Gessica Baptista de Melo

**Identificação de subtipos de *Blastocystis* sp. isolados de indivíduos
acompanhados no Hospital das Clínicas de São Paulo (HC/FMUSP), São
Paulo, Brasil**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade de
São Paulo da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Doenças
Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Associado Ronaldo
Cesar Borges Gryscek

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da

Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Melo, Gessica Baptista de

Identificação de subtipos de *Blastocystis* sp. isolados de indivíduos acompanhados no Hospital das Clínicas de São Paulo (HC/FMUSP), São Paulo, Brasil / Gessica Baptista de Melo. – São Paulo, 2016.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Ronaldo Cesar Borges Gryscek

Descritores: 1. BLASTOCYSTIS - BRASIL. 2. ALELOS.

USP/IMTSP/BIB-15/2016.

Para Deus seja toda honra e glória.

*Aos meus pais e familiares por todo amor e incentivo inestimável,
nunca me deixando perder a fê nesta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao principal autor e consumidor deste trabalho, Deus, que sempre esteve ao meu lado, nunca me deixando desanimar independente das circunstâncias. Sem Ele nada disso poderia se tornar realidade.

À minha família, meus maiores incentivadores, que sempre me encorajaram em cada momento da minha vida, você são tudo para mim! Em especial aos meus pais Joice Baptista de Melo e Antônio Lopes de Melo, por tudo o que fizeram por mim para a realização deste sonho, vocês foram fundamentais nessa jornada! Em memória à minha vó Divina Aparecida de Melo que nos deixou no meio dessa jornada. O seu entusiasmo por este sonho jamais será esquecido.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek por se dispor a me orientar neste trabalho, pelo seu profissionalismo e encorajamento profissional sendo quem me apresentou a este organismo enigmático e fascinante chamado *Blastocystis*. Muito obrigada por todo incentivo e confiança sempre!

À Doutora Fabiana Martins de Paula pela confiança e oportunidade de estar realizando este trabalho no laboratório, por todos os ensinamentos e contribuições valiosas, tendo sempre paciência em me auxiliar no decorrer deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

À Doutora Fernanda de Mello Malta pela disposição e importantíssimo auxílio durante o decorrer deste trabalho, disposta a sempre ajudar quando fosse necessário.

Ao MSc. Prof. William Roldan pelo importante auxílio nas etapas iniciais deste trabalho.

À Doutora Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo por todo apoio e carinho que sempre teve por mim. Obrigada por todos os conselhos e amizade.

À minha amiga MSc. Priscilla Duarte Marques, pela amizade e força ao longo destes últimos anos, e por todos os ensinamentos laboratoriais para realização deste trabalho.

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Investigação Médica (LIM06) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, que de forma direta ou indireta, me deram incentivo para a concretização deste trabalho.

Em especial agradeço ao MSc. Marcelo Andreetta Corral e Doutora Dirce Mary Correia Lima por todos os conselhos, amizade e apoio que sempre me deram durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos meus amigos, em especial Karina Martins da Silva, Adamo Bastos da Silva, Maria Lúcia Alberti, Elaine Santos da Costa, Thaís Aparecida Schuenker Nakamura, Diogo Fernandes Correia, Fernanda Mariano Porto Martins, Danilo Barbosa Pestana, Aline Aparecida Finco, Anna Carolina Eugenio Parraz, Raul Pereira da Silva, Anderson Aparecido Pileckas, Juvenal do Nascimento Alves (Tuti), Jéssica Simões de Araújo e Sandra Olhero Botas. Muito obrigada por toda paciência, carinho e incentivo que sempre me deram ao longo dessa jornada, me ajudando e ouvindo sempre quando precisava, vocês são incríveis! Ao meu casal favorito Milena Fernandes de Castro e Gilson Gonçalves de Castro por todas sábias palavras e por serem exemplos na fé para mim, obrigada por tudo! A todos da igreja Bola de Neve Tatuapé que sempre estiveram me estimulando e dando força, nunca me deixando desanimar na fé.

À técnica de laboratório Magali Orban da Seção de Parasitologia da Divisão do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo, pela valiosa contribuição e auxílio na coleta das amostras clínicas deste trabalho.

Às Doutoras Elenice Messias do Nascimento Gonçalves e Vera Lúcia Pagliusi Castilho da Seção de Parasitologia da Divisão do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por toda colaboração e auxílio para este trabalho.

À Doutora Celina Wakisaka Maruta e Doutor Paulo Ricardo Criado do Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela colaboração e auxílio para este trabalho.

À Doutora Camila Romano e ao Doutor Marcello Magri pelas contribuições importantes concedidas em meu exame de qualificação.

À Eliane Araújo, secretária do programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por toda ajuda e disposição para a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela oportunidade de realização deste trabalho.

"Quanto mais eu estudo a natureza, mais fico impressionado com a obra do Criador. Nas menores de suas criaturas Deus colocou propriedades extraordinárias..."

Louis Pasteur

RESUMO

Melo GB. Identificação de subtipos de *Blastocystis* sp. isolados de indivíduos acompanhados no Hospital das Clínicas de São Paulo (HC/FMUSP), São Paulo, Brasil. (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Blastocystis sp. é um protozoário comumente encontrado em amostras fecais de humanos e animais, envolto por aspectos patogênicos e zoonóticos ainda controversos. Estudos recentes têm demonstrado a distribuição dos subtipos (STs) de *Blastocystis* sp., porém são escassos os relatos sobre a sua caracterização molecular na América Latina, sobretudo no Brasil. O objetivo do presente estudo foi investigar os STs presentes em isolados fecais de indivíduos acompanhados no Hospital das Clínicas de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP). Para tanto, amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp. diagnosticadas na Seção de Parasitologia do Laboratório Central (HC/FMUSP) foram utilizadas para o isolamento de DNA. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando iniciadores específicos para a subunidade 18S do DNA ribossomal de *Blastocystis* sp. A reação de sequenciamento dos produtos de PCR foi realizada, as sequências de DNA obtidas foram alinhadas e comparadas com outras sequências da base de dados *GenBank* e *MLST*. Foram identificados os STs (ST1, ST2, ST3 e ST6), sendo o ST3 o mais prevalente entre os isolados humanos seguido pelo ST1. Os alelos de número 34 e 36 foram os mais frequentes. Em conclusão, estes resultados contribuem para a caracterização molecular e a distribuição dos STs de *Blastocystis* sp. em amostras de fezes humanas no Brasil.

Descritores: *Blastocystis*. Brasil. Alelos

ABSTRACT

Melo GB. Identification of *Blastocystis* sp. subtypes isolated from individuals of Hospital das Clínicas de São Paulo (HC/FMUSP), São Paulo, Brazil. (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Blastocystis sp. is an organism described as enteroparasite protozoan, commonly found in stool samples from humans. Several subtypes have been described in humans, but pathogenic potential and aspects epidemiological are still controversial. The aim of the present study was to investigate *Blastocystis* subtypes (STs) from patients of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP), Brazil. *Blastocystis* sp. positive stool samples diagnosed in Section of Parasitology of Central Laboratory (HC/FMUSP) were used for DNA isolation. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using specific primers targeting the small subunit of rRNA gene. Direct DNA sequencing of PCR products was performed, and the DNA sequences were aligned and compared to other sequences present in GenBank and MLST database. Four STs were identified (ST1, ST2, ST3 and ST6), where the ST3 was the most prevalent ST among human isolates followed by ST1. Allele nos. 34 and 36 were the most frequent. Another important finding is the presence of ST6, rarely detected in human isolates. In conclusion, our results contribute to the molecular characterization and distribution of *Blastocystis* sp. STs in human stool specimens in Brazil.

Descriptors: *Blastocystis*. Brazil. Alleles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas visualizadas em isolados fecais humanos por Brumpt, 1912	13
Figura 2. Análise filogenética de <i>Blastocystis</i> sp.	15
Figura 3. Lâminas feitas a partir de culturas axênicas <i>in vitro</i> de <i>Blastocystis</i> sp.	17
Figura 4. Lâminas feitas por esfregaços de amostras fecais de aves corados com coloração <i>Giemsa</i>	18
Figura 5. Ciclo biológico proposto para <i>Blastocystis</i> sp.	19
Figura 6. Sequência parcial heterogênia encontrada nos STs isolados de <i>Blastocystis</i> sp. a partir de análise das subunidades ribossômicas (SSU-rDNA)	23
Figura 7. Amplificação de DNA, utilizando o iniciador específico (~600bp), a partir de amostra proveniente da cultura de <i>Blastocystis</i> sp.	43
Figura 8. Amplificação de DNA, proveniente de amostra de culturas de <i>Blastocystis</i> sp. utilizando o iniciador específico (~600bp) para determinar a temperatura ideal de anelamento	43
Figura 9. Amplificação de DNA, proveniente de amostra fecal positiva para <i>Blastocystis</i> sp., utilizando o iniciador universal (~140bp) para determinar a temperatura de anelamento	44
Figura 10. Amplificação de DNA, proveniente de culturas de <i>Blastocystis</i> sp., utilizando o iniciador específico (~600bp) para teste da sensibilidade da cPCR em diferentes concentrações de DNA (5, 10, 15 e 20ng/μL)	44
Figura 11. Amplificação de DNA, proveniente de amostra fecal de paciente positiva para <i>Blastocystis</i> sp., utilizando o iniciador específico (~600bp) para teste da	

sensibilidade da cPCR em diferentes concentrações de DNA (5, 10, 15 e 20 ng/ μ L).....45

