida foi a mais próxima da nossa sequência, justificando, portanto, o baixo percentual de identidade.

Em relação aos resultados discordantes observados no presente estudo, compreendendo 28,8% das amostras comparadas com os alvos SSU-RNAr e MLO-DNAr, é importante evidenciar que Poirier e colaboradores (2014) também relataram resultados diferentes com ambos os alvos. Os autores encontraram oito isolados com resultados diferentes e atribuíram à pequena quantidade de clones sequenciados (dois clones) e, conseqüentemente, a falta de detecção de co-infecções. Assim, uma justificativa plausível para explicar o número de resultados discordantes no presente estudo pode também ser atribuída à existência de infecções mistas, tendo em vista que a clonagem molecular não foi realizada para confirmar ou descartar a existência da mesma. Por exemplo, Meloni e colaboradores (2012) sequenciaram 50 clones de um isolado e destacaram a presença de três diferentes subtipos (ST2, ST3 e ST4), com dominância

quantitativa de ST3 em relação a ST4 e ST2. Neste caso, o número de clones utilizado pelos autores foi suficiente para detectar a infecção mista por três subtipos, embora não se saiba, até o momento, uma quantidade ideal de clones para este tipo de análise. Desta forma, é importante que se realize estudos objetivando definir um número suficiente de clones para serem sequenciados, considerando ainda a dominância de alguns subtipos sobre os outros, a fim de que se possa estudar a ocorrência de infecções mistas em uma população, sem a subnotificação de certos subtipos.

Em relação ao espaçador transcrito interno, este inclui duas regiões: ITS-1 e ITS-2, separados pelo gene RNAr 5.8S. Estas regiões evoluem mais rapidamente do que regiões codificadoras, uma vez que substituições que ocorrem em espaçadores podem ser consideradas mutações neutras, sem quaisquer restrições (Villalobos et al., 2014). Para diferenciação entre espécies, as regiões de ITS1-2 do DNAr são consideradas excelentes marcadores, principalmente no caso de parasitos eucariotos (Pelandakis et al., 2000). Recentemente, a análise de ITS1-2 identificou duas variantes de subtipo 1 de *Blastocystis* (Villalobos et al., 2014), previamente descritas pela análise da sequência de código de barra (Ramirez et al., 2014).

Sendo assim, para este estudo, foi realizada a análise deste alvo, a fim de obter o resultado comparativo da subtipagem dos isolados com os diferentes alvos. No entanto, é importante ressaltar que existe apenas dois trabalhos publicados sobre a caracterização de isolados de *Blastocystis* sp com ITS1-2 (Villalobos et al., 2014; Compean et al., 2018). Além disso, Villalobos e colaboradores (2014) encontraram apenas os subtipos 1, 2, 3 e somente uma sequência de ST7. Desta forma, se torna inviável a comparação dos resultados dos demais alvos moleculares, tendo em vista a pouca quantidade de sequências depositadas no Genbank. Por esse motivo, a maioria do percentual de identidade das sequências deste alvo foi baixa no BLAST, provavelmente por serem subtipos que não estão depositados no banco de dados. Assim, são necessários mais estudos utilizando o marcador ITS1-2 para aumentar o número de sequências dos demais subtipos para futuras análises comparativas.

Nos últimos anos, a comunidade científica tem se interessado cada vez mais por estudos relacionados à epidemiologia molecular de *Blastocystis* sp. Entretanto, ainda existem muitas lacunas no conhecimento sobre este parasito, como o modo de transmissão, patogenicidade, especificidade do hospedeiro, ciclo de vida e sua biologia. É importante considerar que os dados ainda são surpreendentemente inconclusivos, e em vários casos, contraditórios, devido, principalmente, a falta de padronização de uma

metodologia de identificação deste organismo. Desta forma, se faz necessário o desenvolvimento de mais estudos com o intuito de estabelecer um método-padrão de detecção e caracterização de *Blastocystis* sp., que possa fornecer informações contundentes acerca da sua taxonomia. Nesse momento, é primordial entender a variabilidade *intra* e *inter* subtipos, sem o viés dos diferentes alvos utilizados na literatura, para que se possa compreender se os subtipos são espécies distintas ou são apenas variantes/cepas do mesmo subtipo. Assim, uma vez conhecida essa heterogeneidade genética de *Blastocystis* sp., estudos sobre potencial patogênico e zoonótico, assim como associação a doenças e outras importantes questões sobre a sua biologia poderão fornecer resultados mais confiáveis e específicos.

VII. CONCLUSÕES

- A partir da caracterização molecular de isolados de *Blastocystis* sp de diferentes hospedeiros e regiões do estado do Rio de Janeiro, nossos resultados relatam, de forma substancial, a diversidade genética deste organismo;
- Os subtipos 1-4 foram detectados em ambas as populações humanas estudadas, sendo o primeiro relato de ocorrência de ST4 em humanos no Brasil;
- ST8 foi detectado na população humana e em duas espécies de animais na região de Sumidouro, sugerindo a transmissão zoonótica;
- O subtipo mais prevalente em ambas as populações humanas foi o subtipo 3;
- A divergência genética de um isolado em relação aos subtipos descritos suporta a hipótese de que constitua um novo subtipo a ser descrito;
- Esta foi a primeira investigação e caracterização molecular de isolados de *Blastocystis* sp. oriundos de hospedeiros animais no Brasil;
- É o primeiro relato da identificação do subtipo 8 em roedores, do ST1 em marsupiais, do 4 e 8 em suínos e do subtipo 4 em barata (*Blatella germânica/Periplaneta americana*) na literatura;
- Através da detecção de diferentes subtipos em hospedeiros animais e humanos, é notável que existe uma sobreposição entre os subtipos de *Blastocystis* sp. nos diferentes hospedeiros, denotando baixa especificidade;
- Considerando os altos percentuais de distância genética observados entre os subtipos de *Blastocystis* sp, é possível assumir que são espécies distintas;
- ST1 e ST3 são os subtipos que apresentam maior variabilidade intra-STs;
- A subtipagem dos isolados de *Blastocystis* sp. com os alvos MLO-DNAr, SSU-RNAr e IT1-2 produziram resultados discordantes.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hafeez EH, Ahmad AK, Kamal AM, Abdellatif MZ, Abdelgelil NH. In vivo antiprotozoan effects of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) extracts on experimentally infected mice with *Blastocystis* spp. *Parasitol Res* 2015; 114(9):3439-44.
- Abdel-Hameed DM, Hassanin OM. Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype 3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitol Res* 2011; 109(2):321-327.
- Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Khan AH, Ahmed A, Surin J, Mak JW. Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasit Vectors* 2013; 6:86
- Abe N, Nagoshi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa H. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol* 2002; 106:203–212.
- Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol Res* 2003; 89:393–39
- Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet Parasitol* 2004; 120: 235-242.
- Abu-Madi M, Aly M, Behnke JM, Clark CG, Balkhy H. The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasit Vectors* 2015; 8:465.
- Adl S, Simpson A, Farmer M, Andersen R, Anderson O, Barta J, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 2005; 52:399–451.
- Aguiar JIA, Gonçalves AQ, Sodr  FC, Pereira SR, B ia MN, Lemos ERS, et al. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the state of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:631-634.
- Ajjampur SSR, Tan KSW. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. – Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitol Int* 2016; 66(6), 772-779.
- Ajjampur SS, Png CW, Chia WN, Zhang Y, Tan KS. Ex Vivo and In Vivo Mice Models to Study *Blastocystis* spp. Adhesion, Colonization and Pathology: Closer to Proving Koch's Postulates. *Plos One* 2016 10; 11(8):e0160458.
- Alexeieff A. Sur la nature des formations dites “kystes de *Trichomonas intestinalis*.” *C R Soc Biol* 1911; 71, 296–298.
- Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 2013a; 164:497–509.

Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ESU, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop* 2013b; 126(1), 11–18.

Amato Neto V, Alarcón RSR, Gakiya E, Ferreira CS, Bezerra RC, Santos AG. Elevada Porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo, SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 354-356.

Amin OM. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 66(6), 799–803.

Angelici MC, Nardis C, Scarpelli R, Ade P. *Blastocystis hominis* transmission by non-potable water: a case report in Italy. *New Microbiol* 2018; 41(1), 173–177.

Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, Yano T, Hasegawa M. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of Stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J Eukaryot Microbiol* 2002; 49:42–53.

Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitol* 2003; 126:1–9.

Audebert C, Even G, Cian A, *Blastocystis* Investigation G, Loywick A, Merlin S, Viscogliosi E and Chabe M. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep* 2016; 6, 25255.

Badparva E, Sadraee J, Kheirandish F. Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from cattle in Khorramabad, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8: e14810.

Bálint A, Dóczi I, Bereczki L, Gyulai R, Szűcs M, Farkas K, et al. Do not forget the stool examination! - cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitol Res* 2014; 113:1585–90.

Barros, A. A. M. 2008. Análise florística e estrutural do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói E Maricá, RJ, Brasil. Tese de Doutorado. Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 237p.

Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, Vugt VM, et al. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis* 2013; 13:389.

Batista MW, Pierrotti LC, Abdala E, Clemente WT, Girao ES, Rosa DRT, et al. Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. *Trop Med Int Health* 2011; 16:1134–1142.

Belleza ML, Cadacio JL, Borja MP, Solon JA, Padilla MA, Tongol-Rivera PN, et al. Epidemiologic study of *Blastocystis* infection in an urban community in the Philippines. *J Environ Public Health* 2015; 2-15; 894297.

- Belleza MLB, Reyes JCB, Tongol-Rivera PN, Rivera WL. Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from human and canine hosts in an urban community in the Philippines. *Parasitol Int* 2016; 65: 291–294.
- Ben Abda I, Maatoug N, Ben Romdhane R, Bouhelmi N, Zallegua N, Aoun K, Viscogliosi E, Bouratbine A. Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* sp. in healthy individuals in the Tunis Area, Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* 2017; 96, 202–204.
- Bergamo do Bomfilm TC, Machado do Couto MC. Morphological diagnosis and occurrence of *Blastocystis* spp. obtained from the stool samples of domestic bird species commercialized in municipal markets. *J Parasitol Vector Biol* 2013; 5: 20–26.
- Böhm-Gloning B, Knobloch J, Walderich B. Five subgroups of *Blastocystis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Trop Med Int Health* 1997; 2(8):771–778.
- Boonjaraspinyo S, Boonmars T, Kaewsamut B, Ekobol N, Laummaunwai P, Aukkanimart R, et al. A cross-sectional study on intestinal parasitic infections in rural communities, northeast Thailand. *Korean J Parasitol* 2013; 51(6), 727–734.
- Boorum KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, et al. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors* 2008; 1(1): 40.
- Boreham PFL, Stenzel DJ. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology and epizootiology. *Adv Parasitol* 1993; 32, 1–70.
- Borges JD, Alarcón RSR, Neto VA, Gakiya E. Parasitoses intestinais de indígenas da comunidade Mapuera (Oriximiná, Estado do Pará, Brasil): Elevada prevalência de *Blastocystis hominis* e encontro de *Cryptosporidium* sp e *Cyclospora cayetanensis*. *Ver Soc Bras Med Trop* 2009; 42(3): 348–350.
- Branco N, Leal DAG, Franco RMB. A Parasitological Survey of Natural Water Springs and Inhabitants of a Tourist City in Southeastern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12(5), 410–417.
- BRASIL. Contagem Populacional. Censo Demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2010.
- BRASIL. Contagem Populacional. Censo Demográfico 2016. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2016.
- Brittan F. Report of a series of microscopical investigations on the pathology of cholera. *London Med Gaz* 1849; 9:530- 542.
- Brumpt E. Côleite à *Tetramitus mesnili* (Wenyon 1910) et côleite à *Trichomonas intestinalis* Leuchart 1879. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. *Bull Soc Pathol* 1912; Exot 5:725–730.

- Cabrine-Santos M, Cintra EoN, Carmo RA, Nascentes GA, Pedrosa AL, Correia D, Oliveira-Silva MB. Occurrence of *Blastocystis* spp. in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015; 57:211-214.
- Cáceres NC. Diet of three marsupials (Mammalia, Didelphimorphia) in southern Brazil. *Mammal Biol.* 2004; 69: 430-433.
- Campus Fiocruz Mata Atlântica. [acesso em 18 de julho 2018]. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/campus-fiocruz-mata-atlantica>.
- Carbajal JA, Villar J, Lanuza MD, Esteban JG, Munoz C, Borrás R. Clinical significance of *Blastocystis hominis* infection: epidemiologic study. *Med Clin* 1997; 108: 608–612.
- Carter TS, Encarnação CD. Characteristics and Use of Burrows by four species of armadillos in Brazil. *J Mammal* 1983; 64:103-108.
- Casero RD, Mongi F, Sánchez A, Ramírez JD. *Blastocystis* and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta Trop* 2015; 148:156–61.
- Cassano N, Scoppio BM, Loviglio MC, Vena G. Remission of delayed pressure urticaria after eradication of *Blastocystis hominis*. *Acta Derm Venereol* 2005; 1(1):1.
- Chen JL, Vaudry WL, Kowalewska K, Wenman WM. Lack of serum immune response to *Blastocystis hominis*. *Lancet* 1987; 2, 1021.
- Chen TL, Chan CC, Chen HP, Fung CP, Lin CP, Chan WL, Liu CY. Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69:213–216.
- Chen XQ, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Yap EH. In vitro encystation and excystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitol* 1999; 118(2): 151-60.
- Cheng H, Haung Z, Lan W, Kuo T, Shin J. Intestinal parasites in a vietnamese female. *Kaohsiung J Med Sci* 2006; 22(4): 166–170.
- Chuong LS, Suresh K, Mak JW, Init I, Kathijah O. Prevalence of *Blastocystis* in animals from domesticated surroundings. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996; 27, 850–852.
- Cian A, El Safadi D, Osman M, Moriniere R, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, et al. Molecular Epidemiology of *Blastocystis* sp. in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk. *Plos One* 2017; 12: e0169659.
- Clark CG, Van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol* 2013; 82:1–32.
- Clark CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 87:79–83.

Clark CG, Stensvold CR. *Blastocystis*: Isolation, Xenic Cultivation, and Cryopreservation. *Curr Protoc Microbiol* 2016; 43(1): 20A.1.1-20A.1.8

Compean JMC, Bustos-Martínez J, Martínez IB, Dosta MCM, Hamdan-Parida A. Detection and typing of *Blastocystis* spp. in oysters (*Crassostrea virginica*) collected in Actopan River, Chachalacas, Veracruz. *Int J Fish Aquat Stu* 2018; 6(2): 511-514.

Coyle C, Varughese J, Weiss L, Tanowitz H. *Blastocystis*: to treat or not to treat. *Clin Infect Dis* 2012; 54(1):105–110.

D'Alfonso R, Santoro M, Essi D, Monsia A, Kaboré Y, Glé, et al. *Blastocystis* in Côte d'Ivoire: molecular identification and epidemiological data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36(11), 2243–2250.

Dagci H, Kurt O, Demirel M, Mandiracioglu A, Aydemir S, Saz U, et al. Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. *Iran J Parasitol* 2014; 9(4), 519–529.

D'Andrea PS, Maroja LS, Gentile R, Cerqueira R, Maldonado Júnior A, Rey L. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitology* (London. Print), Cambridge University Press. 2000. v.120, pp 573-582.

David EB, Guimaraes S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, Moraes Nardi AR, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of Sao Paulo, Brazil. *Parasit Vectors* 2015; 8:103.

De Carli GA. *Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, et al. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol* 2011; 12:R29.

Derelle R, López-García P, Timpano H, Moreira D. A phylogenomic framework to study the diversity and evolution of stramenopiles (= heterokonts). *Mol Biol Evol* 2016; 33: 2890–2898.

DeSalle R, Freedman T, Prager EM, Wilson AC. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J Mol Evol* 1987; 26, 157–164.

Dinleyici EC, Eren M, Dogan N, Reyhanioglu S, Yargic ZA, Vandenplas Y. Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* or metronidazole in symptomatic children with *Blastocystis hominis* infection. *Parasitol Res* 2011; 108:541–545.

Distritos de Nova Friburgo. Prefeitura de Nova Friburgo. [acesso em 18 de julho de 2018]. Disponível em: <http://novafriburgo.rj.gov.br/nova-friburgo/dados-gerais>

- Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, et al. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. PLoS One 2010; 5(11):e15484.
- Dominguez-Marquez MV, Guna R, Munoz C, Gomez-Munoz MT, Borrás R: High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol Res 2009; 105:949–955.
- Duda A, Stenzel DJ, Boreham PFL. Detection of *Blastocystis* sp. in domestic dogs and cats. Vet Parasitol 1998; 76: 9-17.
- Dunn LA, Boreham PF, Stenzel DJ. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. Int J Parasitol 1989; 19:43–56.
- Eida OM, El-Shafei HA, Nomeir YA, El Safhi MB. In vivo and in vitro efficacy of nigella sativa aqueous extract on *Blastocystis hominis*. J Egypt Soc Parasitol 2016; Apr; 46(1):27-34.
- Eisenberg FJ, Redford HK. Mammals of the Neotropics, Vol. 3: Ecuador, Bolivia, Brazil. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. 1999. pp 624.
- El Safadi D, Cian A, Nourrisson C, Pereira B, Morelle C, Bastien P, et al. Prevalence, Risk Factors for Infection and Subtype Distribution of the Intestinal Parasite *Blastocystis* sp. from a Large-Scale Multi-Center Study in France. BMC Infect Dis 2016; 16(1), 451.
- El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I et al. Children of Senegal river basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. BMC Infect Dis 2014; 14: 164
- Elwakil HS, Hewedi IH. Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. Parasitol Res 2010; 107: 685-689.
- Engsbro AL, Stensvold CR. *Blastocystis*: to treat or not to treat...but how? Clin Infect Dis 2012; 55: 1431-1432.
- Eroglu F, Koltas IS. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. Parasitol Res 2010; 107:841–845
- Eymael D, Schuh GM, Tavares RG. Padronização do diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas de coloração. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43: 309–12.
- Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, de Freitas MB, Almendra R, Santana P, Sousa D. Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11, e0005445.
- Fayer R, Santin M, Macarisin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. Parasitol Res 2012; 111:1349–1355.

Ferreira HB, Passaglia LMP, Zaha A. *Biologia molecular básica*. 3.ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003; 421p.

Fréalte E, El Safadi D, Cian A, Aubry E, Certad G, Osman M, et al. Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerg Infect Dis* 2015; 21:91–4.

Freitas SR, Astúa de Moraes D, Santori RT, Cerqueira R. Habitat preference and food use by *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae) in a restinga forest at Rio de Janeiro. *Ver Bras Biol* 1997; 57:93–98.

Gardner AL. *Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, and London, United Kingdom. 2007. vol. 1, pp 669.

Garmendia J, Morey P, Bengoechea JA. Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions. *Eur Respir J* 2012;39(2):467-77.

Gassama A, Sow PS, Fall F, Camara P, Gueye-N'diaye A, Seng R, Samb B, M'Boup S, Aidara-Kane A: Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Int J Infect Dis* 2001; 5(4):192–198.

Gaythri T, Suresh K, Subha B, Kalyani R. Identification and characterisation of heat shock protein 70 in thermal stressed *Blastocystis* sp. *PLoS One*. 2014; 2;9(9):e95608.

Gentile R, Costa-Neto SF, Gonçalves MM, Bonecker ST, Fernandes FA, Garcia JS, Barreto MG, Soares MS, D'Andrea PS, Peralta JM, Rey L An ecological field study of the water-rat *Nectomys squamipes* as a wild reservoir indicator of *Schistosoma mansoni* transmission in an endemic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1):111-7.

Giacometti A, Cirioni O, Fiorentini A, Fortuna M, Scalise G. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999, 18:436–9.

Gil FF, Busatti HGNO, Cruz VL, Santos JFG, Gomes MA. High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. *Pathog Glob Health* 2013; 107(6): 320-4.

Guimarães S, Sogayar MIL. *Blastocystis hominis*: occurrence in children and staff members of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88: 427-429, 1993.

Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52:696–704.

GuoHong W, YiShu X, GaoLu C, GuangMing L, MaoZhuang L, JingLin Z. Investigation of an epidemic outbreak of blastocystiasis. *Chin J Parasit Dis Contr* 2000; 13:25–7.