Figura 12. Amplificação de DNA, proveniente de amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp.45

Figura 13. Amplificação de DNA, proveniente de algumas amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp., utilizando o iniciador específico (~600bp) para teste da positividade da cPCR46

Figura 14. Análise filogenética de *Blastocystis* sp. com as sequências geradas neste estudo (identificada pelo triângulo de cor cinza) e sequências de referência do *GenBank* (identificada pelo número de ascensão e de origem). A árvore filogenética foi construída utilizando o método de *Neighbor-Joining* (NJ). Valores de *bootstrap* foram baseados em 1000 réplicas47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de STs de <i>Blastocystis</i> sp. de acordo com o hospedeiro e origem	24
Tabela 2. Iniciadores para reação da PCR para detecção DNA nas amostras fecais.....	34
Tabela 3. Número de formas de <i>Blastocystis</i> sp. visualizadas nas 60 amostras fecais diagnosticadas pelas técnicas parasitológicas	41
Tabela 4. Distribuição dos alelos identificados nos STs de <i>Blastocystis</i> sp.	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Positividade de *Blastocystis* sp. pelas técnicas parasitológicas nas 60 amostras fecais dos indivíduos acompanhados no HC/FMUSP de 2014 a 2015.....42

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

STs – Subtipos

et al – e outros

HC/FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LIM – Laboratório de Investigação Médica

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

GenBank – Banco de dados de sequências

MLST – Tipagem de Sequencias de Multi *locus* (Multilocus Sequence Typing)

cPCR – Reação em cadeia da polimerase convencional

SSU-rDNA – Técnica de análise de sequências das subunidades ribossomais

FECT – Técnica de concentração em formol-éter

XIVC – Técnica de cultura em meio axênico

B. hominis – *Blastocystis hominis*

ELISA – Ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

WB – Técnica de Western-blotting

RFLP – Polimorfismo no Comprimento do Fragmentos de Restrição

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time Polymerase Chain Reaction)

RNA – Ácido ribonucleico

RD5 – Oligonucleotídeo iniciador de especificidade eucariótica

BhRDr – Oligonucleotídeo iniciador de especificidade para *Blastocystis* sp.

CAPPesq – Comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

PBS – Tampão Fosfato-salino

TA – Temperatura ambiente

Primer – Oligonucleotídeo iniciador

ddNTPs – Didesoxinucleotídeos trifosfatos

dNTPs – Desoxinucleotídeos trifosfatos

BSA – Albumina Sérica Bovina

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

EDTA – Ácido etilenodiamino-tetracético

bp – Pares de bases

PM – Padrão de peso molecular

CP – Controle positivo

CN – Controle negativo

TBE – Tris-ácido bórico e EDTA

NJ – Técnica de Neighbor-Joining

µm – Micrometro

°C – Graus Celsius

M – Molar

mL – mililitros

rpm – Rotações por minuto

pH – Potencial hidrogeniônico

μL – Microlitros

pmol – Picomol

mA – Miliampers

mM – Milimolar

ng - Nanograma

% - Porcentagem

U – unidade

~ - Aproximadamente

g – Gramas

X – Vezes

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Aspectos históricos e taxonômicos	12
2.2 Morfologia	15
2.3 Ciclo biológico	18
2.4 Estudos experimentais	20
2.5 Diagnóstico parasitológico	20
2.6 Diagnóstico sorológico	21
2.7 Diagnóstico molecular	22
2.8 Diversidade genética e aspectos clínicos	24
2.9 Infecção por <i>Blastocystis</i> sp.	25
3 JUSTIFICATIVA	27
4 OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo geral	28
4.2 Objetivos específicos	28
5 CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
5.1 Aspectos éticos	29
5.2 Normas de biossegurança	29
5.3 Fluxograma de trabalho	30
5.4 População de estudo	30
5.5 Processamento das amostras	31
5.6 Extração de DNA	32
5.7 Quantificação de DNA nas amostras	33
5.8 Controle positivo	33
5.9 Iniciadores (<i>primers</i> específico e universal)	33
5.10 Reação em Cadeia da Polimerase (cPCR)	34
5.11 Eletroforese	35
5.11.1 Organograma de análise das amostras	36
5.12 Reação de sequenciamento	37
5.13 Subtipagem	39
5.14 Análise dos dados	40
6 RESULTADOS	41
6.1 Positividade de <i>Blastocystis</i> sp. pelas técnicas parasitológicas	41
6.2 Análise dos iniciadores	42
6.3 Sensibilidade e especificidade da cPCR para detecção de <i>Blastocystis</i> sp.	44
6.4 Positividade de <i>Blastocystis</i> sp. pelas técnicas moleculares	46
6.5 Sequenciamento	46
6.6 Identificação dos alelos nos STs de <i>Blastocystis</i> sp.	48
7 DISCUSSÃO	49
8 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO	64

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve grande atenção quanto à elevada positividade de exames parasitológicos de fezes para *Blastocystis*. Esse organismo, até pouco tempo desconhecido, é envolto por aspectos patogênicos e zoonóticos ainda controversos.

O panorama epidemiológico de *Blastocystis* sp. permanece por ser definido. Sabe-se que este organismo possui distribuição mundial, com cerca de um bilhão de indivíduos infectados^{1,2}. Em constante crescimento, sua positividade tem variado de 1,5-10% e 30-60% em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente^{3,4}. Estudos epidemiológicos sugerem que a maior frequência nos países em desenvolvimento, pode estar relacionada com a precariedade das condições higiênicas, a exposição direta a animais, ao consumo de alimentos e água contaminada, que favorecem a contaminação da população humana, uma vez que sua transmissão dá-se por via fecal-oral^{2,5}.

Estudos recentes têm apresentado informações sobre a distribuição dos subtipos (STs) na população humana, sendo escassos relatos na América Latina^{6,7,8,9}. No Brasil, até o momento existem dois estudos envolvendo a subtipagem de *Blastocystis*^{8,9}. Com isso pesquisas voltadas para a caracterização molecular de *Blastocystis* podem contribuir para seu maior conhecimento na América do Sul, sobretudo no Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos e taxonômicos

A história de *Blastocystis* sp. é composta por um panorama de avanços em conhecimento, seguido por décadas de incertezas até sua retomada nos dias atuais, sobretudo pelo elevado número de resultados parasitológicos positivos para este organismo¹⁰.

Em 1849, Brittan¹¹ e Swayne¹² estudando a epidemia de cólera na cidade de Londres, a partir de isolados fecais diarreicos de pacientes, observaram formas ditas como corpos de cólera ou células anulares como possíveis agentes etiológicos da cólera. Na época nada foi confirmado. Em 1899, Perroncito¹³ forneceu uma descrição para estes achados, afirmando que estas formas anulares eram, possivelmente, membros da subclasse Coccidia, composta por protistas que se localizam em células epiteliais do intestino, rins e fígado. No mesmo ano Borrini¹⁴, um companheiro de pesquisa, denominou este organismo como sendo um protozoário, “novo parasita Perroncito”. Porém não há ilustrações ou documentação suficiente para afirmar que estes foram os primeiros achados de *Blastocystis* sp.¹⁰.

O primeiro relato publicado sobre *Blastocystis* sp. foi realizado em 1911 por Alexeieff¹⁵, ao observar células em amostras fecais de aves, ratos, répteis e sanguessugas. Na época foi classificado como uma levedura da espécie *Blastocystis enterocola*. O termo *Blastocystis* foi criado por Alexeieff, uma vez que as formas observadas eram semelhantes à cápsula de um fungo do gênero *Blastomyces*, e apresentavam uma forma cística (Grego *kystis* = cisto)¹⁶.

Em 1912, Brumpt¹⁷ observou isolado de materiais fecais humanos (Figura 1) e o reclassificou como uma espécie de levedura distinta denominada *Blastocystis hominis*, por ser derivado de isolados humanos.

Figura 1 - Formas visualizadas em isolados fecais humanos por Brumpt, 1912. Adaptado de: Miné¹⁸.

Com o passar dos anos e a escassez de informações, ocorreram diversas classificações incorretas desse organismo. As formas deste organismo eram, e ainda são, confundidas com células independentes do organismo humano ou animal, sendo classificada como agente causador de doenças hepáticas em humanos e da doença da cabeça negra que acomete perus, ou ainda como forma cística de flagelados, *Trichomonas intestinalis* e *Chilomastix mesnili*^{10,19}.

Por um longo tempo houve contradições quanto a sua classificação, em 1967 foram descritas características baseadas em aspectos morfológicos e fisiológicos semelhantes à de protozoários, levantando dúvidas quanto a sua classificação como levedura, e o reclassificando como protozoário membro do sub-reino Protozoa²⁰. Em 1973, houve novos estudos experimentais para ampliar os conhecimentos morfológicos sobre este organismo^{21,22}. Em 1976, pesquisadores relataram pela primeira vez o seu possível potencial patogênico²³. A partir desta descrição, estudos experimentais foram desenvolvidos para entender a blastocistose, possível infecção

causada por *Blastocystis*, e sua relação com manifestações gastrointestinais como a Síndrome do Intestino Irritável^{24,25,26}.

Mesmo diante de todas as incertezas com relação à sua classificação e patogenicidade, estes relatos proporcionaram a inclusão de *Blastocystis* sp. como sendo um possível agente etiológico de doenças intestinais, sendo incluído em levantamentos de parasitas intestinais realizados por instituições e campanhas militares¹⁰.

Com o avanço proporcionado pela biologia molecular, novos estudos foram realizados com o intuito de esclarecer dúvidas na sua classificação. Estudos baseados na análise filogenética de sequências parciais da região ribossomal (SSU rDNA) de *Blastocystis* sp. demonstraram que este organismo não é monofilético como leveduras (*Sacchromyces*), esporozoários (*Sarcocystis* e *Toxoplasma*) ou fungos. Com isso foi classificado como membro do filo Stramenopiles (Figura 2), composto por protistas unicelulares e pluricelulares, sendo o único membro deste grupo que possivelmente cause doença em humanos^{27,28,29}. Atualmente, *Blastocystis* sp. tem sido classificado como um protozoário, membro do domínio Eukaryota, filo Stramenopiles, classe Blastocystae, ordem Blastocystida, família Blastocystidae e gênero *Blastocystis*²⁸.

Figura 2 – Classificação de *Blastocystis* sp. como protozoário membro do filo Stramenopiles. Adaptado de: Silberman et al.²⁷.

2.2 Morfologia

Blastocystis é considerado um organismo polimórfico, sendo reconhecidas as formas cística, vacuolar, ameboide e granular (Figura 3), e com menor frequência as formas multivacuolar e avacuolar (Figura 4). O papel funcional de cada forma morfológica ainda permanece incerto^{5,30}. A célula de *Blastocystis* é envolvida por um

revestimento externo denominado de camada fibrilar ou cápsula com aproximadamente 1µm. Sua função ainda não é clara, mas estudos observaram a aderência de bactérias intestinais, indicando possivelmente um efeito de aprisionamento para a nutrição deste organismo, aderência na camada epitelial no intestino do hospedeiro e/ou proteção contra reações adversas do meio ambiente externo e do hospedeiro^{16,31,32,33}.

É sugerido que a forma cística esteja envolvida na transmissão da infecção, sendo eliminada de forma intermitente^{34,35}. A forma cística é caracterizada pelo aspecto ovoide a arredondado, com presença de um a quatro núcleos, medidas de 2,1 a 5,5 µm e uma camada fibrilar externa.

A forma vacuolar é a mais visualizada nos exames e estudos laboratoriais, predominante tanto nas culturas *in vitro* como nos materiais fecais de humanos e animais, considerada a forma típica para o diagnóstico de *Blastocystis* sp.⁴. Esta forma apresenta um formato arredondado, com medidas que variam de 10,9 a 32,1 µm, composta por um corpo central, denominado de vacúolo, que ocupa cerca de 90% da célula. Possui uma camada fina de citoplasma periférico, onde são encontradas estruturas, como núcleos periféricos, mitocôndrias e complexo de Golgi^{32,36}.

A forma granular é arredondada, com tamanhos que variam de 10 a 60 µm, composta por um ou mais núcleos. Possui um vacúolo central, muito semelhante à forma vacuolar, sendo composto por vários grânulos (estruturas que podem se constituírem de pequenas vesículas, grânulos cristalinos e gotículas lipídicas³².

A forma ameboide é restrita, visualizada principalmente em estudos laboratoriais com culturas *in vitro*. Possui prolongamentos irregulares que se assemelha a pseudópodes, com tamanho variando de 2,6 a 50 µm³². Foi observada a presença

de bactérias e restos bacterianos nestas formas, levantando a hipótese de que essa forma possa desempenhar papel na nutrição⁴. A presença desta forma em amostras humanas vem sendo relacionada a sintomas, podendo se tratar da forma patogênica, principalmente pelo seu encontro em amostras de pacientes sintomáticos^{34,37,38}.

As formas multivacuolar e avacuolar são menores (5 a 8 μm) quando comparadas com as formas vacuolares e granulares. Essas formas são mais frequentes em culturas *in vitro*, podendo estar relacionadas com estágios intermediários de desenvolvimento da forma cística⁴.

Figura 3 - Lâminas feitas a partir de culturas axênicas *in vitro* de *Blastocystis* sp. A) formas vacuolares (setas menores) e císticas (setas maiores); B) formas granulares (setas menores); C) forma ameboide (seta maior). Adaptado de: Tan⁴.

Figura 4 - Lâminas feitas por esfregaços de amostras fecais de aves corados com coloração *Giemsa*. A) forma multivacuolar; B) forma avacuolar. Adaptado de: Cruz³⁶.

2.3 Ciclo biológico

Através de estudos experimentais feitos em ratos, foram descritos dois tipos de cisto: o de parede fina, possivelmente responsável pela autoinfecção e o de parede espessa, responsável pela infecção a partir do meio ambiente^{4,39}. Diversas formas de reprodução foram citadas para *Blastocystis* sp., porém as mais aceitas são: a divisão binária e a esquizogonia^{4,32,39}. A transmissão da blastocistose permanece incerta, mas estudos relatam que possivelmente ocorra via fecal-oral pela ingestão de formas císticas^{4,35,40}.

O ciclo de vida proposto para este organismo é iniciado com a ingestão de alimentos e água contaminados com a forma cística (Figura 5). Este por sua vez, perde a camada fibrilar e se rompe no trato digestivo, eliminando as formas vacuolares. Estas formas vacuolares podem dar origem a novas formas vacuolares, ameboides ou multivacuolares por mitose. A forma multivacuolar se desenvolve em um pré cisto que através da esquizogonia, dando origem a um cisto de parede fina,

que se rompe no trato intestinal, dando início ao ciclo de autoinfecção no hospedeiro. Quanto a origem da forma ameboide, esta se desenvolve em um pré cisto que, por esquizogonia, origina um cisto de parede espessa, que será eliminado nas fezes⁴.

Figura 5 - Ciclo biológico proposto para *Blastocystis* sp. Adaptado de: www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Blastocystis.htm

2.4 Estudos experimentais

Diversos animais foram utilizados como modelo experimental para o entendimento da patogenicidade dos diferentes STs de *Blastocystis* sp., porém estes modelos se mostram duvidosos, uma vez que não são hospedeiros naturais dos STs que acometem o homem³⁴. Pavanelli et al.⁴⁰ observaram a histopatogenicidade de *Blastocystis* sp. em relação a diferentes quantidades de inóculos em modelo experimental. Nesse estudo foi demonstrado que a patogenicidade nos animais está relacionada ao tamanho do inóculo e ao período de infecção. Além disso foi relatado um grande número de formas vacuolares nos tecidos com intensa hiperplasia linfocítica.

2.5 Diagnóstico parasitológico

Convencionalmente, *Blastocystis* sp. é detectado através da identificação microscópica de suas formas em amostras de fezes. Os métodos utilizados como padrão para o diagnóstico são empregados na rotina laboratorial, tais como exame direto, sedimentação espontânea, técnica de concentração em formol-éter (FECT), esfregaço corados por Giemsa e Lugol^{4,30,41,42,43}. Em alguns destes métodos há adição de água ou fases de mistura e centrifugação, podendo destruir as formas deste organismo, reduzindo a sensibilidade e produzindo resultados falso negativos no diagnóstico parasitológico⁴⁴.

Os métodos considerados específicos para o diagnóstico de *Blastocystis* sp. são os métodos de cultura axênica *in vitro* (XIVC) e os esfregaços permanentes corados com hematoxilina férrica ou tricrômio^{4,30,42,44,45,46}. Estes possuem maior sensibilidade quando comparados a outros métodos parasitológicos, porém demandam mais

tempo para o diagnóstico^{30,47}. Na falta de um modelo animal adequado para o entendimento da possível infecção por *Blastocystis* sp., as culturas *in vitro* podem representar uma alternativa¹⁶. É importante ressaltar que as técnicas de coloração permanente e as culturas *in vitro*, não são, na maioria das vezes, realizadas nos laboratórios de rotina⁵.

2.6 Diagnóstico sorológico

Existe um número restrito de trabalhos ressaltando o diagnóstico sorológico da blastocistose. Técnicas sorológicas têm sido utilizadas para identificar anticorpos específicos em pacientes com *B. hominis*, porém com pouco sucesso devido à falta de resposta imune⁴⁸. Kaneda et al.⁴⁹, avaliando amostras de soros de pacientes assintomáticos com parasitológico positivo para *Blastocystis*, detectaram 70% de positividade para esse organismo, utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). O teste imunoenzimático (ELISA) foi relatado por Garavelli et al.⁵⁰ para a detecção de anticorpos anti-IgG *B. hominis* em pacientes infectados. Recentemente, Gamra et al.⁵¹ verificaram o potencial de bandas específicas utilizando a técnica de Western-blotting (WB) como marcadores de patogenicidade para *Blastocystis* sp. No entanto, o diagnóstico sorológico efetivo não foi estabelecido até o presente.