- Gupta R, Parsi K. Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. *Australas. J Dermatol* 2006; 47, 117–119.
- Haresh K, Suresh K, Khairul Anus A, Samiathan S. Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Trop Med Int Health* 1999; 4:274–277.
- Helenbrook WD, Shields WM, Whipps CM. Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*, living in close proximity to one another. *Parasitol Res* 2015; 114:2517–25.
- Heydari-hengami M, Hamedi Y, Najafi-asl M. Prevalence of Intestinal Parasites in Food Handlers of Bandar, Iran *J Public Health* 2018; 47(1), 111–118.
- Heyland K, Friedt M, Buehr P, Braegger CP. No advantage for antibiotic treatment over placebo in *Blastocystis hominis*-positive children with recurrent abdominal pain. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54(5): 677-679.
- Hillis DH, Dixon MT. Ribosomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic Inference. *Q Rev Biol* 1991; 66(4), 411-453.
- Ho L, Armugam A, Jeyaseelan K, Yap E, Singh M. *Blastocystis* elongation factor-1a: genomic organisation, taxonomy and phylogenetic analysis. *Parasitol* 2000; 121, 135–144.
- Horiki N, Maruyama M, Fujita Y, Yonekura T, Minato S, Keneda Y. Epidemiologic survey of *Blastocystis hominis* infection in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 370-374.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 2001; 294 (5550):2310–2314.
- Hulisz D. The burden of illness of irritable bowel syndrome: current challenges and hope for the future. *J Manag Care Pharm* 2004, 10(4):299-309.
- Hussain R, Jaferi W, Zuberi S, Baqai R, Abrar W, Ahmed A, Zaman V. Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56, 301–5.
- Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res* 2008; 102, 853–860.
- Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, et al. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol Int* 2007; 56: 107–112.
- INEA, 2013. Trilhas: Parque Estadual da Pedra Branca/Instituto Estadual do Ambiente/Organizado por André Ilha, Patrícia Figueiredo de Castro, Alexandre Marau Pedroso,

- Aline Schneider – Rio de Janeiro: INEA, 2013. 366 p. [acesso em 18 de julho 2018]. Disponível em: http://www.femerj.org/wp-content/uploads/guia_trilhas_pepb.pdf
- Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos. [acesso em 18 de julho 2018]. Disponível em: <https://www.ictb.fiocruz.br/>
- Janarthanan S, Khoury N, Antaki F. An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. *Endoscopy* 2011; 43: E185–E186.
- Jantermtor S, Pinlaor P, Sawadpanich K, Pinlaor S, Sangka A, Wilailuckana C, et al. Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. *Parasitol Res* 2015; 112(4), 1781–1786.
- Kaneda Y, Horiki N, Cheng X, Tachibana H, Tsutsumi Y. Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai J Exp Clin Med* 2000; 25(2), 51-56.
- Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* 2007; 5:1–38.
- Katsarou-Katsari A, Vassalos CM, Tzanetou K, Spanakos G, Papadopoulou C, Vakalis N. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm Venereol* 2008; 88(1): 80-81.
- Katsumata M, Yoshikawa H, Tokoro M, Mizuno T, Nagamoto T, Hendaro J, Asih PBS, Rozi IE, Kimata I, Takami K, Syafruddin D. Molecular phylogeny of *Blastocystis* isolates from wild rodents captured in Indonesia and Japan. *Parasitol Res* 2018; doi: 10.1007/s00436-018-5973-9.
- Kaya S, Cetin ES, Aridogan BC, Arikan S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye Parazitoloj Derg* 2007; 31:184–187
- Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? *World J Gastroenterol* 2014; 20, 14105–14125.
- Khademvatan S, Masjedizadeh R, Rahim F, Mahbodfar H, Salehi R, Yousefi-Razin E, Foroutan M. *Blastocystis* and irritable bowel syndrome: Frequency and subtypes from Iranian patients. *Parasitol Int* 2017; 66(2):142-145.
- Khalili B, Imani R, Boostani S. Intestinal parasitic infections in chronic psychiatric patients in Sina hospital Shahre-Kord, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2013; 6(3):252–5.
- Kick G, Rueff F, Przybilla B. Palmoplantar pruritus subsiding after *Blastocystis hominis* eradication. *Acta Derm Venereol* 2002; 82(1): 60.
- Kumarasamy V, Kuppusamy UR, Samudi C, Kumar S. *Blastocystis* sp. subtype 3 triggers higher proliferation of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitol Res* 2013; 112(10): 3551-3555.

- La Sala LF, Leiboff A, Burgos JM, Costamagna SR. Spatial distribution of canine zoonotic enteroparasites in Bahia Blanca, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2015; 47, 17–24.
- Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2(2), 136.
- Lakhanpal S, Cohen SB, Fleischmann RM. Reactive arthritis from *Blastocystis hominis*. *Arthritis Rheum* 1991; 34:251–3.
- Leder K, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Wolfe R. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20:1390–1394.
- Lee L, Chye T, Karmacharya B, Govind S. *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasit Vectors* 2012; 5(1), 130.
- Lee MG, Stenzel DJ. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitol Res* 1999; 85, 109–117.
- Lee MG, Rawlins SC, Didier M, DeCeulaer K. Infective arthritis due to *Blastocystis hominis*. *Ann Rheum Dis* 1990; 49(3):192-3.
- Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M. Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79:401–6.
- Lepczynska M, Chen WC, Dzika E. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? *Int J Dermatol*. 2016; 55: 259–266.
- Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S. Population Biology, Evolution, and Infectious Disease: Convergence and Synthesis. *Science* 1999; 283(5403): 806-809.
- Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, et al. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res* 2007; 102:83–90.
- Lidell ME, Moncada DM, Chadee K, Hansson GC. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 13; 103(24):9298-303.
- Lintong PM, Sambuaga MK, Tambajong EH. Acute suppurative appendicitis with *Blastocystis hominis*. *Asian Pac J Trop Dis* 2012; 2:965–8.
- Londoño AL, Mejía S, Gómez-Martin JE. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitism in preschool children from urban area of Calarcá, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)* 2009; 11:72–81.

- Long HY, Handschack A, König W, Ambrosch A. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitol Res* 2001; 87:1029–30.
- Longstreth G, Thompson W, Chey W, Houghton L, Mearin F, Spiller R. Functional bowel disorders. *Gastroenterol* 2006; 130: 1480-1491.
- Lukes J, Stensvold CR, Jirku-Pomajbíková K, Wegener Parfrey L. Are Human Intestinal Eukaryotes Beneficial or Commensals? *Plos Pathog* 2015; 13;11(8): e1005039.
- Mahmoud MS, Saleh WA. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. *J Egypt Soc Parasitol* 2003; 33:13–30.
- Maldonado Junior A, Gentile R, Fernandes-Moraes CC, D’Andrea OS. Helminth communities of *Nectomys squamipes* naturally infected by exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. *J Helminthol* 2006; 80:369-375.
- Malheiros AF, Stensvold CR, Clark C, Braga GB, Shaw JJ. Short report: Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon Region, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85:1050–1053.
- Mares MA, Ernest KA, Gettinger DD. Small mammal community structure and composition in the Cerrado Province of Central Brazil. *J Trop Ecol* 1986; 2:289-300.
- Masuda A, Sumiyoshi T, Ohtaki T, Matsumoto J. Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from dairy cattle in Kanagawa, Japan. *Parasitol Int* 2018; S1383-5769(18): 30098-9. doi: 10.1016/j.parint.2018.07.005.
- Méabed EMH, El-Sayed NM, Abou-Sreea AIB, Roby MHH. Chemical analysis of aqueous extracts of *Origanum majorana* and *Foeniculum vulgare* and their efficacy on *Blastocystis* spp. *Cysts. Phytomed* 2018; 1; 43:158-163. doi: 10.1016/j.phymed.2018.04.017.
- Mehlhorn H. *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912: are there different stages or species? *Parasitol Res* 1988; 74: 393–395.
- Melo GB, Paula FM, Malta FM, Maruta CW, Criado P, Castilho VLP, Gonçalves EMN, Espirito Santo MC, Gryscek RCB. Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil. *Parasitol Open* 2017; <http://dx.doi.org/10.1017/pao.2017.3>.
- Meloni D, Poirier P, Mantini C, Noel C, Gantois N, Wawrzyniak I, et al. Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitol Int* 2012; 61(4), 719–722.

- Meloni D, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Chabe M, Delhaes L, Dei-Cas E, Delbac F, Luigi Fiori P, Di Cave D, Viscogliosi E. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res* 2011; 109(3): 613-619.
- Miné JC, Rosa JA. Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the Parasitology Laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University, Araraquara. *Ver Soc Bras Med Trop* 2008; 41(6), 565–569.
- Mirjalali H, Abbasi MR, Naderi N, Hasani Z, Mirsamadi ES, Stensvold CR et al. Distribution and phylogenetic analysis of *Blastocystis* sp. subtypes isolated from IBD patients and healthy individuals in Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36(12), 2335–2342.
- Mirza H, Tan KS. *Blastocystis* exhibits inter-and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res* 2009; 104, 355–361.
- Mirza H, Wu Z, Teo JD, Tan KS. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cell Microbiol* 2012; 14, 1474–1484.
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Ng GC, Yap EH. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol Res* 1997; 83: 319–325.
- Moghaddam DD, Ghadirian E, Azami M. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitol Res* 2005; 96(4): 273-275.
- Mohamed AM, Ahmed MA, Ahmed SA, Al-Semany SA, Alghamdi SS, Zagloul DA. Predominance and association risk of *Blastocystis hominis* subtype I in colorectal cancer: a case control study. *Infect Agent Cancer* 2017; 12(1), 21.
- Monteiro A, Pierce NE. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1alpha gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2001; 18, 264–281.
- Moosavi A, Haghghi A, Mojarad EN, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, Kazemi B, Zali MR. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitol Res* 2012; 111(6): 2311-2315.
- Moskovits DK, Bjorndal KA. Diet and Food Preferences of the Tortoises *Geochelone carbonaria* and *G. denticulata* in Northwestern Brazil. *Herpetologica* 1990; 46(2), 207-218.
- Nagel R, Traub RJ, Allcock RJN, Kwan MMS, Bielefeldt-ohmann H. Comparison of faecal microbiota in *Blastocystis*-positive and *Blastocystis*-negative irritable bowel syndrome patients. *Microbiome*, 2016; 4:47.

Nakamura Y, Hashimoto T, Yoshikawa H, Kamaishi T, Nakamura F., Okamoto K, Hasegawa M. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* that contains cytochrome-free mitochondria, inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1 alpha. *Mol Biochem Parasitol*, 1996; 77, 241–245.

Nascimento SA, Moitinho MLR. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga city, Paraná State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2005; 47: 213-217.

Navarro C, Dominguez-Marquez MV, Garijo-Toledo MM, Vega-Garcia S, Fernandez Barredo S, Perez-Garcia MT, Garcia A, Borrás R, Gomez-Munoz M. High prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs reared under intensive growing systems: frequency of ribotypes and associated risk factors. *Vet Parasitol* 2008; 153:347–358.

Nigro L, Larocca L, Massarelli L, Patamia I, Minniti S, Palermo F, et al. A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. *J Travel Med* 2003; 10:128-30.

Nimer E. *Climatologia do Brasil* 2.ed. ed: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais; 1989.

Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E. Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species and Zoonosis Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity. *J Clin Microbiol* 2005; 43:348–355.

Noradilah SA, Moktar N, Anuar TS, Lee IL, Salleh FM, Manap SNA, et al. Molecular epidemiology of blastocystosis in Malaysia: Does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community? *Parasit Vectors*, 2011; 10(1), 1–12.

Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, Nkoud Mongo C, Wawrzyniak I, Cian A, et al. *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *FEMS Microbiol Ecol* 2014; 90(1): 326-330.

Novati S, Sironi M, Granata S, Bruno A, Gatti A, Scaglia M, Bandi C. Direct sequencing of the PCR amplified SSU rRNA gene of *Entamoeba dispar* and the design of primers for rapid differentiation from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol* 1996; 112, 363–369.

Ok UZ, Girginkardeşler N, Balcioglu C, Ertan P, Pirildar T, Kilimcioğlu AA. Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(11): 3245-3247

Oliveira-Arbex AP, Boarato É, Guimarães S. Infection, Genetics and Evolution *Blastocystis* genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. *Infect Genet Evol* 2018; 57:59–63.

Osman M, Bories J, El Safadi D, Poirel MT, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, et al. Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Vet Parasitol* 2015; 214, 167–170.

Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLOS Negl Trop Dis* 2016; 10(3), e0004496.

Ozyurt M, Kurt O, Mølbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int* 2008; 57: 300-306.

Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, Leite YLR, Costa LP, Siciliano S, Kierulff MCM, Mendes SL, Tavares VC, Mittermeier RA, Patton JL. Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2nd Edition. Occasional Papers in Conservation Biology, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 2012. pp 76.

Palasuwan A, Palasuwan D, Mahittikorn A, Chiabchalard R, Combes V, Popruk S. Subtype distribution of *Blastocystis* in communities along the Chao phraya river, Thailand. *Korean J Parasitol* 2016; 54, 455–460.

Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, et al. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infect Genet Evol* 2015; 31:296–9.

Parija SC, Jeremiah SS. *Blastocystis*: taxonomy, biology and virulence. *Trop Parasitol* 2013; 3(1):17–25.

Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, Morris K, Thompson RCA. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitol* 2007; 134:359–367.

Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RC. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol* 2010; 169:8–17.

Patterson DJ. Stramenopiles: chromophytes from a protistan perspective. In: Green, J.C., Leadbeater, B. S. C. & Diver, W. L. (ed.). *The chromophyte algae: problems and perspectives*. Oxford, Clarendon Press, p. 357-379, 1989.

Pavanelli FM, Kaneshoma AN, Uda CF, Colli CM, Falavigna-Guilherme AL, Gomes MI. Pathogenicity of *Blastocystis* sp. to the gastrointestinal tract of mice: relationship between inoculum size and period of infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015; 57, 467–472.

- Pelandakis M, Serre S, Pernin P. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. J Eukaryot Microbiol 2000; 47(2):116-21.
- Pérez-Cobas AE, Maiques E, Angelova A, Carrasco P, Moya A, Latorre A. Diet shapes the gut microbiota of the omnivorous cockroach *Blattella germanica*. FEMS Microbiol Ecol 2015; 91(4), 1–14.
- Petrasova J, Uzlikova M, Kostka M, Petrzekova KJ, Huffman MA, Modry D. Diversity and host specificity of *Blastocystis* in synanthropic primates on Rubondo Island, Tanzania. Int J Parasitol 2011; 41:1113–1120.
- Poirier P, Meloni d, Nourrisson C, Wawrzyniak I, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F. Molecular subtyping of *Blastocystis* spp. using a new rDNA marker from the mitochondria-like organelle genome. Parasitol 2014; 141(05):1-12.
- Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. PLoS Pathog 2012; 8: e1002545.
- Popruk S, Udonsom R, Koombapong K, Mahittikorn A, Kusolsuk T, Ruangsittichai J, Palasuwan, A. Subtype distribution of *Blastocystis* in thai-myanmar border, Thailand. Korean J Parasitol, 2015; 53(1), 13–19.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol 2008; 23:1253-1256.
- Poulsen CS, Efunshile AM, Nelson JA, Stensvold CR. Epidemiological aspects of *Blastocystis* colonization in children in Ilero, Nigeria. Am J Trop Med Hyg 2016; 95(1), 175–179.
- Prefeitura de São Gonçalo, RJ. [acesso em 18 de julho 2018]. Disponível em: <http://www.saogoncalo.rj.gov.br/>
- Prefeitura do Rio de Janeiro. Centro de Atenção Psicossocial (CAPS). [acesso em 18 de julho 2018]. Disponível em: <http://www.rio.rj.gov.br/web/sms/caps>
- Puthia MK, Lu J, Tan KS. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in a NF-kappaB-dependent manner. Eukaryot Cell 2008; 7(3): 435-43.
- Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KS. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. Parasitol Res 2005; 97, 386–389.
- Quigley EM, Locke GR, Mueller-Lissner S, Paulo LG, Tytgat GN, Helfrich I, Schaefer E. Prevalence and management of abdominal cramping and pain: a multinational survey. Aliment Pharmacol Ther 2006, 24(2): 411-419.

- Rafiei A, Rahdar M, Nourozi RV. Isolation and identification of parasitic protozoa in sampled water from the southwest of Iran. *Jundishapur J Health Sci* 2014; 6:e23462.
- Rajamanikam A, Govind SK. Amoebic forms of *Blastocystis* spp. - evidence for a pathogenic role. *Parasit Vectors* 2013; 6(1), 295.
- Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38(5):996-1047.
- Ramirez JD, Sanchez A, Hernandez C, Florez C, Bernal MC, Giraldo JC, Reyes P, Lopez MC, Garcia L, Cooper PJ, Vicuna Y, Mongi F, Casero RD. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect Genet Evol* 2016; 41:32–35.
- Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol* 2014; 22:223–228.
- Rangel-Martínez C, Jiménez-González DE, Martínez-Ocaña J, Romero-Valdovinos M, Castillo-Rojas G, Espinosa-García AC, et al. Identification of opportunistic parasites and helminth ova in concentrated water samples using a hollow-fibre ultrafiltration system. *Urban Water J* 2015; 12:440–4.
- Rebolla MF, Silva EM, Gomes JF, Falcão AX, Rebolla MV, Franco RM. High prevalence of *Blastocystis* spp. infection in children and staff members attending public urban schools in São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016; 58, 31.
- Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 588-592.
- Rivera WL. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Vet Parasitol* 2008; 156(3–4), 178–182.
- Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D, “Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples,” *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84(2), 308–312.
- Roberts T, Stark, D, Harkness J, Ellis J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Vet Parasitol* 2013; 196(1–2), 85–89.
- Rodrigues-Fuentes GB, Cedillo-Rivera R, Fonseca-Linan R, Arguello-Garcia R, Munoz O, Ortega-Pierres G, Yopez-Mulia L. *Giardia duodenalis*: analysis of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(6), 693-696.

- Rokaya MB, Uprety Y, Poudel RC, Timsina B, Münzbergová Z, Asselin H, Tiwari A, Shrestha SS, Sigdel SR. Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. *J Ethnopharmacol* 2014;158 Pt A: 221-229
- Rostami A, Riahi SM, Haghghi A, Saber V, Armon B, Seyyedtabaei SJ. The role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res* 2017; 116(9):2361-2371.
- Ruau CG, Stang BV. Prevalence of *Blastocystis* in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PLoS One* 2014; 9, e107496.
- Salim H, Kumar G, Vellayan S, Mak J, Anuar A, Init I, Vennila G, Saminathan R, Ramakrishnan K. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitol Res* 1999; 85:1032–1033.
- Santin M, Gomez-Munoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res* 2011; 109:205–212.
- Santos HLC, Sodr e FC, Macedo HW. *Blastocystis* sp. in splenic cysts: causative agente or accidental association? A unique case report. *Parasit Vectors*, 7(1), 207.
- Santori RT, Ast ua de Moraes D, Cerqueira R. Diet composition of *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Marsupialia, Didelphoidea) in southeastern Brazil. *Mammalia* 1995; 59(4): 511-516.
- Santori RT, Cerqueira R, Kleske CC. Anatomia e eficiência digestiva em *Philander opossum* e *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae) em rela o ao h bito alimentar. *Rev Brasil Biol* 1995; 55: 323– 329
- Santos HJ, Rivera WL. Kinetic analysis of antibody responses to *Blastocystis hominis* in sera and intestinal secretions of orally infected mice. *Parasitol Res* 2009; 105, 1303-1310.
- Saygili EI, Akcay T, Konukoglu D, Papilla C. Glutathione and glutathione-related enzymes in colorectal cancer patients. *J Toxicol Environ Health A*. 2003; 66(5):411-5.
- Scanlan PD, Knight R, Song SJ, Ackermann G, Cotter PD. Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* in family units living in the United States. *Infect Genet Evol* 2016; 45, 95–97.
- Scanlan PD, Stensvold CR, Rajili -Stojanovi  M, Heilig HG, De Vos WM, O’Toole PW, Cotter PD. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 2014; 90: 326–330.
- Scanlan PD. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol* 2012; 28: 327–334.
- Schar F, Inpankaew T, Traub RJ, Khieu V, Dalsgaard A, Chimnoi W, Chhoun C, Sok D, Marti H, Muth S and Odermatt P. The prevalence and diversity of intestinal parasitic

infections in humans and domestic animals in a rural Cambodian village. *Parasitol Int* 2014; 63, 597–603.

Schmulson M, Ortiz O, Santiago-Lomeli M, Gutierrez-Reyes G, Gutierrez-Ruiz MC, Robles-Diaz G, Morgan D. Frequency of functional bowel disorders among healthy volunteers in Mexico City. *Dig Dis* 2006, 24(3–4):342-347.

Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 2006; 157: 77–85.