2.7 Diagnóstico molecular

Os métodos baseados na pesquisa de DNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR), e suas variações, como a Análise do Polimorfismo e dos Fragmentos de Restrição (RFLP), a PCR em tempo real (qPCR), vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos para o aprimoramento no diagnóstico. Regiões do DNA ribossomal (rDNA) são utilizadas na identificação das relações filogenéticas entre as espécies, e por apresentarem grande quantidade de cópias garantem alta sensibilidade no diagnóstico¹. A amplificação de rDNA específico do parasito a partir de DNA genômico extraído de amostras fecais, tem contribuído para o diagnóstico clínico e para a detecção de subespécies dentro de uma determinada espécie, sobretudo em situações onde a diferenciação morfológica não é possível, como no caso de *Blastocystis* sp.¹.

Stensvold et al.⁵², propuseram um estudo de diagnóstico molecular para *Blastocystis* sp. utilizando a técnica da PCR e DNA obtido de amostras fecais humanas. Com isso, estas técnicas moleculares utilizando amostras fecais estão sendo utilizadas como ferramenta alternativa para o diagnóstico de *Blastocystis* sp.^{47,53,54,55,56,57}. Os métodos moleculares têm sido utilizados principalmente para identificar a variação genética entre os subtipos (STs) de *Blastocystis* sp.^{2,47,54,58}. A partir da análise das subunidades do DNA ribossomal (SSU-rDNA) iniciadores específicos para cada STs foram desenvolvidos para facilitar o diagnóstico de *Blastocystis* sp.^{59,60,61}. Além disso, os métodos moleculares têm sido utilizados para determinar a prevalência dos diferentes STs e os possíveis fatores associados à patogenicidade^{2,58}.

Diante do crescente número de estudos moleculares realizados nos últimos anos, e para evitar confusões na nomenclatura dos diferentes STs de *Blastocystis*, um projeto de colaborações internacionais foi criado para determinar a terminologia

consenso⁴². Ainda não há uma concordância na escolha entre a utilização de sequência completas ou parciais para análise específica da filogenia dos isolados de *Blastocystis* sp.⁶². Mesmo assim, a maioria dos estudos voltados para a análise da diversidade genética de *Blastocystis* sp. utilizam a região denominada *barcode* descrita por Scicluna et al.⁶³. Esta região está localizada entre um iniciador de ampla especificidade eucariótica (RD5) e uma sequência específica encontrada nos STs de *Blastocystis* sp. (BhRDr) (Figura 6).

Figura 6 – Sequência parcial heterogenea encontrada nos STs isolados de *Blastocystis* sp. a partir de análise das subunidades ribossomais (SSU-rDNA) realizada por Arisue et al.⁶⁴.

2.8 Diversidade genética e aspectos clínicos

Atualmente sabe-se que o gênero *Blastocystis* é composto por 17 subtipos (ST1-ST17) que podem infectar muitos animais além do homem (Tabela 1), sugerindo um possível caráter zoonótico deste organismo⁶⁵.

Tabela 1 – Distribuição de STs de *Blastocystis* sp. de acordo com o hospedeiro e origem. Adaptado de Yoshikawa et al.⁶².

ST	Hospedeiro	País
1	Humano/ Galinha	USA e Colômbia/ Japão
2	Humano/ Macaco	Japão e Colômbia/ Filipinas
3	Humano / Macaco/ Gado	Tailândia/ Reino Unido/ Japão
4	Humano / Rato / Porquinho da Índia	Alemanha/ Singapura/ USA
5	Humano / Porco/ Gado	China/ Japão/ Japão
6	Humano/ Galinha	Japão/ Filipinas
7	Humano/ Codorna	Singapura e Japão/ Japão
8	Humano/ Gambá/ Faisão	Japão/ Colômbia/ Japão
9	Humano	Japão/Dinamarca
10	Camelo	Líbia
11	Elefante	Austrália/Bélgica
12	Girafa	Austrália
13	Cervo/ Marsupial	Reino Unido/ Austrália
14	Gado/ Carneiro	Líbia/ República Checa
15	Macaco/ Camelo	Líbia/ Líbia
16	Canguru	Japão
17	Roedores	Líbia

O número dos STs encontrados em animais continua em constante expansão (ST1-ST17), enquanto que o número em humanos se mantém estável (ST1-ST9)^{1,2,66,67,68,69}. No entanto, mais de 90% dos casos isolados em humanos ao redor do mundo pertencem a quatro subtipos (ST1, ST2, ST3 e ST4)^{2,6}. Enquanto que, os outros subtipos (ST5-ST8) são raramente encontrados em humanos, sendo isolados com maior frequência em aves e primatas não humanos^{2,4}. Apenas um dos subtipos humanos não foi encontrado em outro hospedeiro, o ST9, atualmente sendo restrito apenas aos humanos⁷⁰.

Os STs de *Blastocystis* sp. apresentam uma grande variabilidade com relação a diversidade genética, porém ainda não se sabe ao certo se essa variabilidade pode influenciar fatores funcionais no hospedeiro, como por exemplo, a resistência ao tratamento⁴⁷. É provável que sejamos expostos aos diferentes STs de *Blastocystis* sp. ao longo da vida, mas é necessário compreender quais são os fatores determinantes para que em certo momento haja a colonização de determinado subtipo. É levantada a hipótese de que a associação de uma flora intestinal específica ou que determinados STs possam estar associados a manifestações clínicas^{4,71}.

2.9 Infecção por *Blastocystis* sp.

Vários relatos de casos e associações com manifestações gastrointestinais têm sido publicados, porém a blastocistose não possui sinais clínicos específicos, que facilitem o diagnóstico clínico numa primeira avaliação, havendo ainda lacunas na relação parasito-hospedeiro envolvidas na infecção por *Blastocystis* sp.^{34,72,73,74,75}. Estudo recente sobre a microbiota humana apresentou dados importantes, nos quais 82% das amostras fecais de indivíduos aparentemente saudáveis foram positivos

para *Blastocystis* sp. Assim, os autores propuseram que este organismo possa ser um componente estável no trato intestinal. Determinadas condições ambientais e do hospedeiro poderiam favorecer uma evolução com manifestações clínicas gastrointestinais ou extra intestinais^{4,34}. Por lado, estudos apontam que este potencial patogênico pode estar relacionado com o número de formas presentes, os diferentes subtipos e o estado imunológico do hospedeiro^{4,66,67}.

As manifestações clínicas atribuídas à infecção por *Blastocystis* sp. são diarreia, náusea, vômito, dor abdominal, flatulência, entre outros, todas comuns a infecções parasitárias. Diversos relatos de casos apontam *Blastocystis* sp. como responsável por manifestações clínicas gastrointestinais e extra intestinais, como a síndrome do intestino irritável e a urticária crônica^{37,56,72,73,75,76,77,78,79,80}. Nestes estudos, autores descrevem casos com ST2 e ST3 de *Blastocystis* como sendo responsáveis pela maioria dos casos de urticaria associada a sintomas gastrointestinais, e dos ST4 e ST7 relacionados com casos de pacientes com a síndrome do intestino irritável^{76,79,81}. Alguns destes casos relatam a melhoria das manifestações gastrointestinais e alérgicas após administração de metronidazol, atualmente sendo o fármaco de escolha para o tratamento da infecção por *Blastocystis* sp.^{72,73,82}.

3 JUSTIFICATIVA

Baseado nas observações dos resultados dos exames parasitológicos no complexo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP) pode-se verificar a grande ocorrência de amostras positivas para *Blastocystis* sp. E diante da escassez de estudos relacionados com os subtipos desse protozoário, optou-se por avaliar amostras positivas para este organismo.

O estudo proposto pode contribuir com resultados importantes quanto a distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. no Brasil. Além disso, as análises moleculares propostas podem agregar conhecimentos moleculares que permanecem pouco conhecidos na América Latina.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar os subtipos de *Blastocystis* sp. presentes nas amostras fecais de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP).

4.2 Objetivos específicos

- a) Validar a cPCR para diagnóstico de *Blastocystis* sp. no laboratório utilizando as amostras fecais dos pacientes do HC/FMUSP;
- b) Realizar a caracterização molecular dos subtipos presentes nas amostras fecais dos pacientes do HC/FMUSP.

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC/FMUSP e, posteriormente, ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo aprovado sob o protocolo de pesquisa nº 488.701 (Apêndice A). De acordo com as normas que regem as pesquisas que envolvam seres humanos, foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice B) que obedece às recomendações da Resolução número 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde. Após os resultados parasitológicos da Seção de Parasitologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC/FMUSP) foi realizado o contato telefônico e agendamento com a nossa equipe para esclarecimento do projeto e assinatura do TCLE.

5.2 Normas de Biossegurança

Os procedimentos de coleta, manipulação de materiais biológicos e reagentes, além da utilização de equipamentos no laboratório, estiveram em conformidade com as normas de biossegurança descritas por Mineo et al.⁸³.

5.3 Fluxograma de trabalho

5.4 População de estudo

A população de estudo foi constituída de 60 amostras de fezes positivas para *Blastocystis* sp. baseando-se nos resultados de exames parasitológicos realizados na Seção de Parasitologia do Laboratório Central do HC/FMUSP, de indivíduos que tinham acompanhamento ambulatorial no HC/FMUSP. O critério de inclusão constituiu-se do exame parasitológico positivo para *Blastocystis* sp. em pelo menos um método parasitológico e o de exclusão, exame parasitológico negativo para *Blastocystis* sp. Os métodos utilizados na rotina laboratorial na Seção de Parasitologia do Laboratório Central do HC/FMUSP são: Método de Lutz⁸⁴, Método de Faust⁸⁵, Método de Coloração Permanente por Tricrômio⁸⁶ e Leishman⁸⁷.

Com intuito de validar o diagnóstico molecular para a detecção de *Blastocystis* sp. em nosso Laboratório, foi realizada uma avaliação inicial em 15 amostras fecais de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para *Blastocystis* sp. e sem

outras parasitoses concomitantes (*grupo I*), 15 amostras fecais de pacientes com diagnóstico parasitológico negativo para *Blastocystis* sp. e sem outras parasitoses concomitantes (*grupo II*) e 15 amostras fecais de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para enteroparasitoses (*grupo III*) composto por *Ascaris lumbricoides* (n=1), *Entamoeba histolytica* (n=1), *Giardia lamblia* (n=3), *Endolimax nana* (n=3), *Escherichia coli* (n=3), *Strongyloides stercoralis* (n=2), *Enterobius vermiculares* (n=1), *Schistosoma mansoni* (n=1).

As amostras fecais foram obtidas na Seção de Parasitologia do Laboratório Central do HC/FMUSP. Após o diagnóstico parasitológico realizado no Seção de Parasitologia, parte da amostra foi conduzida ao Laboratório de Investigação Médica (LIM06) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, onde foram devidamente identificadas e divididas em alíquotas para armazenamento a -20°C, e posterior realização das técnicas moleculares.

5.5 Processamento das amostras

No Laboratório de Investigação Médica (LIM/06), aproximadamente 400 mg das amostras fecais foram lavadas por duas vezes em tampão fosfato-salino PBS 0,01 M pH 7,2 (1,0 mL). Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado, centrifugado por um minuto a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O sedimento resultante desta lavagem foi utilizado para a extração de DNA.

5.6 Extração do DNA

Para extração do material genético das amostras de fezes foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN® Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. No sedimento resultante da lavagem foi adicionado tampão ASL (1,4 mL). Esta mistura foi homogeneizada por um minuto e incubada à 70°C em banho maria a seco por cinco minutos, em seguida homogeneizada por quinze segundos e centrifugada por um minuto a 14.000 rpm. Foi adicionado o sobrenadante (1,2 mL) em um novo micro tubo contendo um tablete de Inhibitex®, em seguida a amostra foi homogeneizada por um minuto, incubada em temperatura ambiente por um minuto e centrifugada por três minutos a 14.000 rpm. Em um novo tubo contendo 15 µL da enzima Proteinase K, foi adicionado 200 µL do sobrenadante e homogeneizado por quinze segundos. Foi adicionado tampão AL (200 µL) e homogeneizado novamente por quinze segundos. Esta mistura foi incubada por dez minutos a 70 °C, após este período foi adicionado etanol absoluto gelado (200 µL) e homogeneizada rapidamente. Todo conteúdo foi transferido para uma coluna acoplada em um tubo coletor, sendo centrifugada por um minuto a 14.000 rpm. O tubo coletor contendo filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo, seguida pela adição de tampão AW1 (500 µL) e centrifugação por um minuto a 14.000 rpm. Em seguida, a coluna foi transferida novamente para um novo tubo, seguida pela adição de tampão AW2 (500 µL) e centrifugação por três minutos a 14.000 rpm. O tubo coletor contendo filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo de 1,5 mL, foi adicionado tampão AE (100 µL) na coluna e incubada por um minuto em temperatura ambiente (TA). Após incubação, o micro tubo foi centrifugado por um minuto a 14.000 rpm e a coluna descartada. O DNA extraído foi quantificado, dividido em alíquotas e armazenado a -20°C até o momento do uso.

5.7 Quantificação de DNA nas amostras

A concentração de DNA das amostras foi estimada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop ND-1000 UV-VIS spectrophotometer v.3.2.1 (NanoDrop Technologies Scientific, Wilmington, Delaware USA). A estimativa de pureza foi dada pela relação da absorbância do DNA/proteína⁸⁸.

5.8 Controle Positivo

Como controle positivo foi realizada a cultura de *Blastocystis* sp., segundo o protocolo proposto por Zerpa⁸⁹. Em síntese, aproximadamente cerca de 500mg de amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp. foram inoculados em meio de cultura (4,0 g extrato de levedura, 10 µL amido de arroz diluído e 5% soro inativado). As culturas foram mantidas a 37 °C em estufa em condições de anaerobiose, e examinadas após 24 h e 48 h em microscopia óptica (Olympus CX 41, Japão) em aumento de 10X e 40X. Após confirmação do diagnóstico, as culturas foram centrifugadas por um minuto a 8.000rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi armazenado a -20 °C até o momento de uso. Para extração do DNA do controle positivo foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN® Hilden, Alemanha), com descrito no item 5.4.1.

5.9 Iniciadores (*primers* específico e universal)

Como amplamente mencionado na literatura para determinar os diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. foi amplificado um fragmento de aproximadamente

600bp, localizados na região 18S do SSU-rDNA, descrito por Scicluna et al.⁶³.

Para controle interno da extração do DNA, foram utilizados *primers* universais com fragmento de aproximadamente 140 bp, localizado na região SSU-rDNA de eucariotos, como descrito por Wang et al.⁹⁰. (Tabela 2). Foi realizado um gradiente de temperatura para determinar a ideal de anelamento dos iniciadores utilizados neste estudo.

Tabela 2 - Iniciadores para reação da PCR para detecção DNA nas amostras fecais.

Iniciadores		Sequências	Pares de bases (bp)	Ref.
Universal	18SEUDIR	F: 5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGG-3'	~140bp	Wang et al. ⁹⁰
	18SEUINV	R: 5'-TAATTTGCGCGCCTGCTG-3'		
Específico	RD5	F: 5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT -3'	~600bp	Scicluna et al. ⁶³
	BhRdr	R: 5'-GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3'		

5.10 Reação em Cadeia da Polimerase (cPCR)

A cPCR foi realizada em volume final de 10 µL, sendo 6 µL de mix (1,5 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA, 20 mg/mL); 0,3 µL de água de injeção; 2,0 µL de tampão 5X PCR; 0,4 µL de dNTPs; 0,8 µL de MgCl₂; 0,4 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (20 pmol/µL) e 0,2 µL de *GoTaq® DNA Polimerase* (5 U/µL, Promega Corporation, Madison, USA); 4 µL de DNA. Os ciclos de amplificação para os *primers* específico e universal foram de 94°C por dois minutos para desnaturação inicial, seguido por trinta ciclos de 94 °C por um minuto (desnaturação), 61,8 °C por um minuto (anelamento) e 72 °C por um minuto (extensão), e extensão final de 72 °C por

dois minutos. A reação foi realizada no equipamento Master cycler ep gradient S thermocycler (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha).

Um controle positivo (DNA de cultura de *Blastocystis* sp.) e um controle negativo (mix da reação de PCR e água destilada) foram incluídos em cada reação.

5.11 Eletroforese

A identificação dos produtos amplificados na cPCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose com a adição de corante *SYBR safe* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA). Foram misturados 5 µL do produto amplificado pela cPCR com 1 µL do tampão 10X *Bluejuice™ Gel Loading Buffer* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA), a mistura foi aplicada em um gel de agarose 2% preparado com tampão TBE 1X e 7 µL de corante *SYBR safe* para cada 100 mL de gel. Foram acrescentados aos géis um marcador de 100 pares de bases (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA) para avaliação do tamanho do fragmento obtido e o padrão de massa *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA), um controle positivo (DNA proveniente de cultura de *Blastocystis* sp.) e um controle negativo (produto de PCR com água destilada). A eletroforese ocorreu sob tensão elétrica de 80 volts e corrente elétrica de 400mA por oitenta minutos.

Após o término da eletroforese, os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, USA) e fotografados para posterior análise.

5.11.1 Organograma de análise das amostras

As amostras com amplificação positiva seguiram diretamente para o sequenciamento (Organograma 1), e as amostras que não tiveram amplificação foram submetidas a nova extração de DNA (organograma 2).

Organograma 1: amostras com amplificação positiva

Organograma 2: amostra com amplificação negativa

*Amostra negativa PCR universal, nova extração de DNA utilizando outra alíquota da amostra fecal.

5.12 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com base na metodologia de Sanger et al.⁹¹ utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA). As duas fitas de DNA dos produtos de PCR foram sequenciadas para garantir uma melhor qualidade na caracterização dos nucleotídeos.