Secretaria de Estado do Ambiente - Plano Regional de Saneamento com base municipalizada nas modalidades água, esgoto e drenagem urbana dos municípios de: Areal, Carmo, São José do Vale do Rio Preto, Sapucaia, Sumidouro e Teresópolis. 2014. [acesso em 10 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://comitepiabanha.org.br/caracterizacao-municipal/teresopolis.pdf>.

Sekar U, Shanthi M. *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Trop Parasitol* 2013; 3(1): 35-39.

Selangor, Malaysia for improved prison management. *BMC Infect Dis* 2015; 15:467.

Sharif M, Daryani A, Asgarian F, Nasrolahei M. Intestinal parasitic infections among intellectual disability children in rehabilitation centers of northern Iran. *Res Devel Disab* 2010; 31(4), 924–928.

Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 1996; 380(6573):398.

Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 1995; 81(5):446-50.

Sio SW, Puthia MK, Lee AS, Lu J, Tan KS. Proteases activity of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2006; 99(2): 126-30.

Song J, Yin Y, Yuan Y, Tang H, Ren G, Zhang H, Li Z. First genotyping of *Blastocystis* sp. in dairy, meat, and cashmere goats in northwestern China. *Acta Trop* 2017; 176: 277–282.

Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res* 2010; 106:505–11.

Souppart L, Sanciu G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res* 2009; 105:413–21.

Stauffer SH, Birkenheuer AJ, Levy MG, Marr H, Gookin JL. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Tritrichomonas foetus* in feline stool specimens by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20(5):639–641.

- Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol* 2012; 12(2), 263–273.
- Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol* 2009b; 39: 473–479.
- Stensvold CR, Arendrup MC, Nielsen HV, Bada A, Thorsen S. Symptomatic infection with *Blastocystis* sp. subtype 8 successfully treated with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008; 102(3): 271-274.
- Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KE, Nielsen HV. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84, 883–885.
- Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int* 2016; 65(6): 763-771.
- Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KE, Arendrup MC, Nielsen HV, Molbak K. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect* 2009a; 137: 1655–1663.
- Stensvold CR, Nielsen HV, Molbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis*—diagnostic limitations. *Trends Parasitol* 2009c; 25:23–9.
- Stensvold CR, Smith HV, Nagel R, Olsen KE, Traub RJ. Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: reality or delusion? *J Clin Gastroenterol* 2010; 44(2):85–90.
- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends Parasitol* 2007; 23: 93–96.
- Stensvold CR. Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *J Clin Microbiol* 2013a; 51: 190–194.
- Stensvold CR, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup C. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol* 2006; 92:1081–7.
- Stensvold CR. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop Parasitol* 2013b; 3(1), 26.
- Stenzel DJ, Boreham PFL. A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol* 1991; 21, 613–615
- Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 563–584.

- Sun T, Katz S, Tanenbaum B, Schenone C. Questionable clinical significance of *Blastocystis hominis* infection. *Am J Gastroenterol* 1989; 84:1543–7.
- Surangsrirat S, Thamrongwittawatpong L, Piyaniran W, Naaglor T, Khoprasert C, Taamasri P, et al. Assessment of the association between *Blastocystis* infection and irritable bowel syndrome. *J Med Assoc Thai* 2010; 93(6):119–124.
- Suresh K, Ng GC, Ramachandran NP, Ho LC, Yap EH, Singh M: In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 1993; 79:456–460.
- Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23, 509–511.
- Suresh K, Smith HV, Tan TC. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 5619–5620.
- Suresh K, Venilla GD, Tan TC, Rohela M. In vivo encystation of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2009; 104(6): 1373-1380.
- Swayne JG. An account of certain organic cells peculiar to the evacuations of cholera. *Lancet* 1849; ii:368-371.
- Taamasri P, Mungthin M, Rangsin R, Tongupprakarn B, Areekul W, Leelayoova S. Transmission of intestinal Blastocystosis related to the quality of drinking water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31:112–7.
- Takizawa MG, Falavigna D, Gomes ML. Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Parana, Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009; 51:31-5
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30:2725–2729.
- Tan K. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol* 2004; 126: 121-144.
- Tan KS, Mirza H, Teo JD, Wu B, Macary PA. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep* 2010; 12:28–35.
- Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Ver* 2008; 21(4): 639-665.
- Tan KSW, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: Hot spots in terra incognita. *Int J Parasitol* 2002; 32(7), 789–804.
- Tan TC, Ong SC, Suresh KG. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitol Res* 2009; 105, 1283-6.

Tan TC, Suresh KG. Amoeboid form of *Blastocystis hominis* – a detailed ultrastructural insight. *Parasitol Res* 2006; 99, 737–742.

Tejera B, Grados D, Martinez-Morillo M, Roure S. Reactive arthritis caused by *Blastocystis hominis*. *Reumatol Clin* 2013; 8(1), 50–51.

Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, et al. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Res* 2004; 93: 445–447.

Thergarajan G, Govind SK, Bhassu S. In vitro and in vivo thermal stress induces proliferation of *Blastocystis*. *Parasitol Res* 2018;117(1):177-187.

Tungtrongchitr A, Manatsathit S, Kositchaiwat C, Ongrotchanakun J, Munkong N, Chinabutr P, Leelakusolvong S, Chaicumpa W. *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2014; 35:705–710.

Udkow MP, Markell EK. *Blastocystis hominis*: prevalence in asymptomatic versus symptomatic hosts. *J Infect Dis* 1993; 168, 242–244.

Udonsom R, Prasertbun R, Mahittikorn A, Mori H, Changbunjong T, Komalamisra C, et al. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infect Genet Evol* 2018; S1567-1348(18): 30480-5. doi: 10.1016/j.meegid.2018.07.007.

Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, Chiodini PL, Edwards H, Köhler N et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(3):267-73.

Vaisusuk K, Saijuntha W, Sedlak S, Thanchomnang T, Pilap W, Suksavate W et al. *Blastocystis* subtypes detected in long-tailed macaques in Thailand-Further evidence of cryptic host specificity. *Acta Trop* 2018; 184:78-82. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.002>

Valsecchi R, Leghissa P, Greco V. Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection. *Acta Derm Venereol* 2004; 84(4): 322-323.

Van Hellemond JJ, Molhoek N, Koelewijn R, Wismans PJ, van Genderen PJ. Is paromomycin the drug of choice for eradication of *Blastocystis* in adults? *J Infect Chemother* 2013; 19(3): 545-548

Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *J Pediatr (Rio J)* 2015; 91(1): 6-21.

Vargas-Sanchez GB, Romero-Valdovinos M, Ramirez-Guerrero C, Vargas-Hernandez I, Ramirez-Miranda ME, Martinez-Ocaña J, et al. *Blastocystis* Isolates from Patients with Irritable Bowel Syndrome and from Asymptomatic Carriers Exhibit Similar

Parasitological Loads, but Significantly Different Generation Times and Genetic Variability across Multiple Subtypes. *PloS One* 2015; 10(4), e0124006.

Vassalos CM, Spanakos G, Vassalou E, Papadopoulou C, Vakalis N. Differences in clinical significance and morphologic features of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Am J Clin Pathol* 2010; 133, 251–258.

Vdovenko AA. *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitol Res* 2000; 86, 8–10

Velásquez V, Caldera R, Wong W, Cermeño G, Fuentes M, Blanco Y, et al. Elevada prevalência de blastocistose em pacientes do Centro de Saúde de Soledad, Estado Anzoátegui, Venezuela. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38:356-357.

Verma R, Delfanian K. *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *Am J Med Sci* 2013; 346 (1):80-81.

Vermelho AB, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM, Souza dos Santos, AL, Dias EPS, Nogueira de Melo AC. Biological Roles of Peptidases in Trypanosomatids. *Open Parasitol J* 2010; 4, 5-23.

Villalobos G, Orozco G, Lopez M, Lopez E, Córdoba A, Rangel L, et al. 2014. Suitability of internal transcribed spacers (ITS) as markers for the population genetic structure of *Blastocystis* spp. *Parasit Vectors* 2014; 7, 461.

Villanueva-Garcia C, Gordillo-Chavez EJ, Lopez-Escamilla E, Rendon-Franco E, Irais Muñoz-Garcia C, et al. Clarifying the Cryptic Host Specificity of *Blastocystis* spp. isolates from *Alouatta palliata* and *A. pigra* Howler Monkeys. *Plos one* 2017; 12(1):e0169637.

Villar J, Carbajal JA, Lanuza MD, Munoz C, Borrás R. In vitro encystation of *Blastocystis hominis*: a kinetics and cytochemistry study. *Parasitol Res* 1998; 84:54–58.

Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzen A, Stopsack K, Heinrich-Gräfe U, Pöhlmann C. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol Int* 2010; 59:469–471.

Walderich B, Bernauer S, Renner M, Knobloch J, Burchard GD. Cytopathic effects of *Blastocystis hominis* on Chinese hamster ovary (CHO) and adeno carcinoma HT29 cell cultures. *Trop Med Int Health* 1998; 3(5):385-90.

Wang W, Cuttall L, Bielefeldt-Ohmann H, Inpankaew T, Owen H, Traub RJ. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasit Vectors* 2013; 6, 215.

Wang W, Owen H, Traub RJ, Cuttall L, Inpankaew T, Bielefeldt-Ohmann H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet Parasitol* 2014; 203, 264-269.

- Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, Alaoui HE. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis* 2013; 1:167- 178.
- Wawrzyniak I, Roussel M, Diogon M, Couloux A, Texier C, Tan KS, et al. Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *International J Parasitol* 2008; 38, 1377–1382.
- Westram AM, Baumgartner C, Keller I, Jokela J. Are cryptic host species also cryptic to parasites? Host specificity and geographical distribution of acanthocephalan parasites infecting freshwater Gammarus. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 1083–1090.
- Whipps CM, Boorom K, Bermudez LE, Kent ML. Molecular characterization of *Blastocystis* species in Oregon identifies multiple subtypes. *Parasitol Res* 2010; 106, 827–83.
- WHO (World Health Organization). Microbial fact sheets. In: World Health Organization guidelines for drinking-water quality (WHO GDWQ). 4th ed. Malta: Gutenberg; 2011. p. 271–3
- Wilson DE, Reeder DM. Mammals species of the World: a taxonomic and geographic reference. 3rd ed. The Johns Hopkins University Press. 2005. vol. 2, pp 142.
- Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SKA, White- side TM. Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *Br J Biomed Sci* 2002; 59: 154–157.
- Wong KH, Ng GC, Lin RT, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KS. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res* 2008; 102: 663-670.
- Wongthamarin K, Siricharoenchai P, Ountaveesap M, Tangpanitansook S, Mungthin M, Piyaraj P. Drinking unboiled water is the risk factor of *Blastocystis* incidence in rural Community Thailand from prospective cohort study. *European Congress of Epidemiology. Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* 2018; 66S, S277–S437.
- Wu Z, Mirza H, Joshua Teo DW, Tan KSW. Strain-Dependent Induction of Human Enterocyte Apoptosis by *Blastocystis* Disrupts Epithelial Barrier and ZO-1 Organization in a Caspase 3- and 9-Dependent Manner. *BioMed Res Int* 2014a; 209163.
- Wu Z, Mirza H, Tan KSW. Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. *PLoS Negl Trop Dis* 2014b; 8:e2885.
- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R. Ir- ritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2010; 106: 1033-1038.

- Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo, Chen G. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol Res* 2006; 99, 597–601.
- Yan Y, Su S, Ye J, Lai X, Lai R, Liao H, et al. *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitol Res* 2007; 101:1527–1532.
- Yilmaz EA, Karaatmaca B, Sackesen C, Sahiner UM, Cavkaytar O, Sekerel BE, et al. Parasitic Infections in Children with Chronic Spontaneous Urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2016; 171, 130–135.
- Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu ZL, Takahashi Y. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1324–1330.
- Yoshikawa H, Abe N, Wu Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiol* 2004b; 150(5), 1147–1151.
- Yoshikawa H, Koyama Y, Tsuchiya E, Takami K. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol Int* 2016; 65:750-759.
- Yoshikawa H, Morimoto K, Nagashima M, Miyamoto N. A survey of *Blastocystis* infection in anuran and urodele amphibians? *Vet Parasitol* 2004a; 122; 91–102.
- Yoshikawa H, Wu Z, Howe J, Hashimoto T, Geok-Choo N, Tan KSW. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *J Eukaryot Microbiol* 2007; 54:33–37.
- Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Karim I, Hossain AMB, Zaman V, Haque R, Takahashi Y. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res* 2004c; 92: 22-29.
- Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, Kanbara H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol* 2009; 160:295–300.
- Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol Res* 2014d; 94(6), 391–396.
- Zaman V, Khan KZ. A concentration technique of obtaining viable cysts of *Blastocystis hominis* from faeces. *Pak Med Assoc* 1994; 44, 220-221.
- Zhang X, Zhang S, Qiao JY, Wu X, Zhao L, Liu Y, Fan X. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2012; 110 (3), 1165-72.

Zhao GH, Hu XF, Liu TL, Hu RS, Yu ZQ, Yang WB et al. Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qinling Mountains. *Parasitol Res* 2017; 116(8), 2327–2333.

Zierdt CH, Rude WS, Bull BS. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *Am J Clin Pathol* 1967; 48(5): 495-501.

Zierdt CH. *Blastocystis hominis*—past and future. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:61–79.

Zoológico do Rio de Janeiro. [acesso em 18 de julho 2018]. Disponível em: <http://www.riozoo.com.br/>

9. ANEXOS

9.1 Sequências do Genbank utilizadas no estudo

ST	Número de acesso (Genbank)	Referência
1	AB070993.1	Arisue et al. 2003
1	AB107968.1	Abe 2004
1	AM779059.1	Ozyurt et al. 2008
1	GU992415.1	Banaticla & Rivera 2011
1	KF242020.1	Bart et al. 2013
1	KF242028.1	Bart et al. 2013
1	KF242029.1	Bart et al. 2013
1	HQ641598.1	Santin et al. 2011
1	HQ641637.1	Santin et al. 2011
1	HQ641638.1	Santin et al. 2011
1	HQ641639.1	Santin et al. 2011
1	HQ641641.1	Santin et al. 2011
1	KC294174.1	El Safadi et al. 2013
1	KF306282.1	Abdulsalam et al. 2013
1	KF306285.1	Abdulsalam et al. 2013
1	KM116062.1	Sanpool et al. 2015
1	KM213445.1	Villalobos et al. 2014
1	KM213447.1	Villalobos et al. 2014
1	KU147328.1	Villegas-Gomez et al. 2016
1	KU147347.1	Villegas-Gomez et al. 2016
1	KU147344.1	Villegas-Gomez et al. 2016
1	KX358428.1	Sanpool et al. 2017
1	KX358439.1	Sanpool et al. 2017
1	KX358440.1	Sanpool et al. 2017
1	JQ665866.1	Thathaisong et al. 2013
2	AB070987.1	Arisue et al. 2003
2	AM712468.1	Stensvold et al. 2007
2	AM779050.1	Ozyurt et al. 2008
2	AM779052.1	Ozyurt et al. 2008
2	EU445487.1	Rivera et al. 2008
2	EU445491.1	Rivera et al. 2008
2	HQ641599.1	Santin et al. 2011
2	HQ641602.1	Santin et al. 2011
2	HQ641604.1	Santin et al. 2011
2	HQ641605.1	Santin et al. 2011
2	HQ641645.1	Santin et al. 2011
2	HQ641654.1	Santin et al. 2011
2	HQ641655.1	Santin et al. 2011
2	KF242000.1	Bart et al. 2013
2	KF242031.1	Bart et al. 2013
2	KF242033.1	Bart et al. 2013
2	KF242034.1	Bart et al. 2013
2	KF242037.1	Bart et al. 2013
2	KF306290.1	Abdulsalam et al. 2013
2	KU147358.1	Villegas-Gomez et al. 2016
2	KU147360.1	Villegas-Gomez et al. 2016
2	KF306292.1	Abdulsalam et al. 2013

2	KX358437.1	Sanpool et al. 2017
3	AB070992.1	Arisue et al. 2003
3	AF408425.1	Yoshikawa et al. 2004
3	AF408426.1	Yoshikawa et al. 2004
3	AM779023.1	Ozyurt et al. 2008
3	AM779044.1	Ozyurt et al. 2008
3	AY135402.1	Noel et al. 2003
3	EU679346.1	Whipps et al. 2010
3	HQ641607.1	Santin et al. 2011
3	HQ641609.1	Santin et al. 2011
3	HQ641611.1	Santin et al. 2011
3	HQ641650.1	Santin et al. 2011
3	HQ641656.1	Santin et al. 2011
3	JX132219.1	Hamad et al. 2012
3	KC294189.1	El Safadi et al. 2013
3	KF242061.1	Bart et al. 2013
3	KF242063.1	Bart et al. 2013
3	KF242066.1	Bart et al. 2013
3	KF242068.1	Bart et al. 2013
3	KF242069.1	Bart et al. 2013
3	KC138681.1	Engsbro & Stensvold 2012
3	KC294196.1	El Safadi et al. 2013
3	KU147369.1	Villegas-Gomez et al. 2016
3	KU147380.1	Villegas-Gomez et al. 2016
3	KU147384.1	Villegas-Gomez et al. 2016
3	KU147396.1	Villegas-Gomez et al. 2016
3	KT438703.1	Yoshikawa & Iwamasa 2016
3	KU147382.1	Villegas-Gomez et al. 2016
3	KX234625.1	Noradilah et al. 2017
4	HQ641621.1	Santin et al. 2011
4	HQ641622.1	Santin et al. 2011
4	HQ641652.1	Santin et al. 2011
4	JN682513.1	Stensvold et al. 2012
4	KX351987.1	Sanpool et al. 2017
4	KX352026.1	Sanpool et al. 2017
5	AB091249.1	Arisue et al. 2003
5	HQ641630.1	Santin et al. 2011
5	KF410602.1	Fayer et al. 2014
5	KF410603.1	Fayer et al. 2014
5	KF410611.1	Fayer et al. 2014
5	KF410608.1	Fayer et al. 2014
5	KF410610.1	Fayer et al. 2014
5	KF410595.1	Fayer et al. 2014
5	KF410597.1	Fayer et al. 2014
5	KF410605.1	Fayer et al. 2014
5	KF410609.1	Fayer et al. 2014
5	KX234613.1	Noradilah et al. 2017
6	AB107972.1	Abe 2004
6	AB091242.1	Arisue et al. 2003
6	AB091243.1	Arisue et al. 2003

6	AB091236.1	Arisue et al. 2003
6	AB091237.1	Arisue et al. 2003
6	AB091238.1	Arisue et al. 2003
6	AY135411.1	Noel et al. 2003
6	EU445485.1	Rivera et al. 2008
6	HQ641658.1	Santin et al. 2011
6	HQ641659.1	Santin et al. 2011
6	JQ665850.1	Thathaisong et al. 2013
7	AB070991.1	Arisue et al. 2003
7	AB091239.1	Arisue et al. 2003
7	AY590109.1	Noel et al. 2005
7	KF447157.1	Poirier et al. 2014
7	KF447158.1	Poirier et al. 2014
7	KF447159.1	Poirier et al. 2014
7	KF447160.1	Poirier et al. 2014
7	KF447161.1	Poirier et al. 2014
7	KF447162.1	Poirier et al. 2014
7	KF447163.1	Poirier et al. 2014
7	KF447164.1	Poirier et al. 2014
7	KF447165.1	Poirier et al. 2015
7	KF447166.1	Poirier et al. 2016
7	KF447167.1	Poirier et al. 2017
7	KF447168.1	Poirier et al. 2018
7	KF447169.1	Poirier et al. 2019
7	KF447170.1	Poirier et al. 2020
7	KF447171.1	Poirier et al. 2021
7	KF447172.1	Poirier et al. 2022
7	KF447173.1	Poirier et al. 2023
8	AB107971.1	Abe 2004
8	EU679348.1	Whipps et al. 2010
8	JQ974945.1	Petrasova et al. 2011
8	KX234613.1	Noradilah et al. 2017
8	KX234601.1	Noradilah et al. 2017
8	KX234612.1	Noradilah et al. 2017
9	AF408425.2	Yoshikawa et al. 2004
9	AF408426.2	Yoshikawa et al. 2004
9	KC138681.1	Engsbro & Stensvold 2012
9	KT438703.1	Yoshikawa & Iwamasa 2016
	<i>Proteromonas lacertae</i> U37108.1	Leipe, 1997

9.2 Artigo de revisão publicado “*Blastocystis* spp.: Current Status and Research Issues”

***Blastocystis* spp.: Current Status and Research Issues**

Carolina Valença Barbosa¹, Renata Costa Biot², Heloisa Werneck de Macedo³ and Helena Lúcia Carneiro Santos^{1*}

¹Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, Brazil

²Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia do Hospital Universitário Antônio Pedro/Universidade Federal Fluminense, Brazil

***Corresponding Author:** Helena Lúcia Carneiro Santos, Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Av. Brasil, Pavilhão Arthur Neiva, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: June 02, 2017; **Published:** June 28, 2017

Abstract

Despite *Blastocystis* being one of the most common parasite in the gastrointestinal tract of human, its role in disease remains inconclusive and its pathogenic potential is still a topic of discussions. However, it has been suggested that its pathogenicity could be directly related to its extensive genetic diversity. There are reports on its ability to cause disease, but none of them has shown a clear correlation between clinical symptoms and subtype. The scenario emerging from this enigmatic parasite, show us a large bottleneck in our knowledge, there is a deficit of basic information about the biology of the parasite, life cycle and the poor performance of animal models used, besides questions involving its zoonotic potential, taxonomic aspects and diagnostic. This review summarizes the current the state of the art on *Blastocystis* spp.

Keywords: *Blastocystis*; Subtypes; Intestinal Parasite; Blastocystosis; Genetic Diversity

Introduction

Blastocystis sp. is one of the most common parasite in the gastrointestinal tract of humans, often more common than other intestinal parasites such as *Entamoeba histolytica*-*Entamoeba dispar* complex, *Cryptosporidium*, and *Giardia lamblia* [1-3]. This parasite is cosmopolitan and its prevalence has been estimated at 1.5% to 10% in industrialized countries [4] and 30% to 76% in developing countries [5,6]. Nonetheless, much is still unknown regarding its biology and its role in disease. This is largely due to difficulties in identification of *Blastocystis*, related to the high polymorphism of this parasite, and to the lack of standardized and sufficiently sensitive detection or diagnoses methods.

Blastocystis prevalence is higher in areas lacking in sanitation infrastructure, especially drinking water and sewage, which led the World Health Organization (WHO) to include *Blastocystis* in its Water Sanitation Health program for control of tropical diseases in 2008. *Blastocystis* have been isolated not only in wastewater, but also in drinking water distribution system [7,8]. The source of infection of *Blastocystis* and mode of transmission have not been definitively established. Although it is currently proposed the mode of transmission is fecal-oral ingestion of food and water contaminated with cystic forms [9], the lack of personal and collective hygiene and care in the preparation of food, and direct contact with animals promote its transmission [7,10]. In Brazil, epidemiological studies aimed at other enteroparasites have demonstrated a high prevalence of *Blastocystis* sp. in all geographic regions. However, there are no studies on the occurrence of *Blastocystis* in different hosts or on genotypes circulating in the Brazilian territory. The molecular epidemiology of *Blastocystis* infections is still unknown in many parts of the world.

Overview of *Blastocystis* spp Hosts, Diversity and Taxonomic Classification

Blastocystis spp. occur in a variety of animals, including pigs, cattle, horses, non-human primates, birds, amphibians, reptiles, fish, arthropods, and annelids [11-16], indicating high host plasticity. One current classification places the genus *Blastocystis* in the kingdom

Chromista, subkingdom Chromobiota, infrakingdom Heterokonta, subphylum Opalimata, class Blastocystea [17,18], but the taxonomic position of *Blastocystis* remains controversial [14]. For many years, the parasite found in human feces was named *Blastocystis hominis*, but recent research suggests referring to *Blastocystis* from humans as *Blastocystis* sp., and isolates from other hosts as *Blastocystis* spp. Molecular studies based mainly on analysis of partial sequences of the small subunit ribosomal DNA (SSU-rDNA), as well as other partial sequences (SSU-rDNA of a similar like mitochondria like organelle, internal transcribed spacers (1 and 2) plus the 5.8S region and elongation factor-1 alpha) have shown that *Blastocystis* sp. has large genetic variability [19,20]. However, discrepant results were observed when different molecular markers were used for subtyping [21]. Currently, sequence analysis identified 17 subtypes, nine of which (ST1–ST9) found both in humans and animals [14,22], while the hosts of the other eight subtypes (ST10–ST17) are exclusively non-human. ST1 and ST3 have a high prevalence in humans [12], with ST3 the most prevalent [23], ST2 and ST4 regularly detected [24], and ST5–ST9 sporadically detected in humans. Subtypes circulating among animals and humans (ST1-ST9) show low host specificity, enabling transmission from animals to humans and vice versa [4]. Thus, transmission may occur through human-to-human, animal-to-human, and possibly, human-to-animal transmission [25-27]. *Blastocystis* spp. were found in captive animals and their caregivers, and infection rates among these professionals are significantly higher than in the general population [14,15]. Further study of the genetic variability of *Blastocystis* spp. may contribute to a better understanding of their biology, taxonomic position, and connection with other potential pathogenic and zoonotic organisms, and to the identification of the subtypes circulating in an area.

Morphology and Reproduction Forms

The parasite is generally spherical in shape and contains multiple nuclei, mitochondria like organelles, Golgi apparatus, lysosomes, and endoplasmic reticulum into a thin rim of cytoplasm surrounding the large central vacuole that often contains several granules. Although *Blastocystis* spp. are highly polymorphic organisms, isolates from humans and animals are morphologically similar [22,28]. To date, the following forms have been described: vacuolar, granular, amoeboid, multivacuolar, and cystic avacuolar [15,29]. Variation in size, shape and type of form of the parasite depends on the particular subtype, and the age and culture conditions [26] and there is no precise definition of each of these forms. Moreover, little is known about the transition from one morphological form to another along the life cycle [30,31] or in fact, about the life cycle and mode of transmission, which, so far, has only been demonstrated in the cystic form of the parasite [26,28]. Different life cycles were proposed for the species [26,32,33], probably due to the different types of reproduction of the parasite: binary division, endodyogeny, budding, plasmotomy and schizogony. In binary division, the mother cell splits into two identical daughter cells, while, in endodyogeny, the central vacuole of mother cell divides into two smaller cells forming a new membrane between the vacuoles of the two new cells. In budding, an outgrowth at a particular site of the cell develops into to a new cell, whereas, in plasmotomy, a prolongation of the plasma membrane separates into another cell. Lastly, schizogony occurs when a large cell with several core-like structures gives rise to other small cells. Binary division, endodyogeny and budding occur in feces, and plasmotomy and schizogony in culture.

Pathogenic Potential of *Blastocystis* spp

The pathogenic potential of *Blastocystis* spp. is still a topic of debate, as some individuals are asymptomatic [3]. Gut microbiota represent a relevant factor that may strongly interfere with the pathophysiology of the infections. The *Blastocystis*-intestinal microbiota relationship is poorly understood and investigated. For example, analyzes of meta-genomic data have revealed *Blastocystis* is highly associated with certain bacterial communities [34-36]. However, another metagenomic study support the hypothesis *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria and might be linked to the pathophysiology of Irritable Bowel Syndrome with constipation and intestinal flora imbalance [37]. Metagenomic analyzes, thus far point towards the need to discover whether bacterial community structure and function contributes *Blastocystis* colonization or vice versa. Moreover, it does raise a question 'can *Blastocystis* induce disease or contribute to dysbiosis or could *Blastocystis* merely serve as a biomarker of microbiota homeostasis'.

A positive correlation between protease activity and virulence has been demonstrated for a range of parasites including isolates of *Blastocystis*. Experimental studies suggest a relationship between subtypes and pathogenicity. For instance, the interaction of *Blastocystis* ST4 with rat intestinal epithelial cells (IEC6) caused apoptosis [38]. Conversely, interaction with a *Blastocystis* ST4 mouse isolate caused

no changes to cells from human epithelial cell line Caco-2, whereas an ST7 human isolate caused epithelial barrier dysfunction [39]. An *in vitro* experimental model developed to investigate the interaction of *Blastocystis* with epithelial cells of different lineages showed that the parasite can have immunomodulatory effects, including degradation of IgA, inhibition of iNOS, and upregulation of proinflammatory cytokines IL8 and GM-CSF in intestinal epithelial cells, and of IL1 β , IL6, and TNF α . Interactions with epithelial cell lines HT-29 and T-84 induced a significant increase in the release of cytokine IL-8 [40]. Additionally, the interaction of the parasite with epithelial cell line CHO correlated with a cytopathic effect [41]. However, Souppart and colleagues argue the infection is not associated with specific subtypes, but has multifactorial causes involving transmission routes, other potential pathogenic and zoonotic parasites, and the host immune profile [42]. Studies in rodent models and naturally infected pigs have shown that the parasite localizes to the lumen and mucosal surface of the large intestine mostly in the caecum and colon [43,44].

The lack of animal models to study experimental infection is a major bottleneck to study the pathogenicity of the parasite. It should be pointed out, however, that most studies were performed using different methodologies, making a comparative analysis of results across studies challenging. Thus, the validity of the data used to determine the pathogenic potential of *Blastocystis* should be questioned, as the different results across studies may have been due to differences in the diagnostic methods used.

Diagnosis and Their Limitations

Laboratory diagnosis depends on parasitological examination, using morphological criteria for the main *Blastocystis* forms. While direct examination of stool is a rapid and low-cost method, it has low sensitivity, as the presence of fecal debris makes it difficult to view the internal structures of the parasite. Thus, diagnosis usually employs techniques for concentration of the parasites by spontaneous sedimentation, such as the spontaneous sedimentation method of Hoffman, Pons & Janer (HPJ), or by centrifugation, such as the Ritchie technique. The highest diagnostic sensitivity is achieved by stool culture, but this is a laborious and time-consuming technique [19,45-46]. In short, there is currently no consensus on the best diagnostic method to be used. This, together with the polymorphism of the parasite and inexperience in morphological identification by many in the field is responsible for the conflicting results between different studies [47]. Understanding the dynamics of morphological variations of the parasite is essential for the development of accurate diagnostic methods, and to obtain reliable epidemiological data for the evaluation of the pathogenicity profile of and therapeutic efficacy against the parasite. So far, few studies have compared the sensitivity of different diagnostic methods for the identification of *Blastocystis* in feces.

Clinical Presentation and Treatment

Frequent clinical manifestations of blastocystosis (the infection caused by *Blastocystis* sp.) include abdominal pain, anal itching, flatulence, meteorism, nausea, vomiting, diarrhea, and eosinophilia [11], although infected individuals may be asymptomatic. Studies reporting rates of up to 73% of infection by *Blastocystis* in individuals with irritable bowel syndrome (IBS) [5,47] suggest a role for this parasite in the pathogenesis of IBS, a disease whose prevalence ranges from 35% to 45% in developing countries (36), and 5% to 24% in industrialized countries [49]. IBS may result from infection by *Blastocystis* [3], as *Blastocystis* antigens can cause inflammation in the intestinal mucosa [50] or the changes caused by IBS may create favorable conditions for development of the parasite in the intestinal tract [50]. The role of *Blastocystis* in IBS remains inconclusive, mainly due to our limited knowledge about the pathogenic potential and biology of this parasite.

Although considered an opportunistic pathogen in immunosuppressed individuals [51], a number of reports that have identified *Blastocystis* outside the gastrointestinal tract in immunocompetent patients support the proposal that this pathogen has invasive potential [45]. *Blastocystis* sp. was found in ulcerations of the mucosa without evidence of other causes [52], in appendicitis conditions associated with organ lumen obstruction by *Blastocystis* sp. [53], and in the synovial fluid of a patient with arthritis who experienced full resolution of clinical symptoms after treatment with metronidazole [9]. Indeed, recurrent episodes of arthritis caused by *Blastocystis* have been described in immunocompetent individuals [54]. Additionally, *Blastocystis* subtype 3 was identified in the appendix, recto-uterine pouch, and peritoneal fluid of a nine-year old child [48], and in splenic cysts in a young immunocompetent woman [55]. *Blastocystis* infec-

tion may also associate with urticaria in immunocompetent individuals [56]: several reports describe association of *Blastocystis* with skin rashes [57], albeit without establishing causality. The detection of the parasite in extraintestinal sites indicates that it is able to evade the immune system and settle in sites unfavorable for its development, considering that it preferentially parasitizes the gastrointestinal tract.

Currently, there is no consensus on what the most effective treatment is for *Blastocystosis*. A variety of agents that target anaerobic organisms or other protozoan parasites (Nitazoxanide, tinidazole, ornidazole, secnidazole, ketoconazole, pentamidine, quinine, iodoquinol, emetine, paromomycin and Sulphamethoxazole-trimethoprim) [50] have all been used, but metronidazole is most common treatment [58], with efficiency rates ranging from 33 to 100% depending on the dose administered. Its mode of action has not been fully elucidated [20]. Paromomycin has shown superior efficacy to metronidazole to treat *Blastocystosis* [59].

Concluding Remarks

This review examined the current state of scientific knowledge about *Blastocystis*. Several aspects about this protist, considered an emerging parasite, remain enigmatic, such as questions involving its role as a pathogen, zoonotic potential, taxonomic aspects life-cycle. The standardization of sensitive and specific diagnostic methods and the development of new animal models need to be addressed in order to provide a clearer picture of *Blastocystis* sp. biology and how these infections may impact global health.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Bibliography

1. Boorom KF, *et al.* "Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, Blastocystis, and asymptomatic infection". *Parasite and Vectors* 1.1 (2008): 40.
2. El Safadi D, *et al.* "Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of Blastocystis sp. ever observed worldwide". *BMC Infectious Disease* 14 (2014): 164.
3. Stensvold CR, *et al.* "Blastocystis: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite". *Epidemiology and Infection* 137.11 (2009): 1655-1663.
4. Bálint A, *et al.* "Do not forget the stool examination! - Cutaneous and gastrointestinal manifestations of Blastocystis sp. Infection". *Parasitology Research* 1113.4 (2014): 1585-1590.
5. Clark CG. "Extensive genetic diversity in Blastocystis hominis". *Molecular and Biochemical Parasitology* 87.1 (1997): 79-83.
6. Pandey PK, *et al.* "Prevalence and subtype analysis of Blastocystis in healthy Indian individuals". *Infection, Genetics and Evolution* 31 (2015): 296-299.
7. Leelayoova S, *et al.* "Drinking water: A possible source of Blastocystis spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79.3 (2008): 401-406.
8. Plutzer J and Karanis P. "Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water". *Water Research* 15.101 (2016): 318-332.
9. Lee MG, *et al.* "Infective arthritis due to Blastocystis hominis". *Annals of the Rheumatic Diseases* 9.3 (1990): 192-193.
10. Li LH, *et al.* "Cross-sectional surveys and subtype classification of human Blastocystis isolates from four epidemiological settings in China". *Parasitology Research* 102.1 (2007): 83-90.

11. Abdulsalam AM., *et al.* "Drinking water is a significant predictor of Blastocystis infection among rural Malaysian primary schoolchildren". *Parasitology* 139.8 (2012): 1014-1020.
12. Alfellani MA., *et al.* "Genetic Diversity of Blastocystis in Livestock and Zoo Animals". *Protist* 164.4 (2013): 497-509.
13. Parkar U., *et al.* "Direct characterization of Blastocystis from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential". *Parasitology* 134 (2007): 359-367.
14. Parkar U., *et al.* "Molecular characterization of Blastocystis isolates from zoo animals and their animal-keepers". *Veterinary Parasitology* 169.1.2 (2010): 8-17.
15. Stensvold CR., *et al.* "Symptomatic infection with Blastocystis sp. subtype 8 successfully treated with trimethoprim sulfamethoxazole". *Annals Tropical Medicine Parasitology* 102.3 (2008): 271-274.
16. Tan KS., *et al.* "Recent advances in Blastocystis hominis research: hot spot in terra incognita". *International Journal Parasitology* 32.7 (2002): 789-804.
17. Cavalier-Smith T. "A revised six-kingdom system of life". *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73.3 (1998):203-266.
18. Meloni D., *et al.* "Molecular subtyping of Blastocystis sp. isolates from symptomatic patients in Italy". *Parasitology Research* 109.3 (2011): 613-619.
19. Santin M., *et al.* "Development of a new PCR protocol to detect and subtype Blastocystis spp from humans and animals". *Parasitology Research* 109.1 (2011): 205-212.
20. Stensvold CR., *et al.* "Eradication of Blastocystis carriage with antimicrobials: reality or delusion?" *Journal Clinical Gastroenterology* 44.2 (2010): 85-90.
21. Poirier P., *et al.* "Molecular subtyping of Blastocystis spp. using a new rDNA marker from the mitochondria-like organelle genome". *Parasitology* 141.5 (2014): 670-681.
22. Yoshikawa H., *et al.* "Molecular characterization of Blastocystis isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal". *Veterinary Parasitology* 160.3-4 (2009): 295-300.
23. Roberts T., *et al.* "Subtype distribution of Blastocystis isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of Blastocystis". *European Journal of Clinical Microbiology* 32.3 (2013): 335-343.
24. Özyurt M., *et al.* "Molecular epidemiology of Blastocystis infections in Turkey". *Parasitology International* 57.3 (2008): 300-306.
25. Noel C., *et al.* "Molecular phylogenies of Blastocystis isolates from different hosts: Implications for genetic diversity, identification of species and zoonosis". *Journal Clinical Microbiology* 43.1 (2005): 348-355.
26. Tan KS. "New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp". *Clinical Microbiology Review* 21.4 (2008): 639-665.
27. Wang, W., *et al.* "Molecular epidemiology of Blastocystis in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia". *Veterinary Parasitology* 203.3-4 (2015): 264-269.

28. Yoshikawa H., *et al.* "Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries". *Parasitology Research* 92.1 (2004): 22-29.
29. Tan KSW and Stenzel DJ. "Multiple reproductive processes in *Blastocystis*: proceed with caution". *Trends in Parasitology* 19.7 (2003): 290-291.
30. Stenzel D and Boreham P. "*Blastocystis hominis* revisited". *Clinical Microbiology Review* 9.4 (1996): 563-584.
31. Tan K. "*Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies". *Veterinary Parasitology* 126.1-2 (2004): 121-144.
32. Singh MK., *et al.* Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 81.5 (1995): 446-450.
33. Zierdt CH and Williams RL. "*Blastocystis hominis*: Axenic cultivation". *Experimental Parasitology* 36.2 (1974): 233-243.
34. Arumugam M., *et al.* "Enterotypes of the human gut microbiome". *Nature* 473.7346 (2011): 174-180.
35. Andersen LO., *et al.* "A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*". *FEMS Microbiology Ecology* 91.7 (2015): 1-9.
36. Audebert C., *et al.* "Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota". *Scientific Reports* 5.6 (2016): 1-11.
37. Nourrisson C., *et al.* "*Blastocystis* is Associated with Decrease of Fecal Microbiota Protective Bacteria: Comparative Analysis between Patients with Irritable Bowel Syndrome and Control Subjects". *Public Library of Science One* 9.11 (2014): e111868.
38. Puthia MK., *et al.* "*Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells". *Infectious Immunology* 74.7 (2006): 4114-4123.
39. Wu Z., *et al.* "Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner". *BioMed Research International* (2014).
40. Long HY., *et al.* "*Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells". *Parasitology Research* 87.12 (2001): 1029-1030.
41. Bohm-Gloning B., *et al.* "Five subgroups of *Blastocystis hominis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S- like rDNA". *Tropical Medicine International Health* 2.8 (1997): 771-778.
42. Souppart L., *et al.* "Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France". *Parasitology Research* 105.2 (2009): 413-421.
43. Fayer R., *et al.* "*Blastocystis* tropism in the pig intestine". *Parasitology Research* 113.4 (2014): 1465-1472.
44. Elwakil HS and Hewedi I H. "Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice". *Parasitology Research* 107.3 (2010): 685-689.
45. Clark CG., *et al.* "Recent developments in *Blastocystis* research". *Advances in Parasitology* 82 (2013): 1-32.