A concentração de DNA utilizada nas reações de sequenciamento foi determinada de acordo com o tamanho do produto de PCR e seguindo as orientações do kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA).

Os produtos gerados no ciclo da cPCR foram inicialmente purificados utilizando a enzima EXOSAP (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) conforme instruções do fabricante. Após a purificação, foram submetidos a reação de sequenciamento para incorporação dos dNTPs marcados. A reação foi realizada em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA).

Para reação de sequenciamento foram utilizados 4 µL do reagente *Ready Reaction Premix* (kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA); 2 µL do tampão 5X (20 Tris 1 M pH 9,0 + 50 mM de MgCl₂); 2 µL de cada *primer* (1,6 pmol/µL); 2 µL do produto purificado e 10 µL de água Mili-Q com volume final de reação de 20 µL. As condições da PCR de sequenciamento foram: 40 ciclos de 95 °C por dois minutos; 96 °C por trinta segundos; 52 °C por trinta segundos seguido de 60 °C por quatro minutos para extensão final. O produto final foi precipitado adicionando 65 µL de solução (EDTA 125 Mm e etanol absoluto), seguido por incubação em temperatura ambiente por quinze minutos.

Após o período de incubação, o microtubo foi centrifugado por trinta minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, ao *pellet* restante foi adicionado 60 µL de etanol 70% seguido por centrifugação a 14.000 rpm por quinze minutos. Foi adicionado ao *pellet* 10 µL de formamida e incubado a 95 °C. O produto foi resfriado

em banho de gelo e submetido ao sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA).

5.13 Subtipagem

As sequências geradas foram avaliadas quanto a sua qualidade pelo programa Eletropherogram quality analysis (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências obtidas foram analisadas posteriormente pelo programa BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>), e para determinar o subtipo de cada amostra, as sequências obtidas foram alinhadas com sequências de *Blastocystis* sp. presentes no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/tbl2asn2>), utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para análise filogenética foram utilizados múltiplos alinhamentos pelo software ClustalW no programa MEGA 5. Estas sequências de nucleotídeos geradas foram submetidas ao banco de sequências de *Blastocystis* sp. *Multilocus Sequence Typing* (<http://pubmlst.org/blastocystis/>).

Para definir as relações filogenéticas entre as sequências obtidas foi construída uma árvore filogenética pelo método de Neighbor-Joining (NJ), utilizando um *bootstrap* com 1000 réplicas. Como grupo externo (*outgroup*) foi utilizada a sequência de *Proteromonas lacertae* (U37108).

5.14 Análise dos dados

Todos os dados obtidos neste estudo foram registrados no programa Microsoft Office Excel, contendo os resultados positivos e negativos para os métodos parasitológicos e métodos moleculares.

6 RESULTADOS

6.1 Positividade de *Blastocystis* sp. pelas técnicas parasitológicas

Foram examinadas 60 amostras de fezes na Seção de Parasitologia do Laboratório Central (HC/FMUSP) utilizando os métodos de Faust, Lutz e Coloração Permanente por Tricrômio e Leishman. As amostras avaliadas por microscopia de luz foram consideradas como: positivas raras (até duas formas por campo), poucas (três a nove formas por campo), numerosas (mais de dez formas por campo) ou sugestivas (quando não houve confirmação da positividade pelos métodos de coloração permanente) (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de formas de *Blastocystis* sp. visualizadas nas 60 amostras fecais diagnosticadas pelas técnicas parasitológicas.

Número de formas	Frequência	%
SUGESTIVAS	8	13,3
RARAS	16	26,6
POUCAS	29	48,3
NUMEROSAS	7	11,6
Total	60	100,0

O método que demonstrou maior eficácia para o diagnóstico parasitológico de *Blastocystis* sp. foram as colorações permanentes (Tricrômio e Leishman), seguido pelo método de Lutz e de Faust (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Positividade de *Blastocystis* sp. pelas técnicas parasitológicas nas 60 amostras fecais dos indivíduos acompanhados no HC/FMUSP de 2014 a 2015.

6.2 Análise dos iniciadores

Para análise da efetividade dos iniciadores foram utilizadas amostras controles positivas, provenientes de culturas de *Blastocystis* sp. e de pacientes negativos (Figura 7).

Figura 7 - Amplificação de DNA, utilizando o iniciador específico (~600bp), a partir de amostra proveniente da cultura de *Blastocystis* sp. (CP, controle positivo), amostra proveniente de paciente negativo (CN, controle negativo), PM (padrão de peso molecular 100bp - Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Para determinar a temperatura ideal de anelamento dos iniciadores utilizados para o diagnóstico molecular de *Blastocystis* sp. foi realizado um gradiente de temperatura com *primer* específico (Figura 8) e *primer* universal (Figura 9). A temperatura de anelamento ideal foi de 61,8°C para ambos os *primers*.

Figura 8 - Amplificação de DNA, proveniente de amostra de culturas de *Blastocystis* sp. utilizando o iniciador específico (~600bp) para determinar a temperatura ideal de anelamento. PM (padrão de peso molecular 100bp - Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Figura 9 - Amplificação de DNA, proveniente de amostra fecal positiva para *Blastocystis* sp., utilizando o iniciador universal (~140bp) para determinar a temperatura de anelamento. PM (padrão de peso molecular 100bp - Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

6.3 Sensibilidade e especificidade da cPCR para a detecção de *Blastocystis* sp.

Quanto à sensibilidade, diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20 ng/μL) de DNA foram testadas para a validação da técnica de cPCR, utilizando amostra de culturas positivas e amostra fecal de paciente positiva para *Blastocystis* sp. (Figura 10 e 11, respectivamente).

Figura 10 - Amplificação de DNA, proveniente de culturas de *Blastocystis* sp., utilizando o iniciador específico (~600bp) para teste da sensibilidade da cPCR em diferentes concentrações de DNA (5, 10, 15 e 20ng/μL). PM (padrão de peso molecular 100bp - Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Figura 11 - Amplificação de DNA, proveniente de amostra fecal de paciente positiva para *Blastocystis* sp., utilizando o iniciador específico (~600bp) para teste da sensibilidade da cPCR em diferentes concentrações de DNA (5, 10, 15 e 20 ng/μL). PM (padrão de peso molecular 100bp - Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Para avaliar a especificidade foram utilizadas amostras fecais negativas (*grupo II*) e com diagnóstico positivo para outros organismos (*grupo III*). Com relação à especificidade, não foi observada amplificação de DNA do fragmento alvo em ambos os grupos (Figura 12).

Figura 12 - Amplificação de DNA, proveniente de amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp. (1-3), amostras fecais negativas (4-6) e amostras com enteroparasitoses (7-9), utilizando o iniciador específico (619bp). CP (controle positivo – cultura de *Blastocystis* sp.), CN (controle negativo – mix da reação de PCR e água destilada) e PM (padrão de peso molecular 100bp - Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

6.4 Positividade de *Blastocystis* sp. pelas técnicas moleculares

Entre as 60 amostras de fezes positivas para *Blastocystis* sp. pelos métodos parasitológicos, somente 47 (78,3%) foram confirmadas pela cPCR (Figura 13).

Figura 13 - Amplificação de DNA, proveniente de algumas amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp., utilizando o iniciador específico (~600bp) para teste da positividade da cPCR. CP (controle positivo – cultura de *Blastocystis* sp.) e PM (padrão de peso molecular 100bp, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

6.5 Sequenciamento

Todas as amostras positivas pela cPCR foram submetidas ao sequenciamento. No entanto, apenas 40 amostras apresentaram sequências de boa qualidade e foram incluídas na análise filogenética. Estas sequências obtidas apresentaram 98-100% de similaridade com sequências de *Blastocystis* sp. depositadas no *GenBank*.

Foram identificados quatro subtipos: ST1 em 9 amostras (22,5%), ST2 em 5 amostras (12,5%), ST3 em 24 amostras (60,0%) e ST6 em 2 amostras (5,0%) (Figura 14).

Figura 14 – Análise filogenética de *Blastocystis* sp. com as sequências geradas neste estudo (identificada pelo triângulo de cor cinza) e sequências de referência do *GenBank* (identificada pelo número de ascensão e de origem). A árvore filogenética foi construída utilizando o método de *Neighbor-Joining* (NJ). Valores de *bootstrap* foram baseados em 1000 réplicas.

6.6 Identificação dos alelos nos STs de *Blastocystis* sp.

Com base nas informações disponíveis no www.pubmlst.org/blastocystis, foi realizada a identificação dos alelos encontrados na região 18S dos STs de *Blastocystis* sp. O ST3 apresentou o maior número de alelos identificados, seguido pelos ST2, ST1 e ST6 (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição dos alelos identificados nos STs de *Blastocystis* sp.

Subtipo	Alelos	Número de identificação*
ST1	4 (9/9)	2,15,16,24,36,37,44,46,47
ST2	12 (4/5)	7, 8, 40, 41
	71 (1/5)	48
ST3	34 (11/24)	5,6,10,11,12,17,23,26,33,42,45
	36 (11/24)	1,9,13,14,18,19,20,21,22,25,38
	37 (2/24)	39,43
ST6	134 (2/2)	3,4

*corresponde ao número das amostras identificadas na Análise Filogenética (Figura 14).