46. Stensvold C., *et al.* "Detecting Blastocystis using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59.3 (2007): 303-307.
47. Dogruman-Al F., *et al.* "Comparison of methods for detection of Blastocystis infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey". *Public Library of Science One* 5.11 (2010): e15484.
48. Frealle E., *et al.* "Acute Blastocystis-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco". *Emerging Infectious Diseases* 21.1 (2015): 91-94.
49. Longstreth G., *et al.* "Functional bowel disorders". *Gastroenterology* 130.5 (2006): 1480-1491.
50. Tan KS., *et al.* "Current Views on the Clinical Relevance of Blastocystis spp". *Current Infectious Disease Reports* 12.1 (2010): 28-35.
51. Tan TC., *et al.* "Genetic variability of Blastocystis sp isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients". *Parasitology Research* 105.5 (2009): 1283-1286.
52. Janarthanan, S., *et al.* "An unusual case of invasive Blastocystis hominis infection". *Endoscopy* 43.2 (2011): E185-E186.
53. Lintong PM., *et al.* "Acute suppurative appendicitis with Blastocystis hominis". *Asian Pacific Journal Tropical Disease* 2.2 (2012): S965-S968.
54. Tejera B., *et al.* "Reactive arthritis caused by Blastocystis hominis". *Rheumatology Clinical* 8.1 (2013): 50-51.
55. Santos HLC., *et al.* "Blastocystis sp in splenic cysts: causative agent or accidental association? A unique case report". *Parasitology and Vectors* 7.1 (2014): 207.
56. Verma R and Delfanian K. "Blastocystis hominis associated acute urticarial". *American Journal Medicine Science* 346.1 (2013): 80-81.
57. Vogelberg C., *et al.* "Blastocystis sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms". *Parasitology International* 59.3 (2010): 469-471.
58. Kurt Ö., *et al.* "Eradication of Blastocystis in humans: Really necessary for all?" *Parasitology International* 65.6 (2016): 797-801.
59. Van Hellemond J J., *et al.* "Is paromomycin the drug of choice for eradication of Blastocystis in adults?" *Journal Infectious Chemotherapy* 19.3 (2013): 545-548.

Volume 3 Issue 1 June 2017

© All rights reserved by Helena Lúcia Carneiro Santos., et al.

9.3 Artigo de pesquisa publicado “Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil”

RESEARCH

Open Access



Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil

Carolina Valença Barbosa¹, Rosemary de Jesus Batista², Ricardo Pereira Igreja³, Claudia Masini d'Avila Levy¹, Heloisa Werneck de Macedo⁴ and Helena Lúcia Carneiro Santos^{1*}

Abstract

Background: *Blastocystis* is a cosmopolitan protist parasite found in the human gastrointestinal tract and is highly prevalent in developing countries. Recent molecular studies have revealed extensive genetic diversity, which has been classified into different subtypes (STs) based on sequence analysis of small subunit ribosomal RNA gene. *Blastocystis* is one of the most common fecal parasites in Brazil, but the diversity of subtypes remains unknown in the country. This study aimed to determine the distribution of *Blastocystis* STs in an urban community in Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil.

Methods: A total of 64 stool samples positive for *Blastocystis* in Pavlova's medium were subtyped by PCR and sequenced using primers targeting the small subunit rRNA gene, in addition to phylogenetic analysis and subtype-specific PCR using sequence-tagged-site (STS) primers.

Results: *Endolimax nana* (14%), *Entamoeba* complex (10.5%), *Taenia* sp. (0.6%), *Trichuris trichiura* (1.3%) and *Enterobius vermicularis* (1.3%) were detected in *Blastocystis*-positive samples. Of the 64 samples tested by PCR/DNA sequencing, 55 were identified as ST1 (42%), ST3 (49%), ST2 (7%) and ST4 (2%), and the presence of mixed ST (ST1 + ST3) infection was detected in nine samples (14%).

Conclusions: DNA sequencing and phylogenetic analysis of Brazilian *Blastocystis* isolates identified four different subtypes. To our knowledge, this study provided the first genetic characterization of *Blastocystis* subtypes in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. We also identified ST4 for the first time in Brazil. Further studies are necessary to determine the distribution of STs across human populations in Rio de Janeiro.

Keywords: *Blastocystis*, PCR, Subtypes, Epidemiology

Background

Blastocystis spp. are strictly anaerobic unicellular organisms that inhabit the gastrointestinal tract of humans as well as other mammals, birds, amphibians, reptiles, fish, arthropods and annelids [1–9]. *Blastocystis* is a cosmopolitan enteric protist estimated to infect over one billion people worldwide [10]. However, its prevalence rates vary widely between countries and between regions within the same country [11, 12], possibly reaching 30%

in industrialized countries and 30–76% in developing nations [13–18]. In the latter, high prevalence rates may be directly related to educational deficits, poor socioeconomic status, and sanitary conditions [19–22]. Nevertheless, high rates of infection are also observed in developed countries, especially among individuals who work with animals [6, 7, 23]. Previous studies have reported that the transmission of *Blastocystis* is fecal-oral, and as a result the protist was included in the Water Sanitation and Health program of the World Health Organization [24].

Although *Blastocystis* is an emerging intestinal parasite [25], its pathogenic potential remains unclear [24]. Diagnostic limitations, extensive genetic diversity, poor understanding of the host-parasite relationship, and the

* Correspondence: helenalucias@ioc.fiocruz.br

¹Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365 Pavilhão Arthur Neiva, Rio de Janeiro 21.045-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



lack of an experimental model represent major bottlenecks in elucidating the clinical significance and pathogenesis of *Blastocystis*. After infection (blastocystosis), not all persons develop the clinical disease, for which common symptoms include chronic or acute diarrhea, abdominal pain, flatulence, anorexia, nausea and vomiting [26–28]. One case of enteroinvasive blastocystosis diagnosed by histopathological analysis of biopsies showed *Blastocystis* in ulcers in the cecum, transverse colon and rectum of an immunocompetent individual, indicating that the parasite has invasive potential [29]. In addition, a case of appendicitis associated with appendix lumen obstruction caused by *Blastocystis* has also been reported [30]. *Blastocystis* subtype 3 (ST3) was detected in the appendix, recto-uterine pouch, and peritoneal fluid of a nine-year-old child [31] and in splenic cysts of an immunocompetent woman [32]. Other studies have reported extraintestinal manifestations including arthritis (with full resolution of clinical symptoms after metronidazole treatment) and recurrent episodes of arthritis in immunocompetent individuals [33]. Additionally, several studies suggest an association of *Blastocystis* with urticaria and skin lesions in immunocompetent individuals [34, 35]. These findings provide strong evidence of the ability of *Blastocystis* to migrate to extraintestinal sites and of its pathogenic potential. Moreover, some epidemiological surveys have suggested a strong association between irritable bowel syndrome (IBS) and *Blastocystis*, but this association has been questioned [36, 37].

Molecular analyses of the small-subunit ribosomal RNA have revealed extensive genetic diversity in the species. To date, 17 subtypes have been described (ST1–ST17), nine of which (ST1–ST9) are found both in humans and animals, while the others are exclusively found in animals [8, 38]. These subtypes have not been characterized as species, have low host specificity, and were isolated from humans and various animal hosts [39]. In humans, the most frequently detected subtype is ST3, followed by ST1, ST2, and ST4, whereas ST5–ST9 are rarely found [9, 40]. Genetic diversity varies dramatically among *Blastocystis* subtypes, which are not only separated by significant genetic distance [7, 39] but also differ in levels of intra-subtype variation [41]. Thathaisong et al. [42] detected polymorphisms in *Blastocystis* ST1 and created ST1/variant, while Melloni et al. [43] observed substantial intra-ST diversity in ST3 isolates and genetic homogeneity in ST4 isolates.

So far, studies have revealed the existence of genetic variability [44–47]. However, studies on *Blastocystis* diversity remain scarce in Brazil, where only three studies have been conducted to date [14, 48, 49]. To address this shortcoming, systematic studies focused on characterizing different isolates are necessary. In this study we report the molecular identification of four subtypes of

Blastocystis in a Brazilian population. This study is the first to thoroughly investigate the diversity of *Blastocystis* subtypes in an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. Our findings may be relevant to identifying sources of infection and potential routes of transmission of the parasite.

Methods

A coproparasitological study was conducted at the Center for Psychosocial Care (CAPS), a day-care hospital for the mentally ill in Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil.

Participation was voluntary and people could withdraw from the study at any time. To guarantee anonymity, each study participant was given a unique identification number. At the end of the study, all participants identified with enteric parasitic pathogens received proper antiparasitic drugs for treatment. Treatment was not offered to individuals infected with *Blastocystis*, because its pathogenic potential is still a topic of debate.

After written consent was obtained, fecal material from each participant was collected in a flask and transported to the laboratory. Unpreserved stool samples were requested and collected. A total of 180 unpreserved stool samples were collected at home from non-selected patients ($n = 80$) and their family members ($n = 100$), and kept at 4 °C and transported in ice packs to the Parasitology Laboratory at Oswaldo Cruz Foundation. Fresh unpreserved stool samples were fractionated into two aliquots upon receipt.

For parasitological analysis, one aliquot was processed using a spontaneous sedimentation technique (the Lutz technique or the Hoffman, Pons and Janer technique). Stool samples diluted in water were filtered through a gauze strip into a conical cup and subsequently submitted to sedimentation in tap water for 2 h [50]. The concentrated sample was analyzed by wet mounts and stained through an iodine staining procedure. In this study, we did not search for viruses or bacteria.

Direct cultivation of *Blastocystis* from the aliquot of stool samples was performed using Pavlova's medium (1.29 g/l of sodium phosphate dibasic, 0.42 g/l of potassium phosphate monobasic, 7.27 g/l of sodium chloride and 1.46 g/l of yeast extract) supplemented with 10% adult bovine serum (ABS) and penicillin-streptomycin (1000 IU/ml and 500 µg/ml, respectively) and incubated at 37 °C [51]. Screening of *Blastocystis* cultures was performed using a standard light microscopy in the first seven days of incubation. When typical forms of the parasite were observed, *Blastocystis* culture aliquots were frozen at -20 °C until used for DNA extraction.

Molecular characterization

Total DNA of each isolate was extracted from each culture of *Blastocystis* suspension using the Qiamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to manufacturer's recommendations. DNA was stored at -20 °C until use. To amplify segments from an approximately 500 bp fragment of genus-specific small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA), we used the following primers: forward Blast 505-532 (5'-GGA GGT AGT GAC AAT AAA TC-3') [52] and reverse Blast 998-1017 (5'-TGC TTT CGC ACT TGT TCA TC-3'), following the protocol described by Santin et al. [8]. The PCR reaction was performed in a final volume of 50 µl and each reaction contained 100 mM of Tris-HCl (pH 9.0), 500 mM of KCl, 1.5 mM of MgCl₂, 200 µM of each dATP, dGTP, dCTP, and dTTP; 0.2 µM of primer; 1.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0.05% of bovine serum albumin (BSA); and 5 µl of the DNA sample. Cycle conditions were an initial activation step at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 2 min, with a final extension step at 72 °C for 7 min. PCR amplification reactions were performed in a Veriti™ 96-well thermal cycler (AB Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gels in a tris-borate EDTA buffer, stained with Gelred (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), and photographed under UV transillumination. Amplicons were purified using the Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced in both directions using the PCR primers. DNA cycle sequencing reactions were performed using the BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and loaded in the ABI 3730 Sequencing Platform. Bi-directional sequences were assembled and edited using SeqMan (DNASTAR software package, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). DNA sequences of *Blastocystis* subtypes were downloaded from GenBank and a multiple sequence alignment was performed using the ClustalW algorithm of MEGA software version 6.0 [53]. Bayesian Inference (BI), Maximum Likelihood (ML), and Neighbor-joining analyses of SSU rDNA data were conducted to explore the relationships between taxa using MrBayes [54], PHYML [55] and MEGA software [53], respectively. Nucleotide substitution models were chosen based on the Akaike Information Criterion in jModelTest [56] and MrModeltest [57]. ML analysis was conducted using the Hasegawa-Kishino-Yanov Model with gamma distribution (HKY + G) [58] with four parameters and unequal base frequencies including rate variation among sites (-lnL = 24,599.056), which was predicted as the best model of nucleotide substitutions by the Akaike Information Criterion (AIC). For Bayesian analysis, the HKY + G

model was determined by the Bayesian Information Criterion (BIC) as the best-fit substitution model. *Proteromonas lacerate* (U37108) was used as an out-group [59, 60].

Subtype sequences with mixed traces indicative of mixed infections were analyzed by PCR using subtype-specific sequence-tagged-site (STS) primers (Table 1), according to Yoshikawa et al. [61].

Results

A total of 180 participants aged 1–85 years (80 patients and 100 patients' family members) provided adequate stool samples for the study; 105 (58.3%) were male (mean age: 52 years) and 75 (41.7%) were female (mean age: 48 years). Overall, based on light microscopy examination, 82 (45%) participants were found to be infected with one or more species of intestinal parasites. Of the 180 samples tested by the culture method for the presence of *Blastocystis*, 64 (35.5%) were positive, whereas microscopy examination was less effective in detecting *Blastocystis*, with only 49 (27%) samples showing positive results. The frequency of *Blastocystis* infections was 32.5% (26/80) among patients and 38% (38/100) in family members. Among the 64 *Blastocystis*-positive participants, 18.3% (33/180) of individuals (14 patients and 19 family members) presented poly-parasitism. *Endolimax nana* (14%), *Entamoeba* complex (10.5%), *Taenia* sp. (0.6%), *Trichuris trichiura* (1.3%) and *Enterobius vermicularis* (1.3%) were detected in the *Blastocystis*-positive samples. Of the 31 participants singly infected with *Blastocystis*, only five family members reported symptoms: two individuals reported intermittent episodes of diarrhea, while the other three respectively presented flatulence, bloating and abdominal discomfort.

Table 1 Sequence-tagged site (STS) primer sets used in this study targeting SSU rRNA gene of *Blastocystis*

Primer pair	Target subtype	Primer type	Sequence (5'-3')
SB83	ST1	F	GAAGGACTCTCTGACGATGA
		R	GTCCAAATGAAAGGCAGC
SB340	ST2	F	TGTTCTTGTGCTTCTCAGCTC
		R	TTCTTTCACACTCCCGTCAT
SB227	ST3	F	TAGGATTTGGTGTGGAGA
		R	TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAG
SB337	ST4	F	GTCITTCCTGTCTATTCTGCA
		R	AATTCGGTCTGCTTCTCTG
SB336	ST5	F	GTGGGTAGAGGAAGGAAAACA
		R	AGAACAAGTCGATGAAGTGAGAT
SB332	ST6	F	GCATCCAGACTACTATCAACATT
		R	CCATTTTCAGACAACCACTTA
SB155	ST7	F	ATCAGCTACAATCTCCTC
		R	ATCGCCACTTCTCCAAT

Typing of *Blastocystis*

APCR amplicon of approximately 500 bp of the SSU rDNA was successfully generated in all 64 samples. DNA sequencing revealed single-subtype infection in 55 isolates. Those 55 sequences showed a high identity (97–100%) to the reference sequences previously published by GenBank, and were identified as four distinct subtypes: ST1, ST2, ST3 and ST4. *Blastocystis* ST3 was the most prevalent subtype, followed by ST1, ST2 and ST4 (Table 2). In the remaining nine samples, sequence chromatogram analysis revealed the presence of double traces and mixed-subtype infection, and accordingly a PCR with subtype-specific sequence-tagged-site (STS) primers revealed the presence of both ST1 and ST3 (Table 2). In relation to the distribution of reported symptoms, ST2 was found in two family members with intermittent diarrheal episodes, whereas ST1, ST2 and ST3 were identified in three relatives of patients who respectively reported flatulence, bloating and abdominal discomfort.

Phylogenetic analysis of 21 reference sequences using NJ, ML and BI analyses clustered *Blastocystis* subtypes into four monophyletic groups (Fig. 1). Twenty-three isolates clustered with the ST1 reference sequence, four formed a distinct clade with ST2, 27 clustered with ST3, and one clustered with ST4. Intra-strain variation was observed among distinct subtypes: ST1 and ST3 isolates formed small clades within each subtype, indicating extensive genetic variability in the two strains. The posterior probability support in BI analyses had overall higher values than the bootstrap support in ML across the whole tree. Phylogenetic analyses using ML and BI (Fig. 1) and NJ (not shown) indicated that ST1 and ST2 share a common ancestor. The trees also showed that ST6, ST9 and ST7 are related, and that ST8 and ST4 are closely related.

Discussion

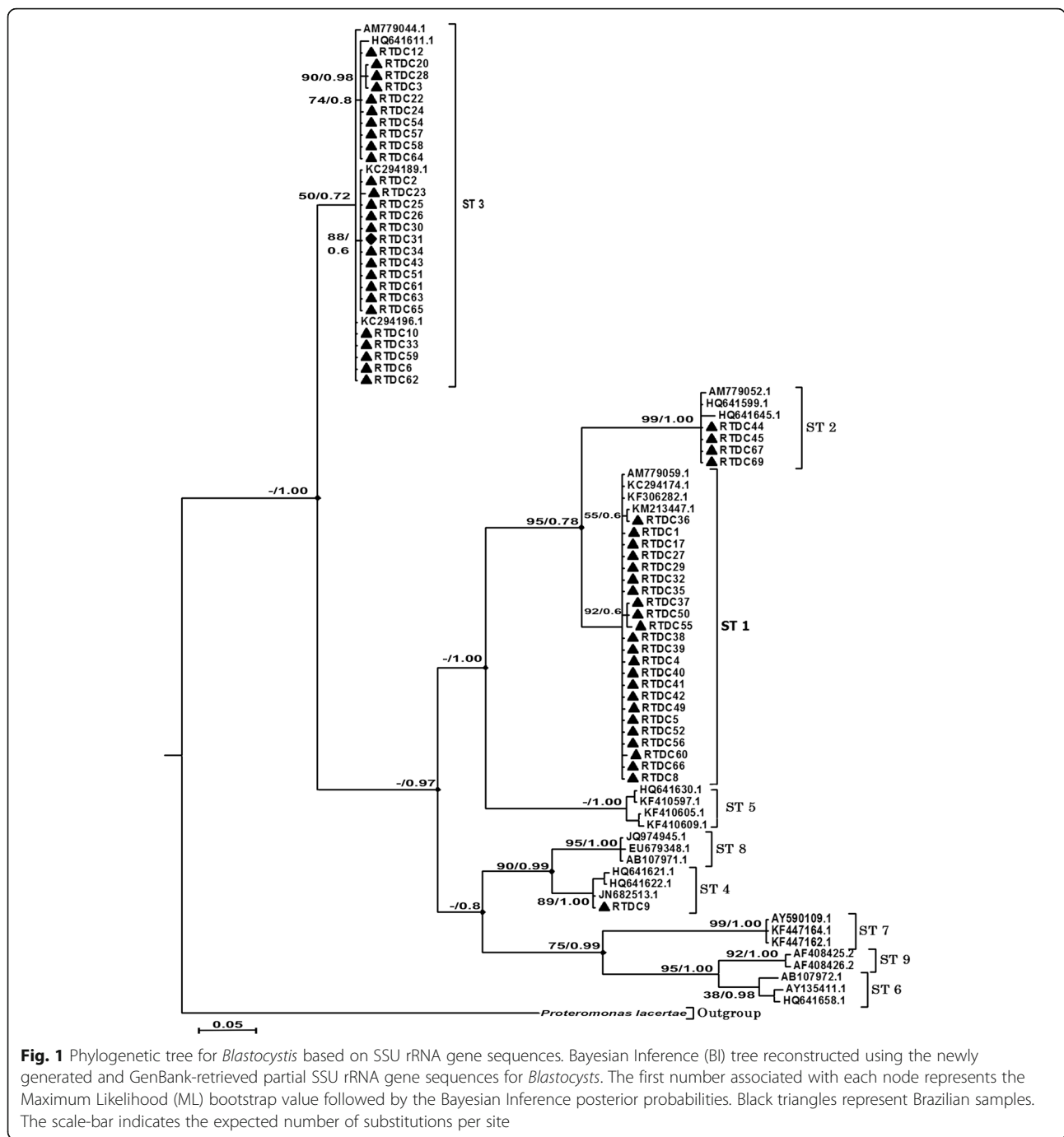
Blastocystis is one of the most prevalent unicellular protozoists found in human fecal specimens [10]. In our study, ST3 was the most prevalent subtype, followed by ST1, ST2, and ST4. In addition, mixed infections were detected in 14% of the samples, similar to the prevalence reported in other countries, which ranged between 2.6–14.3% [6, 12, 19, 46, 49, 62–64]. According to Alfellani et al. [9], single infections are typically reported, whereas mixed infections have been reported in less than half of the studies, at an overall prevalence of only 6%, suggesting a possible under estimation compromising the validity of results and their epidemiological interpretation. Our phylogenetic trees revealed four well-defined clades that grouped isolates into four different subtypes, bearing similarity to those reported in previous studies. In Brazil, even though only three studies have published ST data, the geographical distribution of *Blastocystis* subtypes varies across regions. ST1 was the most prevalent subtype (followed by ST2 and ST3) among an indigenous population from Mato Grosso, Brazil, whereas a study conducted in two small fishing villages situated along the Tietê River in the state of São Paulo, Brazil found a higher incidence of ST3 isolates, followed by ST1 [14, 48, 49].

Globally, subtypes ST1–ST4 have been identified as the most common subtypes in humans [6, 9, 19, 36, 61, 65–70]. Even though it has been suggested that ST3 is the only subtype of human origin [11, 60, 70], it has been detected in several other hosts including pigs, cattle, and non-human primates [3, 9, 65, 71, 72]. Several studies across the world have identified ST3 as the predominant *Blastocystis* subtype [9, 12, 18, 19, 67, 69, 72–80]. Our study identified ST4 in one only sample. This contrasts with previous studies showing that ST4 is common in European and African populations [9, 38, 64, 81–85].

Table 2 *Blastocystis* subtypes identified in the present study

Subtype	No. of isolates	Isolate code and GenBank accession number
ST1	23	RTDC1 (KU892242); RTDC4 (KU892241); RTDC5 (KU892222); RTDC8 (KU892243); RTDC17 (KU892244); RTDC27 (KU892225); RTDC29 (KU892233); RTDC32 (KU892227); RTDC35 (KU892237); RTDC36 (KU892229); RTDC37 (KU892235); RTDC38 (KU892236); RTDC39 (KU892230); RTDC40 (KU892238); RTDC41 (KU892231); RTDC42 (KU892240); RTDC49 (KU892232); RTDC50 (KU892226); RTDC52 (KU892239); RTDC55 (KU892234); RTDC56 (KU892228); RTDC60 (KU892223); RTDC66 (KU892224)
ST2	4	RTDC44 (KU892245); RTDC45 (KU892246); RTDC 67 (KU892247); RTDC69 (KU892248)
ST3	27	RTDC2 (KU892249); RTDC 3 (KU892250); RTDC6 (KU892251); RTDC10 (KU892252); RTDC 12 (KU892253); RTDC20 (KU892254); RTDC 22 (KU892255); RTDC23 (KU892256); RTDC 24 (KU892257); RTDC25 (KU892258); RTDC 26 (KU892259); RTDC28 (KU892260); RTDC 30 (KU892261); RTDC31 (KU892262); RTDC 33 (KU892263); RTDC34 (KU892264); RTDC 43 (KU892265); RTDC51 (KU892266); RTDC 54 (KU892267); RTDC57 (KU892268); RTDC 58 (KU892269); RTDC59 (KU892270); RTDC 61 (KU892271); RTDC62 (KU892272); RTDC 63 (KU892273); RTDC64 (KU892274); RTDC 65 (KU892275)
ST4	1	RTDC9 (KU892276)
ST1- ST3 ^a	9	RTDC13; RTDC15; RTDC18; RTDC21; RTDC47; RTDC48; RTDC53; RTDC68; RTDC70

^aSubtype-specific sequence-tagged-site (STS) primers



Rodents have been proposed as the reservoir host of this subtype [58, 86–88]. In Colombia, ST4 has been identified in a few humans and non-human primates [85, 86]. However, the molecular epidemiology of *Blastocystis* is incompletely known in other South American countries. To better understand the genetic diversity and determine the prevalence of *Blastocystis* subtypes in South America, further research with larger sample sizes is required.

After ST3, ST1 was the most frequent subtype detected in our study. ST1 has low specificity and is found in a wide range of animals, including dogs, chickens, cattle, pigs and non-human primates [3, 63]. Some studies have suggested that ST1 is linked to zoonotic transmission [89, 90]. *Blastocystis* is transmitted by the fecal-oral route [1] and several studies have suggested that contaminated water may be a source of *Blastocystis* infections [19, 20, 88, 91, 92]. A study conducted in China

reported a high infection rate (32.6%) and found that inadequate water intake was a predictor of *Blastocystis* infection [19]. Also, *Blastocystis* has been detected in samples of soil and drinking water [93]. Overall, many human settlements are characterized by poor hygiene habits, extensive interpersonal contact and increased dependency on care, which provide favorable conditions for the circulation and transmission of parasites and increased susceptibility to parasitic infections. This was revealed by reports of enteric parasitic infections in mental institutions, which indicate that rates of intestinal parasitic infections are higher among institutionalized persons than in the general population, even in developed countries [94]. It should be noted that we analyzed unpreserved stool samples from non-selected adults and identified *Blastocystis* in 46% of family members, compared to a lower figure of 32.5% among institutionalized patients. Therefore, at least in our study population, transmission through cyst-contaminated water appears to be more common than transmission at the care center [87, 88, 90]. The presence of intestinal parasites in the population highlights the need for a more comprehensive epidemiological study in the region to support public policies aimed at educating the public about intestinal parasite prevention. Over the last few years, scientific interest has increased tremendously with respect to the clinical relevance of *Blastocystis* infection and molecular epidemiology.

We should note that the source of DNA (feces vs culture) used in PCR may in principle imply a bias in subtyping. We used DNA from cultured *Blastocystis*, and it is possible that parasite culture could have led to a selection of subtypes of *Blastocystis*. However, this was not observed in a previous study by Stensvold et al. [38] which involved mixed infections. The authors stated that xenic in vitro culture (XIVC) has very little or no impact on subtype distribution or variation within a given specimen. Moreover, the authors recommended that short-term XIVC should be used for cost-effective screening of *Blastocystis* infection from fresh fecal specimens, to generate valid prevalence estimates and to identify isolates. When PCR is based on DNA extracted from feces, the consequence may be false-negative results or decreased PCR efficiency due to a series of factors, including low amount of template DNA in the test sample, inadequate removal of polymerase inhibitors and poor DNA recovery after extraction and purification steps. As a reasonable solution to the presence of inhibitors or degraded target DNA in samples, constitutive genes may be used in parallel assays to evaluate the integrity of the DNA template. PCR is such a powerful tool that even a single molecule of template can be amplified. However, it is difficult to amplify rare templates when they are mixed with similar, but more abundant, templates sharing

amplification primers. Nonetheless, no study has evaluated the sensitivity range of PCR using a panel of mixed *Blastocystis* infection samples (multi-ST infections). Moreover, little is known about ST gene targets and how conserved they are both within, and between, subtypes. Had DNA from feces been available for each of the *Blastocystis* samples in our study, it would have been possible to answer some of these important questions.

It has been suggested that pathogenicity may be related to specific *Blastocystis* subtypes, but this association is still inconclusive and often contradictory. Many previous reports on the potential pathogenicity of *Blastocystis* have been limited by a lack of definition of symptoms and more comprehensive investigations able to exclude other infectious agents of diarrhea [91, 95, 96]. Unfortunately, we could not estimate correlations between subtype distributions and symptoms due to the high proportion of asymptomatic individuals, in addition to the fact that individuals had symptoms that could be attributed to other causes (co-infections with pathogenic and commensal intestinal protozoans as well as helminths). In symptomatic individuals not infected by any other protozoans or helminths, the symptoms of *Blastocystis* infection were intermittent episodes of diarrhea, flatulence (in the case of ST2 infection), and flatulence, bloating, and abdominal discomfort but no diarrhea (in the case of ST1, ST2 and ST3). However, other possible causes of clinical symptoms must be considered, such as viral and bacterial infections not evaluated in this study.

Conclusions

To our knowledge, we conducted the first molecular study of human *Blastocystis* infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Blastocystis* isolates were highly genetically divergent. Of the subtypes identified, ST3 was the most common, followed by ST1, ST2 and ST4 (ST4 was identified for the first time in Brazil). However, these results cannot be generalized to the entire Rio de Janeiro population. Further studies are required to determine the distribution of STs in the general population. Nonetheless, our study is a contribution to the understanding of the molecular epidemiology, transmission patterns and genetic diversity of *Blastocystis* at a regional and global scale.

Abbreviations

AIC: Akaike Information Criterion; BI: Bayesian Inference; BIC: Bayesian Information Criterion; ML: Maximum Likelihood; MLST: multilocus sequence typing; NJ: Neighbor-joining; SSU rDNA: small subunit of the ribosomal RNA gene; ST: subtype

Acknowledgments

The authors would like to thank the DNA Sequencing PDTIS/FIOCRUZ platform facilities and we also gratefully acknowledge the dedicated efforts of the Center for Psychosocial Care (CAPS) staff who participated actively in the study, particularly Nilzete de Araújo Ribeiro Costa.

Funding

This study was supported by Carlos Chagas Filho Research Foundation of State of Rio de Janeiro (Faperj), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Oswaldo Cruz Foundation (PAPES-VI/FIOCRUZ). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

The data sets supporting the conclusions of this article are included within the article. All sequence data that support the findings of this study have been deposited in the GenBank database under the accession numbers: KU892222–KU892276.

Authors' contributions

SHLC and MHW conceived and designed the study. SHLC and BRJ obtained the samples and conducted the *in vitro* cultivation and microscopy examination. BVC was responsible for the molecular analyses and SHLC and IR data analysis and interpretation. BVC, LDCM and HLCS prepared the first draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Prior to data collection, the study protocol was reviewed and approved by the Human Ethics Committee at Oswaldo Cruz Foundation (protocol number. 632/11). Study participants (patients and their family members) were informed about the study's aims, potential risks and benefits. Participants provided written informed consent followed by signatures of two external witnesses. Individuals unable to provide consent were represented by their caregivers, relatives or legal tutors.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365 Pavilhão Arthur Neiva, Rio de Janeiro 21.045-900, Brazil. ²Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, IFF/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, Av. Rui Barbosa, 716, Flamengo, Rio de Janeiro 22250-020, Brazil. ³Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Edifício do Centro de Ciências da Saúde Bloco K, 2º andar, Sala 49 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21.941-902, Brazil. ⁴Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia, Hospital Universitário Antônio Pedro/ Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Rua Marquês do Paraná, 303. 4º andar, sala 12, Niterói, Rio de Janeiro 24033 900, Brazil.

Received: 10 January 2017 Accepted: 6 October 2017

Published online: 25 October 2017

References

- Stenzel D, Boreham P. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9:563–84.
- Belova LM, Krylov MV. [The distribution of *Blastocystis* according to different systematic groups of hosts.] *Parazitologia.* 1998;32:268–76. (In Russian).
- Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet Parasitol.* 2004;120:235–42.
- Yoshikawa H, Morimoto K, Wu Z, Singh M, Hashimoto T. Problems in speciation in the genus *Blastocystis*. *Trends Parasitol.* 2004;20:251–5.
- Yoshikawa H, Wu Z, Hashimoto T, Geok-Choo N, Tan KS. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cochroaches. *J Eukaryot Microbiol.* 2007;54:33–7.
- Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KE, et al. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect.* 2009;137:1655–63.
- Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol.* 2010;169:8–17.
- Santin M, Gomez-Munoz MT, Solano-Aquilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res.* 2011;109:205–12.
- Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist.* 2013;164:497–509.
- Scanlan PD, Stensvold CR. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol.* 2013;29:523–9.
- Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:639–65.
- Souppart L, Sancier G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res.* 2009;105:413–21.
- Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilic-Stojanovi M, Heilig HGHJ, De Vos WM, O'Toole PW, Cotter PD. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014;90:326–30.
- David EB, Guimarães S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, Moraes Nardi AR, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the state of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors.* 2015;8:103.
- Abu-Madi M, Aly M, Behnke JM, Clark CG, Balkhy H. The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasit Vectors.* 2015;8:465.
- Angal L, Mahmud R, Samin S, Yap NJ, Ngui R, Amir A, et al. Determining intestinal parasitic infections (IPIs) in inmates from Kajang prison, Selangor, Malaysia for improved prison management. *BMC Infect Dis.* 2015;15:467.
- Pipatsatitpong D, Leelayoova S, Mungthin M, Aunpad R, Naaglor T, Rangsin R. Prevalence and risk factors for *Blastocystis* infection among children and caregivers in a child care center, Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93:310–5.
- Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, et al. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infect Genet Evol.* 2015;31:296–9.
- Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, et al. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res.* 2007;102:83–90.
- Leelayoova S, Siripattanapitong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M. Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79:401–6.
- Lee L, Chye T, Karmacharya B, Govind S. *Blastocystis* sp: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasit Vectors.* 2012;5:130.
- Nagel R, Cuttler L, Stensvold C, Mills P, Bielefeldt-Ohmann H, Traub R. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Intern Med J.* 2012;42:1187–95.
- Rajah Salim H, Suresh Kumar G, Vellayan S, Mak JW, Khairul Anuar A, Init I, et al. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitol Res.* 1999;85:1032–3.
- WHO. Guidelines for drinking-water quality (3rd edition, incorporating first and second addenda). Geneva: World Health Organization; 2008.
- Turkeltaub JA, McCarty TR, Hotez PJ. The intestinal protozoa. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;31:38–44.
- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R. *in vitro* susceptibility of *Blastocystis hominis* isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Br J Biomed Sci.* 2004;61:75–7.
- Kaya S, Cetin ES, Aridogan BC, Arikon S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye Parazit Derg.* 2007;31: 184–7.
- Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res.* 2008;102:853–60.
- Janarthanan S, Khoury N, Antak F. An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. *Endoscopy.* 2011;43:E185–6.
- Lintong PM, Sambuaga MK, Tambajong EH. Acute suppurative appendicitis with *Blastocystis hominis*. *Asian Pac J Trop Dis.* 2012;2:965–8.
- Frealte E, El Safadi D, Cian A, Aubry E, Certad G, Osman M, et al. Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:91–4.

32. Santos HLC, Sodré C, de Macedo HW. *Blastocystis* sp. in splenic cysts: causative agent or accidental association? A unique case report. *Parasit Vectors*. 2014;7:207.
33. Lee MG, Rawlins SC, Didier M, DeCeulaer K. Infective arthritis due to *Blastocystis hominis*. *Ann Rheum Dis*. 1990;49:192–3.
34. Verma R, Delfanian K. *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *Am J Med Sci*. 2013;346:80–1.
35. Bálint A, Dóczy I, Bereczki L, Gyulai R, Szűcs M, Farkas K, et al. Do not forget the stool examination! - cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitol Res*. 2014;113:1585–90.
36. Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, et al. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors*. 2008;1:40.
37. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares C, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002545.
38. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Detecting *Blastocystis* by parasitological and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59:303–7.
39. Rivera WL. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Vet Parasitol*. 2008;156:178–82.
40. Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol*. 2009;39:473–9.
41. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol*. 2012;12:263–73.
42. Thathaisong U, Siripattanapibong S, Mungthin M, Pipatsatitpong D, Tan-Ariya P, Naaglor T, Leelayoova S. Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the home for girls, Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88:352–8.
43. Meloni D, Poirier P, Mantini C, Noël C, Gantois N, Wawrzyniak I, et al. Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitol Int*. 2012;61:719–22.
44. Dagci H, Kurt O, Demirel M, Mandiracioglu A, Aydemir S, Saz U, et al. Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in Izmir province, Turkey. *Iran J Parasitol*. 2014;9:519–29.
45. El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, et al. Children of Senegal River basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis*. 2014;14:164.
46. Osman M, Bories J, El Safadi D, Poirel MT, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, et al. Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Vet Parasitol*. 2015;214:167–70.
47. Mattiucci S, Crisafi B, Gabrielli S, Paoletti M, Cancrini G. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiol Infect*. 2016;144:635–46.
48. Malheiros AF, Stensvold CR, Clark CG, Braga GB, Shaw JJ. Short report: molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:1050–3.
49. Melo GB, Paula FM, Malta FM, Maruta CW, Criado PR, Castilho VLP, et al. Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil. *Parasitol Open*. 2017;3:1–6.
50. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *P R J Publ Health Trop Med*. 1934;9:283–91.
51. Zerpa LR, Huicho L, Naquira C, Espinoza I. A simplified culture method for *Blastocystis hominis*. *Ver Mex Patol Clin*. 2000;47:17–9.
52. Böhm-Gloning B, Knobloch J, Walderich B. Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Trop Med Int Health*. 1997;2:771–8.
53. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2725–9.
54. Huelsenbeck JP, Ronquist R. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: Nielsen R, editor. *Statistical methods in molecular evolution*. New York: Springer; 2005. p. 183–232.
55. Guindon S, Gascuel O. PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003;52:696–704.
56. Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetics. Advantage of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio test. *Syst Biol*. 2004;53:793–808.
57. Nylander JAA. MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. Sweden: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University; 2004.
58. Hasegawa M, Iida Y, Yano T, Takaiwa F, Iwabuchi M. Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *J Mol Evol*. 1985;22:32–8.
59. Leipe DD, Tong SM, Goggin CL, Slemenda SB, Pieniżek NJ, Sogin ML. 16S-like rDNA sequences from *Developayella elegans*, *Labyrinthuloides haliotidis*, and *Proteromonas lacerate* confirm that the stramenopiles are a primarily heterotrophic group. *Eur J Protistol*. 1996;32:449–58.
60. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*. 1996;4:380–98.
61. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IK, Hossain MB, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res*. 2004;92:22–9.
62. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res*. 2010;106:505–11.
63. Meloni D, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, Chabé M, Delhaes L, et al. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res*. 2011;109:613–9.
64. Fouad SA, Basyoni MM, Fahmy RA, Kobaisi MH. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab J Gastroenterol*. 2011;12:194–200.
65. Yoshikawa H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *J Parasitol*. 2003;89:585–94.
66. Scicluna SM, Tawari B, Clark CGDNA. Barcoding of *Blastocystis*. *Protist*. 2006;157:77–85.
67. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen H, Arendrup M. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol*. 2006;92:1081–7.
68. Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo X, Chen G. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol Res*. 2006;99:597–601.
69. Vargas-Sanchez GB, Romero-Valdovinos M, Ramirez-Guerrero C, Vargas-Hernandez I, Ramirez-Miranda ME, Martinez-Ocaña J, et al. *Blastocystis* isolates from patients with irritable bowel syndrome and from asymptomatic carriers exhibit similar parasitological loads, but significantly different generation times and genetic variability across multiple subtypes. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124006.
70. Wong K, Ng G, Lin R, Yoshikawa H, Taylor M, Tan K. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res*. 2008;102:663–70.
71. Badparva E, Sadraee J, Kheirandish F. Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from cattle in Khorramabad, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(3):e14810.
72. Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *J Clin Microbiol*. 2000;38(4):1324–30.
73. Helenbrook WD, Shields WM, Whipps CM. Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*, living in close proximity to one another. *Parasitol Res*. 2015;114(7):2517–25.
74. Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, Vugt VM, et al. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis*. 2013;13:389.
75. Coskun A, Malatyali E, Ertabaklar H, Yasar M B, Karaoglu A O, Ertug S. *Blastocystis* in ulcerative colitis patients: Genetic Diversity and analysis of laboratory findings. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(9):916–9.
76. Badparva E, Pournia Y, Fallahi SH. Prevalence of *Blastocystis hominis* in Lorstan province, west of Iran. *Asian J Biol Sci*. 2012;5(2):157–61.
77. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*. *Eur J ClinMicrobiol*. 2013;32(3):335–43.
78. Forsell J, Granlund M, Stensvold C, Clark C, Evengard B. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis*. 2012;31:1689–96.
79. Özyurt M, Kurt Ö, Mølbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int*. 2008;57(3):300–6.

80. Jones MS, Whipps CM, Ganac RD, Hudson NR, Boroom K. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitol Res.* 2009;104(2): 341–5.
81. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:588–92.
82. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KE, Nielsen HV. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:883–5.
83. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 2011;49: 975–83.
84. Dominguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol Res.* 2009;105:949–55.
85. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol.* 2014;22:223–8.
86. Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, et al. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect Genet Evol.* 2016;41:32–5.
87. Yoshikawa H, Abe N, PCR-based WZ. Identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology.* 2004;150:1147–51.
88. Taamasri P, Mungthin M, Rangsin R, Tongupprakarn B, Areekul W, Leelayoova S. Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2000;31:112–7.
89. Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, Kanbara H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol.* 2009;160:295–300.
90. Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):348–55.
91. Eroglu F, Koltas IS. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitol Res.* 2010;107:841–5.
92. Baldrusson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004–2010. *Water Res.* 2011;45: 6603–14.
93. Londoño-Franco AL, Loaiza-Herrera J, Lora-Suárez FM, Gómez-Marín JE. *Blastocystis* sp. frequency and sources among children from 0 to 5 years of age attending public day care centers in Calarcá, Colombia. *Biomedica.* 2014;34(2):218–27.
94. Khalili B, Imani R, Boostani S. Intestinal parasitic infections in chronic psychiatric patients in Sina hospital Shahre-Kord, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2013;6(3):252–5.
95. Dogruman-AI F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel MA. Possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 2008;103(3):685–9.
96. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog.* 2014;6:17.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



9.4 Artigo de pesquisa publicado “Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes”

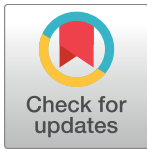
RESEARCH ARTICLE

Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes

Carolina Valença Barbosa¹, Magali Muniz Barreto², Rosemary de Jesus Andrade³, Fernando Sodré⁴, Claudia Masini d'Avila-Levy¹, José Mauro Peralta⁵, Ricardo Pereira Igreja⁶, Heloisa Werneck de Macedo⁴, Helena Lucia Carneiro Santos^{1*}

1 Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Instituto Fernandes Figueira/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Laboratório de Parasitologia, Departamento de Patologia, Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Instituto de Microbiologia Paulo de Goes, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil, **6** Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

* helenalucias@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Barbosa CV, Barreto MM, Andrade RdJ, Sodré F, d'Avila-Levy CM, Peralta JM, et al. (2018) Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. PLoS ONE 13 (3): e0193860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193860>

Editor: Maria Victoria Periago, Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnicas, Fundación Mundo Sano, ARGENTINA

Received: November 6, 2017

Accepted: February 20, 2018

Published: March 9, 2018

Copyright: © 2018 Barbosa et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. In this study, SSU rDNA partial gene sequences were deposited in GenBank under accession numbers KX523972 to KX524055 and MG309719.