No ST3 foram identificados três alelos distintos, correspondendo aos números 34 (46%), 36 (46%) e 37 (8%). No ST2 foram identificados dois alelos distintos, 12 (80%) e 71 (20%). Em contraste, apenas um alelo foi encontrado em ST1 e ST6, correspondendo aos alelos 4 (100%) e 134 (100%), respectivamente.

7 DISCUSSÃO

Blastocystis é um gênero composto por protistas que habitam o sistema gastrointestinal de humanos e animais, sendo um dos organismos mais comuns encontrado em amostras fecais humanas, perdendo apenas para as leveduras^{4,92}. Atualmente vem sendo considerado um parasito emergente, isolado em pacientes sintomáticos e assintomáticos, com uma distribuição mundial que cresce com o passar dos anos^{4,68,70}. As características clínicas associadas com a infecção por *Blastocystis* sp., podem variar de desordens gastrointestinais não específicas a manifestações cutâneas^{2,34,58,70,93}.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para detectar *Blastocystis* sp. em amostras clínicas. O exame microscópico é o método de escolha para o diagnóstico deste organismo, porém apresenta baixa sensibilidade e especificidade, podendo levar a um diagnóstico equivocado ou subestimação da verdadeira prevalência do parasito^{2,34}. Associado a isso, este parasita apresenta variáveis com relação a sua forma e tamanho, dificultando ainda mais a sua identificação.

Nos últimos anos, o diagnóstico de parasitas intestinais através das técnicas moleculares começou a ganhar espaço nos laboratórios clínicos. Mesmo diante de obstáculos teóricos e práticos, estes são superados pelas vantagens dos diagnósticos baseados na identificação de DNA, vantagens estas que incluem maior sensibilidade, reprodutibilidade e processos semi ou totalmente automatizados, levando a maior custo-efetividade para o diagnóstico laboratorial^{1,47}.

Assim, a técnica de PCR é um método alternativo para detecção de *Blastocystis* sp. em estudos epidemiológicos, conferindo alta sensibilidade e especificidade, bem

como a rapidez no diagnóstico⁵⁵. Além disso, podem auxiliar na identificação de fatores relacionados ao seu possível potencial patogênico, determinar os subtipos mais frequentes ou descobrir novos subtipos^{55,67}. Embora a cPCR seja bastante sensível, o presente estudo verificou a presença de DNA do parasito em apenas em 78,4% das 60 amostras de fezes que foram diagnosticadas como positivas para *Blastocystis* sp. pelos métodos parasitológicos. Possíveis explicações para este resultado podem estar relacionadas com a presença de inibidores de amplificação nas amostras de fezes, degradação de DNA devido ao tempo de armazenamento prolongado, conservação da amostra ou erros na identificação pela microscopia^{1,94,95}. Ou ainda fatores relacionados com o tamanho do fragmento amplificado pela PCR, ou seja, produtos de curtos podem ser amplificados com maior facilidade, mesmo a partir de um molde de DNA de baixa qualidade, enquanto que fragmentos longos (~600 pb), podem ser mais difíceis de serem amplificados¹.

Outro fator amplamente discutido é a intensidade da infecção por *Blastocystis* sp. Neste contexto, estudos apontam a necessidade de inclusão de relatórios mais detalhados como a quantidade de formas encontradas em campo de alta potência em esfregaços permanentes para determinar a intensidade de infecção⁴. Assim tem sido relatado como “raras” (um a dois parasitas em cada dez campos de alta potência), “poucas a moderadas” (um parasita em cada um a cinco campos de alta potência), e “abundantes” (cinco ou mais parasitas por campo de alta potência^{93,96}. No presente estudo, em relação a abundância das formas de *Blastocystis* sp. avaliada em aumento de x400, foi observado que a maioria das amostras positivas pelos métodos parasitológicos foram detectadas como poucas a moderadas (48,3%).

É válido ressaltar que as treze amostras nas quais não houve amplificação de DNA específico e com diagnóstico parasitológico positivo para *Blastocystis* sp., cinco foram classificadas como “raras”, quatro como “poucas a moderadas” e quatro como

“sugestivas” pela análise parasitológica. Mattiucci et al.⁹⁴ sugeriram que resultados negativos da cPCR podem ser devidos à pequena quantidade de DNA de *Blastocystis* sp., inferior a capacidade de detecção da técnica.

O sequenciamento foi realizado nas 47 amostras positivas, nas quais apenas 40 amostras apresentaram sequências de boa qualidade. Isso pode ser devido a conservação dos genes, podendo variar de acordo com o ST, ou pode haver loci altamente conservados, enquanto que outros menos conservados, dificultando assim o diagnóstico e a subtipagem do isolado¹. Outro fator que pode influenciar na subtipagem da amostra é a presença de infecções mistas, por mais de um subtipo¹.

As sequências obtidas neste estudo foram comparadas com sequências de *Blastocystis* spp. depositadas no banco de dados, utilizando a terminologia de consenso detalhado por Stensvold et al.⁴² para a identificação dos subtipos. Os presentes resultados foram semelhantes aos encontrados em outros países, onde a maioria das infecções humanas por *Blastocystis* sp. são atribuídas aos isolados do ST3^{6,93,95,97}. Os nossos achados estão também de acordo com as observações recentes feitas por David et al.⁸, ressaltando a maior ocorrência do ST3 em amostras de fezes diarreicas de crianças em duas comunidades no estado de São Paulo. O ST3 exibe uma elevada diversidade genética e tem sido relatado com grande frequência em amostras isoladas de humanos, sendo assim, descrito por diferentes autores como possivelmente único ST de origem humana^{4,93,97}.

O primeiro estudo envolvendo a caracterização molecular dos STs no Brasil foi realizado por Malheiros et al.⁹ em amostras provenientes de tribos indígenas. Este demonstrou resultados diferentes daqueles do presente estudo, com uma maior ocorrência do ST1 (41%) e ST2 (32%) nos isolados humanos. É possível que esta distribuição dos STs apresentada, possa estar relacionada com o contato limitado

destes indivíduos com pessoas de outras regiões, fora da comunidade indígena em que viviam.

Em nosso estudo foram observados os STs 1 e 2 em menor frequência. No entanto esses subtipos são bastante comuns em outros países^{2,93}. O ST1 é o segundo mais comum encontrado em isolados humanos no mundo, relatado como possível subtipo zoonótico, uma vez que foi detectado em indivíduos que mantinham contato frequente com animais de pecuária, além de estar sendo associado também a infecções assintomáticas^{2,4}. O ST2 é outro subtipo comumente encontrado em isolados nas Américas e Ásia, associado a infecções sintomáticas^{2,4,37,79}.

É importante observar a ausência de ST4 no presente trabalho, assim como em outros estudos realizados no Brasil por David et al.⁸ e Malheiros et al.⁹. No entanto, em estudo recente Ramirez et al.⁶ observaram a introdução do ST4 na América do Sul em isolados da Colômbia. Em contraste, o ST4 é quase tão comum como outros STs, em alguns países na Europa e no Reino Unido^{2,94,95}, podendo estar associado com infecções assintomáticas e com a síndrome do intestino irritável².

A alta variabilidade genética e a possibilidade de caráter zoonótico atribuído a este organismo está relacionado com a descrição de certos subtipos, antes observados somente em animais, isolados em amostras humanas^{2,5,55}. Outro achado importante deste estudo é a presença de ST6, raramente detectado em isolados humanos. ST6 é classificado como um subtipo aviário, o que aponta para um possível potencial zoonótico^{2,94}.

Com relação a caracterização dos alelos presentes na região 18S dos STs de *Blastocystis* sp., observamos no presente estudo que o ST3 apresentou maior diversidade de alelos (34, 36 e 37) em comparação aos outros STs identificados. Este achado está de acordo com observações relatadas por David et al.⁸ e Mattiucci

et al.⁹⁴. Em contraste com nossos achados, Ramirez et al.⁶ mostrou uma alta diversidade de alelos de ST1, ST2 e ST3. O intuito de estudar esta diversidade de alelos dentro dos STs de *Blastocystis* sp. está relacionada com a obtenção de maiores conhecimentos sobre a diversificação deste organismo⁶. As comparações de alelos pertencentes ao mesmo ST podem auxiliar a determinar se uma cepa é distinta da outra, se certas cepas são responsáveis por clínicas particulares, ou ainda avaliar a possibilidade de transmissão zoonótica¹. O estudo dos STs e seus alelos é fundamental para a compreensão de aspectos epidemiológicos que ainda permanecem incertos.

O presente estudo é um dos poucos a analisar a ocorrência de subtipos de *Blastocystis* sp. no Brasil. Assim, nossos resultados podem contribuir para a compreensão da distribuição geográfica dos subtipos, e consequentemente fornecer dados de distribuição dos STs no Brasil. Além disso, estes resultados fornecem uma análise molecular inicial que irá permitir o exame futuro de aspectos epidemiológicos ainda desconhecidos.