Funding: Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Oswaldo Cruz

Abstract

Background

Intestinal parasitic infections are considered a serious public health problem and widely distributed worldwide, mainly in urban and rural environments of tropical and subtropical countries. Globally, soil-transmitted helminths and protozoa are the most common intestinal parasites. *Blastocystis* sp. is a highly prevalent suspected pathogenic protozoan, and considered an unusual protist due to its significant genetic diversity and host plasticity.

Methodology/main findings

A total of 294 stool samples were collected from inhabitants of three rural valleys in Rio de Janeiro, Brazil. The stool samples were evaluated by parasitological methods, fecal culture, nested PCR and PCR/Sequencing. Overall prevalence by parasitological analyses was 64.3% (189 out of 294 cases). *Blastocystis* sp. (55.8%) was the most prevalent, followed by *Endolimax nana* (18.7%), *Entamoeba histolytica* complex (7.1%), hookworm infection (7.1%), *Entamoeba coli* (5.8%), *Giardia intestinalis* (4.1%), *Iodamoeba butchillii* (1.0%), *Trichuris trichiura* (1.0%), *Pentatrichomonas hominis* (0.7%), *Enterobius vermicularis* (0.7%), *Ascaris lumbricoides* (0.7%) and *Strongyloides stercoralis* (0.7%). Prevalence of IPIs was significantly different by gender. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* sp. and BLAST search revealed five different subtypes: ST3 (34.0%), ST1 (27.0%), ST2 (27.0%), ST4 (3.5%), ST8 (7.0%) and a non-identified subtype.

(PAPES-VI/FIOCRUZ) number (407768/2012-2) to HLCS and MMB and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro to CMd. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions/significance

Our findings demonstrate that intestinal parasite infection rates in rural areas of the Sumidouro municipality of Rio de Janeiro, Brazil are still high and remain a challenge to public health. Moreover, our data reveals significant genetic heterogeneity of *Blastocystis* sp. subtypes and a possible novel subtype, whose confirmation will require additional data. Our study contributes to the understanding of potential routes of transmission, epidemiology, and genetic diversity of *Blastocystis* sp. in rural areas both at a regional and global scale.

Introduction

Intestinal parasitic infections (IPIs) are ubiquitous in humans, both in urban and rural environments from tropical and subtropical countries. The poorest and most deprived communities are at increased risk of intestinal parasitic infections, which are present in more than a quarter of the world's population [1–3]. The frequency of intestinal parasites is an indicator of low socioeconomic development of a population, which is directly associated with educational deficits and poor sanitary conditions [4]. However, in tropical developing countries, rural life is by itself associated with a high risk of infections due to negligible health knowledge, lower socio-economic conditions, inadequate environmental sanitation, insufficient water supply [5, 6] and higher contact rates with wildlife and domestic reservoirs of infection [7–9]. Rural populations experience a vicious cycle of malnutrition and re-infections leading to continuous morbidity and perpetuation of poverty cycles. IPIs are a public health problem caused by helminths and intestinal protozoa [3, 10, 11]. Globally, the soil-transmitted helminthes *Ascaris lumbricoides*, hookworm and *Trichuris trichiura* and the protozoan *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* sp. are the most common intestinal parasites [12]. Except for *E. histolytica*, *Cryptosporidium* spp and *Balantidium coli*, they are unable to invade the mucosal tissues or other organs. In the recent years, there has been a growing recognition that *Blastocystis* sp. presents pathogenic potential, although its virulence mechanisms are not understood. They infect a wide range of animals including birds, amphibians, reptiles, insects and mammals, including humans [13–18]. Although the current knowledge of reservoirs for human infection is limited, it is known that a vehicle for *Blastocystis* sp. transmission is close contact with animals [15, 16, 19]. *Blastocystis* sp. has potential pandemic distribution, possibly reaching 30% in industrialized countries and up to 76% in developing nations [12, 20, 21].

Analysis of the small-subunit ribosomal RNA of *Blastocystis* sp. isolates revealed substantial genetic diversity, represented by 17 genetically distinct ribosomal lineages (subtypes/ST1–ST17) [18, 22]. Ten subtypes (ST1–ST9, and ST12) have been isolated from human and animal fecal samples (except ST9) [7, 16, 23–25], whereas others were exclusively found in non-human hosts [14, 26]. The significance of *Blastocystis* sp. to public health, potential zoonotic differences and clinical outcomes may be related to specific subtype, a hypothesis that has been the topic of recent debate and requires further examination [15, 27].

The molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. infections is still unknown in many parts of the world. Brazil is a continental country and information on the distribution of STs in the country is still incipient, but a high prevalence of *Blastocystis* sp. has been reported both in urban and rural environments. Moreover, IPIs are still a major public health problem, especially among the impoverished and underprivileged communities living in rural and remote areas, which represent an important target of public health interventions. To address this gap,

we investigated the prevalence of intestinal parasites and distribution of *Blastocystis* sp. STs in inhabitants of rural areas of Rio de Janeiro, Brazil. We report a high prevalence of intestinal parasitic infections and a wide range of *Blastocystis* sp. STs in the area.

Materials and methods

Study population

A cross-sectional study was carried out from October to December of 2013 in Pamparrão, Porteira Verde and Porteira Verde Alta valleys, in rural area of Sumidouro, State of Rio de Janeiro, Brazil (22° 02' 46" S; 42° 41' 21" W). The valleys are populated by small rural properties characterized by vegetable crops and pasture. Total population is around 14,900 inhabitants, and 87.7% of people work in agriculture [28]. The Sumidouro municipality is located in the central mountains bordering the Serra do Mar in Rio de Janeiro, at altitudes varying between 264 and 1,300 meters. The region exhibits marked climatic contrasts due to its peculiar geographical position and humid-mesothermic climate [29], with average rainfall between 153.5 mm and 269.4 mm.

Participants were informed about the study aims, potential risks and benefits, and provided written informed consent followed by signatures of two external witnesses. Relatives or legal tutors provided informed consent for children. Participation was voluntary and people could withdraw from the study at any time without further obligation. To preserve anonymity, each study participant was given a unique identification number. At the end of the study, all participants diagnosed with enteric parasitic pathogens received proper therapy. Treatment was not offered to individuals infected with *Blastocystis* sp., because its pathogenic potential is still a topic of debate. The study protocol was reviewed and approved by the Human Ethics Committee of the Faculdade Medicina from Universidade Federal Fluminense (CAAE 35028314.2.0000.5 243).

Parasitological assays

A total of 294 unpreserved stool samples were collected from participants at home, kept at 4°C and transported to the laboratory at the Fundação Oswaldo Cruz in ice packs. Fresh unpreserved stool samples were fractionated into two aliquots upon receipt. Parasitological examination was performed by spontaneous sedimentation technique (also known as Lutz technique or Hoffman, Pons and Janer technique)[30] and flotation in saturated sodium chloride solution density 1.2 g/mL[31]. Direct *in vitro* xenic cultivation of *Blastocystis* sp. from an aliquot of stool samples was performed using Pavlova's medium, supplemented with 10% heat inactivated adult bovine serum and penicillin-streptomycin antibiotics and incubated at 37°C [32]. Screening of *Blastocystis* sp. cultures was performed using standard light microscopy during the first three days of incubation. When typical forms of the parasite (vacuolar, granular and amoeboid forms) were observed, *Blastocystis* sp. culture aliquots were frozen at -20°C for subsequent DNA extraction. An aliquot of fresh unpreserved stool samples was stored at -20°C prior to analysis. Statistical analyses were carried out with Epi-Info 3.5.1. Relationships between variables were examined by chi-square tests with significance levels set at 5%.

Molecular analysis

DNA extraction from cultured samples, positive for *Blastocystis* sp. and from human stools, positive for *E. histolytica* complex was carried out using the Qiamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to manufacturer's recommendations. Samples exhibiting

structures of the *E. histolytica* complex under microscopic examination were subjected to DNA amplification.

Nested PCR targeting 18S-like ribosomal RNA gene was applied to genetically identify the *E. histolytica*, *E. dispar* and *E. moshkovskii* complex [33]. First-round PCR for detection of *Entamoeba* genus used the forward primer E-1 (5' TAAGATGCACGAG AGCGAAA3') and reverse primer E-2 (5' GTACAAAG GGCAGGGACGTA 3'). PCR reaction was performed in a 50 μ L volume, with the final mix containing 10 \times PCR buffer, 1.25 mM of dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 10 pmoles of each primer, 2.5 U of Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and 2.5 μ L of DNA template. PCR cycles consisted of 5 min at 95°C and 40 cycles of 30 s at 95°C, 60 s at 56°C, and 60 s at 72°C, with a final step of 2 min at 72°C. Afterwards, the primary PCR products were subjected to second-round PCRs for *Entamoeba* species-specific characterization, which had multiple primers sets in the same tube. Amplification was achieved using the following primer sets EH-1 (5'-AAGCATTGTTTCTAGA TCTGAG-3') and EH-2 (5'-AAGAG GTCTAACCGAAATTAG-3') to detect *E. histolytica* (439 bp); ED-1 (5'-TCTAATTTTCGATTA GAACTCT-3') and ED-2 (5'-TCCCTACCTATTAGACATAGC-3') to detect *E. dispar* (174 bp); Mos-1 (5'-GAAACCAAGAGTTTCACAAC-3') and Mos-2 (5'-CAATATAAGGCTTGGATGA T-3') to detect *E. moshkovskii* (553 bp) [33]. For the second PCR round, only the annealing temperature was changed to 48°C, while all other amplification cycle parameters were unchanged. Amplified products were visualized with stained with Gelred (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) under UV transillumination after electrophoresis on 1.5% agarose gels. PCR amplification of partial SSU rDNA to identify subtypes of *Blastocystis* sp. was performed as protocol previously described [17], which amplifies a fragment approximately 500 bp long.

Genomic DNA was subjected to PCR analysis using primer pair Blast 505–532 (5' GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3') and Blast 998–1017 (5'TGC TTT CGC ACT TGT TCAT C 3'). The PCR reaction was performed in a final volume of 50 μ L and each reaction contained 100 mM of TrisHCl (pH 9.0), 500 mM of KCl, 1.5 mM of MgCl₂, 200 μ M of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP each, 0.2 μ M of primer, 1.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0.05% of bovine serum albumin (BSA), and 5 μ L of DNA sample. PCR conditions consisted of an initial cycle at 95°C for 5 min, 35 cycles including denaturing at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, extending at 72°C for 2 min, with a final step of 2 min at 72°C. PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel in Tris-borate ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) buffer, stained with Gelred (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) and visualized under UV transillumination. Amplicons were purified using the Wizard[®] SV gel and PCR clean up system kit (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced in both directions using Big Dye chemistries in an ABI3100 sequencer analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Our SSU rDNA partial gene sequences were deposited in GenBank under accession numbers KX523972 to KX524055. They were compared to available GenBank sequences using the BLASTN program on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). In addition, DNA sequences of ST1 to ST9 of *Blastocystis* sp. were downloaded from Genbank, and multiple sequence alignment was performed using the ClustalW algorithm of the MEGA software version 6.0 [34].

Phylogenetic analysis

To identify the phylogenetic position of isolates, phylogenetic trees were created using *Proteromonas lacertaeas*, as the outgroup [35, 36]. Phylogenetic trees were constructed using two probabilistic methods: Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI), which are based on HKY + G (gamma distribution of rates with four rate categories) model [37]. The

best model of nucleotide substitutions was selected based on the Akaike Information Criterion using Jmodeltest [38] for ML, and Mrmodeltest for BI [39]. The ML tree was created using PhyML 3.1 [40] and BI in MrBayes software version 3.2 [41]. Bootstrap values were calculated through the analysis of 1000 replicates for the ML analysis and through Bayesian posterior probability analysis using the MCMC algorithm, with four chains. Chains were run for 10^7 generations and sampled every 100 generations. Convergence was assessed by evaluating the average standard deviation of split frequencies, which were well below the recommended values (< 0.01). The first 25% of the sampled trees were discarded as burn-in for each data set, and the consensus tree topology and nodal support were estimated from the remaining samples as posterior probability values.

Results

A total of 294 individuals participated in this study, 145 (49.3%) males and 149 (50.7%) females (age range = 2–87 years, mean age = 38.3 years). Participants were stratified by age and gender (Table 1). There were 21 (7.1%) participants aged 1–5 years, 24 (8.2%) aged 6–14 years, 190 (64.6%) aged 15–55 years and 59 (20.1%) participants aged 55 years and over. A total of 126 individuals (42.8%) provided three stool samples, 99 (33.6%) two samples and 69 (23.4%) one sample. The study population was characterized predominantly by adults (81.2%). Overall, 189 of participants out of 294 (64.3%) were infected with at least one enteric parasite, with gender specific prevalence being 54.8% in males and 45.2% females. Prevalence was significantly different between the genders ($\chi^2 = 6.82$; $p = 0.009$). The total prevalence of protozoan infections was 60.2%. The most predominant species was *Blastocystis* sp., followed by *Endolimax nana*, *E. histolytica* complex, *Entamoeba coli*, and *Giardia intestinalis*. The total prevalence of helminth infections was 13.7%. Hookworm was the most prevalent helminth species, followed by *Trichuris trichiura* (Table 1).

All 21 microscopically samples positive for *E. histolytica* complex were successfully amplified by nested PCR. Of those samples, 20 (95%) were positive for *E. dispar* and one (5.0%) had a mixed infection of *E. histolytica* and *E. dispar*. Culture and Hoffman techniques, both used for diagnosis of *Blastocystis* sp., exhibited very similar sensibility: 118 of 164 (71.9%) samples were diagnosed as positive by both techniques, 24 only by the use of culture and 22 only by the Hoffman technique. There was no statistical difference between techniques ($p = 0.888$). Of the 164 samples positive for *Blastocystis* sp., a subset of 85 (51.8%) was successfully sequenced. The sequencing of partial SSU rDNA gene indicated the presence of subtypes: ST3 (34.0%), ST1 (27.0%), ST2 (27.0%), ST4 (3.5%), ST8 (7.0%) and a non-identified subtype (ID 210). Sequences showed high identity (98–100%) to sequences available at the NCBI database, while sample ID 210 returned a BLAST identity of 93%. Topology of the constructed phylogenetic tree revealed that ST1, ST2, ST3, ST4, ST8 and the non-identified ST clustered into well-supported clades (with grouped bootstrap values over 70.0% and Bayesian posterior probabilities) (Fig 1). The non-identified *Blastocystis* sp. ST is evolutionarily closer to ST7. Intra-ST diversity was observed in ST1, ST2 and ST3 as indicated by their small clades.

Discussion

We assessed the prevalence of IPIs and identity of *Blastocystis* sp. subtypes in a rural community of Rio de Janeiro, Brazil. IPIs have been described as the greatest worldwide cause of diseases [42]. Current epidemiological evaluations suggest that 450 million people, especially in developing countries, may host multiple parasite species [1]. Our results showed that 64.3% of participants presented IPIs, with the most common human parasite being *Blastocystis* sp., in accordance to previous work across Brazilian regions [12, 43–46]. Although IPIs had received

Table 1. Distribution of intestinal parasites according to age groups and gender.

	Age group, in years				Gender*		Total (%)
	1–5	6–14	15–55	55 y plus	M	F	
N° (%)	21(7.1)	24(8.2)	190(64.6)	59(20.1)	145(49.3)	149(50.7)	294(100)
Pos	8 (38.0)	12 (50.0)	128 (67.3)	41 (69.5)	103 (71.0)	86 (57.7)	189 (64.3)
Neg	13 (62.0)	12 (50.0)	62 (32.7)	18 (30.5)	42 (29.0)	63 (42.3)	105 (35.7)
Blast	7 (33.3)	10 (41.7)	110 (57.9)	37 (62.7)	92 (63.4)	72 (48.3)	164 (55.8)
Ec	2 (9.5)	1 (4.2)	9 (4.7)	5 (8.5)	10 (6.9)	7 (4.7)	17 (5.8)
Eh complex	2 (9.5)	1 (4.2)	14 (7.4)	4 (6.8)	12 (8.3)	9 (6.0)	21 (7.1)
En	2 (9.5)	0 (0.0)	44 (23.2)	9 (15.3)	33 (22.8)	22 (14.8)	55 (18.7)
Gi	2 (9.5)	3 (12.5)	5 (2.6)	2 (3.4)	9 (6.2)	3 (2.0)	12 (4.1)
Ib	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (3.4)	2 (1.4)	1 (0.7)	3 (1.0)
Hook	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (10.0)	2 (3.4)	13 (9.0)	8 (5.4)	21 (7.1)
Ss	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.7)	0 (0.0)	1 (0.3)
Ph	0 (0.0)	1 (4.2)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.3)	2 (0.7)
Al	1 (4.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.7)	1 (0.7)	1 (0.7)	2 (0.7)
Tt	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.6)	0 (0.0)	1 (0.7)	2 (1.3)	3 (1.0)
Ev	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (3.4)	1 (0.7)	1 (0.7)	2 (0.7)

Pos = positive samples; neg = negative samples; Blast = *Blastocystis* sp; Ec = *Entamoeba coli*; En = *Endolimax nana*; Eh complex = *E. histolytica*, *E. dispar*, or *E. moshkovskii* Gi = *Giardia intestinalis*; Ib = *Iodamoeba butschlii*; Hook = hookworm; Ss: *Strongyloides stercoralis*; Tt = *Trichuris trichiura*; Ph = *Pentatrichomonas hominis*; Al = *Ascaris lumbricoides*; EV = *Enterobius vermicularis*. F = female; M = male; y = years.

*(p = 0.009)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193860.t001>

attention in Sumidouro as early as 1995, most of these efforts targeted Schistosomiasis. Gonçalves et al. [47] previously reported a prevalence of 13% of hookworm, 5% of *Ascaris lumbricoides*, 20% of *Entamoeba coli* and 10% of *Giardia intestinalis* in the Sumidouro population. The prevalence of protist parasites that we are reporting is much higher than of helminths, which may be explained by self-medication (antihelminths) practiced by the population, or by the use of pesticides in agriculture above recommended doses, which may have a significant effect on soil-transmitted helminths survival. However, these hypotheses still require investigation.

We also identified statistically significant differences in infection rates between men and women. Several investigations have reported a higher prevalence of parasitic infection in males than females [48, 49]. A possible explanation is the higher engagement of males in farming activities. Most of the Sumidouro population is rural and their most important economic activities are cattle breeding and vegetable cultivation. People from rural communities usually eat fresh food, drink untreated water and disposal of sewage is generally inadequate [50], resulting in increased infection risk. The diversity of protist parasites revealed by our analyses suggest that their distribution depends on factors such as environmental conditions, lack of sanitation and health education, confirming previous studies in rural communities [51, 52]. It was shown that short-term xenic *in vitro* culture (XIVC) is a more sensitive diagnostic method than parasitological examination [53]. Contrary to the expectations, our findings showed that the proportion of specimens negative by parasitological examination but positive by xenic *in vitro* culture, and vice-versa, were similar. The likely explanation is that the fecal samples did not contain viable *Blastocystis* sp. or alternatively cultured organisms were scant and imperceptible thereby avoiding detection by microscopy. Moreover, the screening of *Blastocystis* sp. cultures was performed in the first three days of incubation, when parasite count was low due to slow growth rates.

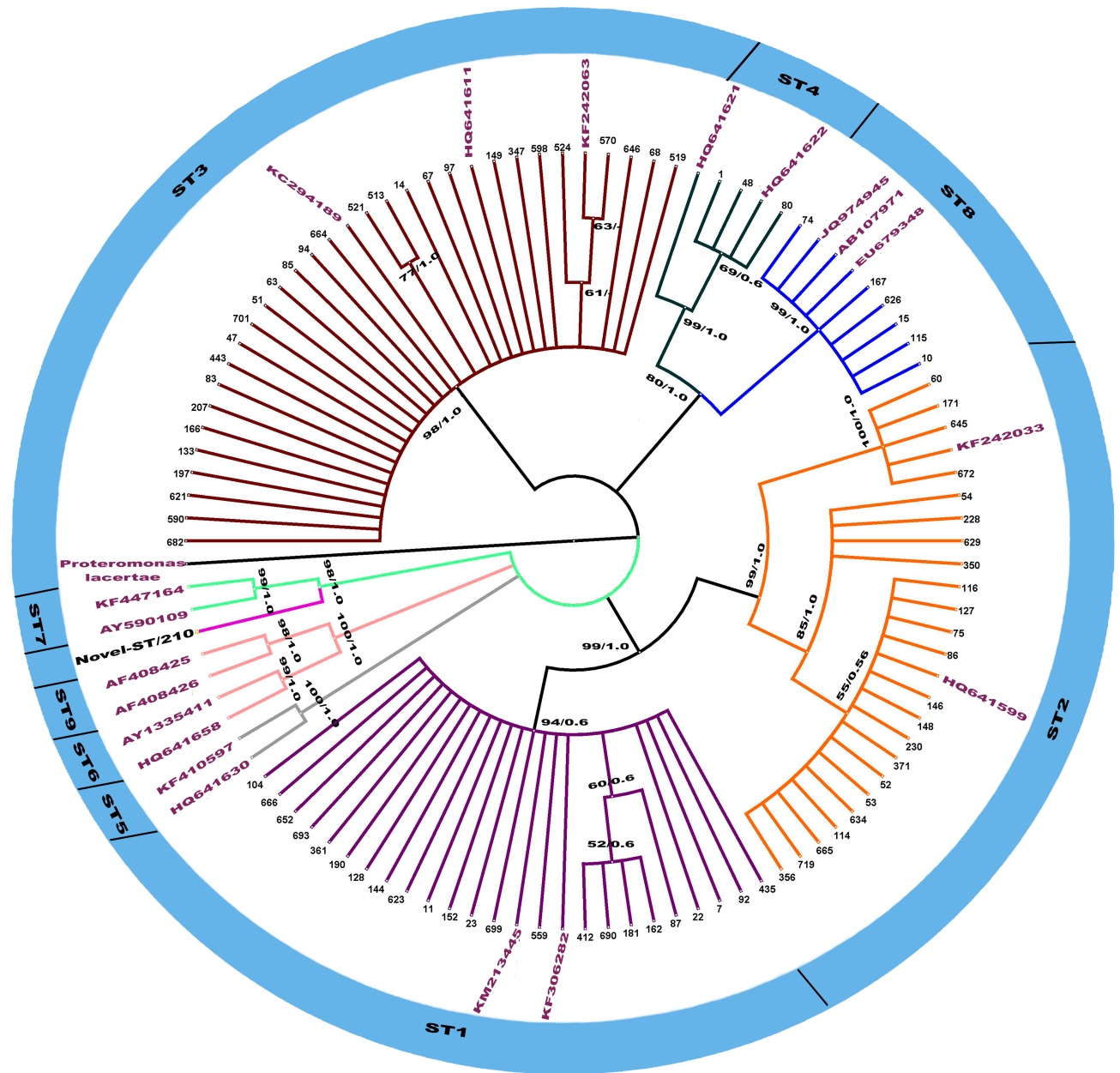


Fig 1. Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) trees based on the partial sequences of the partial SSU rDNA (437 bp) of *Blastocystis* sp. isolates of the present study. The high genetic divergence of rDNA gene revealed six clusters (denoted by ST1, 2, 3, 4, 8 and Novel-ST). The numbers along branches correspond to bootstrap values and Bayesian posterior probability values (values above 50% are shown) in the order: MP/BI.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193860.g001>

Screening after a week of cultivation for example might reveal additional positives missed by the analyses performed herein.

The predominant *Blastocystis* sp. subtype was ST3, ST1 and ST2. STs 1, 2 and 3 had already been identified as the most abundant subtypes in previous studies [53–56]. Recently, Ramirez et al. [21] have reported percentages ranging from 15 to 92% regarding these subtypes. Other investigations have singled out ST3 as the most frequent subtype [18, 57–64]. Subtypes 1 and 2 have been identified both in humans and a wide range of synanthropic animals such as pigs, rats, dogs, horses, monkeys, cattle and chickens [15, 16, 65]. A recent study using animal

models revealed that various human *Blastocystis* sp. subtypes, including ST1 and ST2, could infect chickens and rats [66, 67], suggesting the zoonotic potential of human *Blastocystis* sp. isolates. We also observed the occurrence of ST4 in only three residents, although this subtype is the second most common in the UK and commonly found across Europe [15, 27, 68–70]. In Colombia, ST4 was identified in a few humans and non-human primates [21]. Rodents were also shown to be reservoir hosts of ST4 [23, 71]. Brazil was the only country in South America where ST8 has been identified [21], although it was also found in Denmark, the UK, Italy and Australia [62, 65, 72, 73]. Large American opossums and non-human primates can be infected by ST8, which is rarely found in other hosts [18]. We could not identify the subtype from sample 210. However, our phylogenetic tree shows that the sample is closely related to ST7. A similar case was reported by Ramirez et al. [21] who reported a novel ST closely related to ST1 and found in six South American countries including Brazil. Further analyses and full-length sequencing of the SSU-rDNA gene are required to truly confirm the existence of the novel ST.

Conclusion

Our study revealed the presence of IPIs in a rural community in Brazil, with high prevalence and a wide diversity of *Blastocystis* sp. subtypes, and possibly a new subtype of the protozoan. Our findings reinforce the need for additional studies of *Blastocystis* sp. subtype diversity, which may contribute to more efficient identification of infection sources and potential transmission routes under various ecological conditions, as well as a re-evaluation of control strategies by public health services.

Supporting information

S1 Table. New sequences generated as a result of this study.
(DOCX)

Acknowledgments

The authors thank Marisa Soares for her significant contributions given to the study and the staff from the DNA sequencing platform/*PDTIS* Fiocruz.

Author Contributions

Conceptualization: Heloisa Werneck de Macedo, Helena Lucia Carneiro Santos.

Data curation: Helena Lucia Carneiro Santos.

Formal analysis: Claudia Masini d'Avila-Levy, Heloisa Werneck de Macedo.

Funding acquisition: José Mauro Peralta.

Investigation: Ricardo Pereira Igreja.

Methodology: Carolina Valença Barbosa, Magali Muniz Barreto, Rosemary de Jesus Andrade, Fernando Sodré, Helena Lucia Carneiro Santos.

Writing – original draft: Carolina Valença Barbosa, Helena Lucia Carneiro Santos.

Writing – review & editing: Helena Lucia Carneiro Santos.

References

- Robertson LJ, van der Giessen JW, Batz MB, Kojima M, Cahill S. Have foodborne parasites finally become a global concern? *Trends Parasitol.* 2013; 29(3):101–3. Epub 2013/02/05. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.12.004> PMID: 23375923.
- de Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol.* 2003; 19(12):547–51. Epub 2003/12/03. PMID: 14642761.
- Alum A, Rubino JR, Ijaz MK. The global war against intestinal parasites—should we use a holistic approach? *Int J Infect Dis.* 2010; 14(9):e732–8. Epub 2010/04/20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.11.036> PMID: 20399129.
- Agudelo-Lopez S, Gomez-Rodriguez L, Coronado X, Orozco A, Valencia-Gutierrez CA, Restrepo-Betancur LF, et al. Prevalence of intestinal parasitism and associated factors in a village on the Colombian Atlantic Coast. *Rev Salud Publica (Bogota).* 2008; 10(4):633–42. Epub 2009/04/11. PMID: 19360213.
- Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Ahmed A, Surin J, Mak JW. Drinking water is a significant predictor of *Blastocystis* infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology.* 2012; 139(8):1014–20. Epub 2012/03/27. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000340> PMID: 22444778.
- Speich B, Croll D, Furst T, Utzinger J, Keiser J. Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16(1):87–99. Epub 2015/09/26. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00349-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00349-7) PMID: 26404667.
- Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol.* 2009; 160(3–4):295–300. Epub 2009/01/13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.029> PMID: 19136214.
- Helenbrook WD, Shields WM, Whipps CM. Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*, living in close proximity to one another. *Parasitol Res.* 2015; 114(7):2517–25. Epub 2015/04/11. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4451-x> PMID: 25859926.
- Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T, Arayama S, Asih PB, Rozi IE, et al. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol Int.* 2016; 65(6 Pt B):780–4. Epub 2016/04/16. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.03.010> PMID: 27080248.
- Turkeltaub JA, McCarty TR, 3rd, Hotez PJ. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015; 31(1):38–44. Epub 2014/11/14. <https://doi.org/10.1097/MOG.000000000000135> PMID: 25394233.
- Hotez PJ, Bottazzi ME, Strych U, Chang LY, Lim YA, Goodenow MM, et al. Neglected tropical diseases among the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN): overview and update. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(4):e0003575. Epub 2015/04/17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003575> PMID: 25880767; PubMed Central PMCID: PMC4400050.
- David EB, Guimaraes S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, Moraes Nardi AR, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of Sao Paulo, Brazil. *Parasit Vectors.* 2015; 8:103. Epub 2015/04/19. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0714-8> PMID: 25889093; PubMed Central PMCID: PMC4335703.
- Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet Parasitol.* 2004; 120(3):235–42. Epub 2004/03/26. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.003> PMID: 15041098.
- Yoshikawa H, Abe N, Wu Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology.* 2004; 150(Pt 5):1147–51. Epub 2004/05/11. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26899-0> PMID: 15133074.
- Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol.* 2009; 39(4):473–9. Epub 2008/08/30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.006> PMID: 18755193.
- Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol.* 2010; 169(1–2):8–17. Epub 2010/01/22. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.032> PMID: 20089360.
- Santin M, Gomez-Munoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res.* 2011; 109(1):205–12. Epub 2011/01/07. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2244-9> PMID: 21210149.

18. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, et al. Genetic diversity of *blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist*. 2013; 164(4):497–509. Epub 2013/06/19. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.003> PMID: 23770574.
19. Rajah Salim H, Suresh Kumar G, Vellayan S, Mak JW, Khairul Anuar A, Init I, et al. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitol Res*. 1999; 85(12):1032–3. Epub 1999/12/22. PMID: 10599928.
20. Balint A, Doczi I, Bereczki L, Gyulai R, Szucs M, Farkas K, et al. Do not forget the stool examination!—cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitol Res*. 2014; 113(4):1585–90. Epub 2014/02/21. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3805-0> PMID: 24553977.
21. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol*. 2014; 22:223–8. Epub 2013/07/28. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.020> PMID: 23886615.
22. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol*. 2012; 12(2):263–73. Epub 2011/11/26. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.002> PMID: 22116021.
23. Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(1):348–55. Epub 2005/01/07. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.348-355.2005> PMID: 15634993; PubMed Central PMCID: PMC540115.
24. 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*. 2007; 134(Pt 3):359–67. Epub 2006/10/21. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001582> PMID: 17052374.
25. Yan Y, Su S, Ye J, Lai X, Lai R, Liao H, et al. *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitol Res*. 2007; 101(6):1527–32. Epub 2007/08/01. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0672-y> PMID: 17665214.
26. Cian A, El Safadi D, Osman M, Moriniere R, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, et al. Molecular Epidemiology of *Blastocystis* sp. in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0169659. Epub 2017/01/07. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169659> PMID: 28060901;
27. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KE, Nielsen HV. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 84(6):883–5. Epub 2011/06/03. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0005> PMID: 21633023; PubMed Central PMCID: PMC3110361.
28. BRASIL. Contagem Populacional. Censo Demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2010.
29. Nimer E. Climatologia do Brasil 2.ed. ed: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais; 1989.
30. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in *schistosomiasis mansoni*. *P R J Publ Health Trop Med*. 1934; 9: 283–91.
31. Willis H H. A simple levitation method for the detection of hook-worm ova. *Medicine Journal of Australia*. 1921; 29: 375–376
32. Zerpa LRH, L.; Naquira C.; Espinoza I. A simplified culture method for *Blastocystis hominis*. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 2000; 47(1):17–9.
33. Khairnar K, Parija SC. A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. *BMC Microbiol*. 2007; 7:47. Epub 2007/05/26. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-47> PMID: 17524135; PubMed Central PMCID: PMC1888694.
34. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(12):2725–9. Epub 2013/10/18. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197> PMID: 24132122; PubMed Central PMCID: PMC3840312.
35. Leipe DD TS, Goggin CL, Slemenda SB, Pieniazek NJ, Sogin ML. 16S-like rDNA sequences from *Developayella elegans*, *Labyrinthuloides haliotidis*, and *Proteromonas lacerate* confirm that the stramenopiles are a primarily heterotrophic group. *European Journal of Protistology*. 1991; 32(4):449–58. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(96\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80004-6)
36. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*. 1996; 380(6573):398. Epub 1996/04/04. <https://doi.org/10.1038/380398a0> PMID: 8602239.
37. Hasegawa M, Iida Y, Yano T, Takaiwa F, Iwabuchi M. Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *J Mol Evol*. 1985; 22(1):32–8. Epub 1985/01/01. PMID: 3932662.

38. Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol.* 2004; 53(5):793–808. Epub 2004/11/17. <https://doi.org/10.1080/10635150490522304> PMID: 15545256.
39. Nylander JAA. Mrmodeltest 2.3. Program Distributed by the Author. Uppsala University; Uppsala, Switzerland. 2004.
40. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003; 52(5):696–704. Epub 2003/10/08. PMID: 14530136.
41. Huelsenbeck JP, Ronquist F. Bayesian Analysis of Molecular Evolution Using MrBayes 2005. 183–226 p.
42. Steketee RW. Pregnancy, nutrition and parasitic diseases. *J Nutr.* 2003; 133(5 Suppl 2):1661S–7S. Epub 2003/05/06. PMID: 12730482.
43. Aguiar JI, Goncalves AQ, Sodre FC, Pereira Sdos R, Boia MN, de Lemos ER, et al. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(6):631–4. Epub 2008/01/18. PMID: 18200414.
44. Gil FF, Busatti HG, Cruz VL, Santos JF, Gomes MA. High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. *Pathog Glob Health.* 2013; 107(6):320–4. Epub 2013/10/05. <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.000000107> PMID: 24091002; PubMed Central PMCID: PMC4001612.
45. Rebolla MF, Silva EM, Gomes JF, Falcao AX, Rebolla MV, Franco RM. High prevalence of *Blastocystis* spp. infection in children and staff members attending public urban schools in Sao Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016; 58:31. Epub 2016/04/14. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658031> PMID: 27074325; PubMed Central PMCID: PMC4826084.
46. Cabrine-Santos M, Cintra Edo N, do Carmo RA, Nascentes GA, Pedrosa AL, Correia D, et al. Occurrence of *Blastocystis* spp. in Uberaba, Minas Gerais, BRAZIL. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57(3):211–4. Epub 2015/07/23. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000300005> PMID: 26200960; PubMed Central PMCID: PMC4544244.
47. Goncalves MM, Barreto MM, Maldonado A, Jr., Maione VR, Rey L, Soares Mda S. [Socio-cultural and ethical factors involved in the diagnosis of *schistosomiasis mansoni* in an area of low endemicity]. *Cad Saude Publica.* 2005; 21(1):92–100. Epub 2005/02/05. doi: /S0102-311X2005000100011. PubMed PMID: 15692642.
48. Goncalves AQ, Junqueira AC, Abellana R, Barrio PC, Terrazas WC, Sodre FC, et al. Prevalence of intestinal parasites and risk factors for specific and multiple helminth infections in a remote city of the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016; 49(1):119–24. Epub 2016/05/11. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0128-2015> PMID: 27163576.
49. Nasiri V, Esmailnia K, Karim G, Nasir M, Akhavan O. Intestinal parasitic infections among inhabitants of Karaj City, Tehran province, Iran in 2006–2008. *Korean J Parasitol.* 2009; 47(3):265–8. Epub 2009/09/03. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.3.265> PMID: 19724700; PubMed Central PMCID: PMC42735692.
50. Boonjaraspinyo S, Boonmars T, Kaewsamut B, Ekobol N, Laummaunwai P, Aukkanimart R, et al. A cross-sectional study on intestinal parasitic infections in rural communities, northeast Thailand. *Korean J Parasitol.* 2013; 51(6):727–34. Epub 2014/02/12. <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.6.727> PMID: 24516280; PubMed Central PMCID: PMC43916464.
51. Valverde JG, Gomes-Silva A, De Carvalho Moreira CJ, Leles De Souza D, Jaeger LH, Martins PP, et al. Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011; 105(6):413–24. Epub 2011/11/29. <https://doi.org/10.1179/1364859411Y.0000000034> PMID: 22117850; PubMed Central PMCID: PMC4100303.
52. Damazio SM, Lima Mde S, Soares AR, Souza MA. Intestinal parasites in a quilombola community of the Northern State of Espirito Santo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013; 55(3). Epub 2013/06/07. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000300007> PMID: 23740008.
53. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 59(3):303–7. Epub 2007/10/05. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003> PMID: 17913433.
54. Popruk S, Udonsom R, Koombapong K, Mahittikorn A, Kusolsuk T, Ruangsittichai J, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* in Thai-Myanmar border, Thailand. *Korean J Parasitol.* 2015; 53(1):13–9. Epub 2015/03/10. <https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.1.13> PMID: 25748704; PubMed Central PMCID: PMC4384802.
55. Malheiros AF, Stensvold CR, Clark CG, Braga GB, Shaw JJ. Short report: Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirape ethnic group from the Brazilian

- Amazon region, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85(6):1050–3. Epub 2011/12/07. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0481> PMID: 22144442; PubMed Central PMCID: PMC3225150.
56. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80(4):588–92. Epub 2009/04/07. PMID: 19346381.
 57. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *blastocystis*. *Protist.* 2006; 157(1):77–85. Epub 2006/01/25. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.12.001> PMID: 16431158.
 58. Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, et al. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol Res.* 2006; 99(5):597–601. Epub 2006/05/12. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0186-z> PMID: 16688468.
 59. Ozyurt M, Kurt O, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int.* 2008; 57(3):300–6. Epub 2008/03/14. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.01.004> PMID: 18337161.
 60. Jones MS, Whipps CM, Ganac RD, Hudson NR, Boorum K. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitol Res.* 2009; 104(2):341–5. Epub 2008/10/17. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1198-7> PMID: 18923844.
 61. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res.* 2010; 106(2):505–11. Epub 2009/12/03. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1693-5> PMID: 19953268.
 62. Meloni D, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Chabe M, Delhaes L, et al. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res.* 2011; 109(3):613–9. Epub 2011/02/23. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2294-7> PMID: 21340563.
 63. Bart A, Wentink-Bonnema EM, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJ, van Vugt M, et al. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:389. Epub 2013/08/27. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-389> PMID: 23972160; PubMed Central PMCID: PMC3765316.
 64. Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, et al. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infect Genet Evol.* 2015; 31:296–9. Epub 2015/02/24. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.012> PMID: 25701123.
 65. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32(3):335–43. Epub 2012/09/22. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1746-z> PMID: 22996007.
 66. Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, et al. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol Int.* 2007; 56(2):107–12. Epub 2007/01/26. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2006.12.004> PMID: 17251054.
 67. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res.* 2008; 102(5):853–60. Epub 2008/01/15. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0833-z> PMID: 18193282.
 68. Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark CG, Evengard B. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31(7):1689–96. Epub 2012/02/22. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1416-6> PMID: 22350386.
 69. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(3):975–83. Epub 2010/12/24. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-10> PMID: 21177897; PubMed Central PMCID: PMC3067686.
 70. Dominguez-Marquez MV, Guna R, Munoz C, Gomez-Munoz MT, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol Res.* 2009; 105(4):949–55. Epub 2009/05/28. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1485-y> PMID: 19471964.
 71. Yoshikawa H, Nagano I, Wu Z, Yap EH, Singh M, Takahashi Y. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Mol Cell Probes.* 1998; 12(3):153–9. Epub 1998/07/17. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0161> PMID: 9664577.
 72. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol.* 2006; 92(5):1081–7. Epub 2006/12/13. <https://doi.org/10.1645/GE-840R.1> PMID: 17152954.
 73. Clark CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 87(1):79–83. Epub 1997/07/01. PMID: 9233675.