8 CONCLUSÕES

- a) cPCR apresentou 78,3% de positividade nas amostras fecais diagnosticadas na Seção de Parasitologia do Laboratório Central (HC/FMUSP);
- b) Os subtipos ST1, ST2, ST3 e ST6 foram identificados nas amostras fecais de pacientes acompanhados no HC/FMUSP;
- c) O ST3 foi o mais prevalente entre os isolados;
- d) A identificação do ST6, um subtipo dito como aviário, pode indicar a possibilidade de caráter zoonótico;
- e) Observamos baixa diversidade de alelos dentro dos STs isolados nas amostras fecais dos pacientes acompanhados no HC/FMUSP.

REFERÊNCIAS

1. Stensvold CR. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropic Parasito*. 2013;3(1):26-34.
2. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop*. 2013;126(1):11-8.
3. Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Khan AH, Ahmed A, Surin J, et al. Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasit Vectors*. 2013;8(6):86.
4. Tan KS. New insights on classification, identification and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):639-65.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. David EB, Guimarães S, Oliveira AP, Oliveira-Siqueira TC, Bittencourt GN, Nardi AR, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo. *Parasite Vector*. 2015; 8:103-115.
9. 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(6):1050-53.
10. Zierdt C H. *Blastocystis hominis*—past and future. *Clin Microbiol Rev*. 1991;4:61–79.

11. Brittan F. Report of a series of microscopical investigations on the pathology of cholera. London Med Gaz. 1849;9:530-42.
12. Swayne JG. An account of certain organic cells peculiar to the evacuations of cholera. Lancet. 1849;368-71.
13. Perroncito E. Di un nuovo protozoa dell uomo e di talune specie animali. G Acad Med Torino 1899;5:36-8.
14. Borini A. Associazione parassitaria ed il nuovo protozoa di Perroncito. G. Acad Med Torino. 1899;5:529-32.
15. Alexieff, A. Sur la nature des formations dites "Kystes de Trichomonas intestinalis." C R Soc Biol. 1911;71:296-98.
16. Mehlhrom H, Tan KSW, Yoshikawa H. *Blastocystis*: Pathogens or Passenger? An Evaluation of 101 Years of Research. Berlin: Springer Science & Business Media. 2012. v4.
17. Brumpt, E. *Blastocystis hominis* N. sp. et formes voisines. Bull Soc Pathol Exot. 1912;5:725-30.
18. 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. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(6):565-9.
19. Rosenbusch F. *Blastocystis* en los animales. Rectificacion etiologica de la Typhlohepatitis en los pavos. Bol Inst Clin Quirurg. 1927;3:352-4.
20. Zierdt CH, Rude WS, Bull BS. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. Am J Clin Pathol. 1967;48(5):495-501.
21. Zierdt CH. Studies of *Blastocystis hominis*. J. Protozool. 1973;20 (1):114-21.
22. Tan HK, Zierdt CH. Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. Z Parasitenkd. 1973;42(4):315-24.
23. Phillips BP, Zierdt CH. *Blastocystis hominis*: Pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. Experi Parasito. 1976;39:358-64.

24. Zierdt CH, Swan JC, Hosseini J. In vitro response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. J. Protozool. 1983;30(2):332-4.
25. Markell EK, Udkow MP. Association of *Blastocystis hominis* with human disease. J Clin Microbiol. 1988;26(3):609.
26. Yamada M, Yoshikawa H, Tegoshi T, et al. Light microscopical study of *Blastocystis* spp. in mokeys and fowls. Parasitol Res. 1987;73:527-31.
27. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. Nature. 1996;4:380-98.
28. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of Stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(1):42-53.
29. Hoevers JD, Snowden KF. Analysis of the ITS region and partial ssu and lsu rRNA genes of *Blastocystis* and *Proteromonas lacertae*. Parasitol. 2005;131(2):187-96.
30. Eymael D, Schuh GM, Tavares RG. Padronização do Diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas de coloração. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(3):309-12.
31. Dunn LA, Boheram PFL, Stenzel DJ. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. Inter J Parasitol. 1989;19(1):43-56.
32. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. Clin. Microbiol. Rev. 1996;9:563-84.
33. Zaman V, Howe J, Ng M, Goh TK. Scanning electron microscopy of the surface coat of *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 1999;85(12):974-6.
34. Scanlan PD. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. Trends Parasitol. 2012;28(8):327-34.
35. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. Parasitol Res. 1997;83:319-325.

36. Cruz WC. Ocorrência e caracterização morfológica de *Blastocystis* sp. em três espécies de aves comercializadas em mercados municipais do Rio de Janeiro [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária; 2008.
37. Hameed DM, Hassanin OM, Zuel-fakkar NM. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol Res.* 2011;108:553-60.
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: 80–1.
39. Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 1995;81:446-50.
40. Pavanelli MF, Kaneshima EN, Uda CF, Colli CM, Falavigna-Guilherm AL, Gomes ML. Pathogenicity of *Blastocystis* sp. to the gastrointestinal tract of mice: relationship between inoculum size and period of infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2015;57(6):467-72.
41. Wong KHS, Ng GC, Lin RTP, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KS. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res.* 2008;102(4):663-70.
42. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends Parasitol.* 2007;23(3):93–6.
43. 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.
44. Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002;96(8):803–7.
45. Zhang X, Qiao J, Wu X, Da R, Zhao L, Wei Z. In vitro culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *Inter J Infect Dis.* 2012. 16(1):e23-8.
46. 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(6):445–7.

47. Yoshikawa H, Dogruman-AI F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N, et al. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol. Res.* 2011;109(4):1045-50.

48. Chen J, Vaudry WL, Kowalewska K, Wenman W. Lack of serum immune response to *Blastocystis hominis*. *Lancet.* 1987;31(2):1021.

49. 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):51-6.

50. Garavelli PL, Scaglione L, Merighi A, Libanore M, Endoscopy of blastocystosis. *Ital J Gastroenterol.* 1992;24(4):206.

51. Abou Gamra MM, Elwakil HS, El Deeb HK, Khalifa Ke, Abd Elhafiz HE. The potential use of 29kDa protein as a marker of pathogenicity and diagnosis of symptomatic infections with *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 2010;108(5):1139-46.

52. 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.

53. Santín M, Gómez-Muñoz 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.

54. Jones II MS, Ganac RD, Hiser G, Hudson NR, Le A, Whipps CM. Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitol Res.* 2008;103(3):551-7.

55. 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.* 2006;134(3):359-67.

56. Pasqui AL, Savini E, Saletti M, Guzzo C, Puccetti L, Auteri A. Chronic urticarial and *Blastocystis hominis* infection. A case report. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2004;8(3):117-20.

57. Qadri SMH, Al-Okaili GA, Al-Dayel F. Clinical significance of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbio. 1989.;27(11):2407-09.
58. Tan KSW, Mirza H, Teo JD, Wu B, Macary PA. Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. Curr Infect Dis Rep. 2010;12(1):28-35.
59. Yoshikawa h, Abe N, Wu Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. Microbio. 2004;150(5):1147-51.
60. Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, et al. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. J Clin Microbio. 2000;38(4):1324-30.
61. Yoshikawa H, Morimoto K, Wu Z, Singh M, Hashimoto T. Problems in speciation in the genus *Blastocystis*. Trends Parasitol. 2004;20(6)251-5.
62. Yoshikawa H, Iwamasa A. Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU rRNA gene. Parasitol Int. 2016;65(6):785-791.
63. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. Protist. 2006;157(1):77-85.
64. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. Parasitology. 2003;126(1):1-9.
65. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. *Blastocystis*: To treat or not to treat. Clin Infect Dise. 2012;54(1):105-10.
66. Popruk S, Udonsom R, Koompaong 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.
67. Stensvold CR, Nielsen HV, Molbak K, et al. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. Trends Parasitol. 2008. 23 25(1), 23-29.

68. Krogsgaard LR, Engsbø AL, Stensvold CR, et al. The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: A population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(3):507–13.
69. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis*. 2013;1(5):167-78.
70. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int*. 2016;65(6):763-71.
71. Stensvold CR. Thinking *Blastocystis* out of box. *Cell*. 2012;28(8):305.
72. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*. 2014;6:17.
73. Verma, R., Delfanian, K. *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *Am. J. Med. Sci*. 2013;346(1):80–1.
74. Boorom KF, Smith H, Nimri L, et al. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasite Vect*. 2008;21(1):40.
75. Bierdermann, T, Hartmann K, Sing A, Przybilla B. Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs and chronic urticarial cured by treatment of *Blastocystis hominis* infection. *British J Derm*. 2002;146(6):1113-4.
76. Bakiri AH, Ervin CM. Urticaria as symptom of parasite migration through the biological barriers. *Open Allergy J*. 2011;4:1-7.
77. Lepczyńska M, Chen WC, Dzika E. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? *Int J Dermatol*. 2016;55(3):259-66.
78. Zagloul DA, Khodari YA, Farooq MU. *Blastocystis hominis* and allergic skin disease; a single centre experience. *J Health Sci*. 2012;2(1), 66-9.
79. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzgen A, Stopsack K, Heinrich-Grafe U, et al. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol. Int*. 2010;59(3):469–71.
80. Gupta R, Parsi K. Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. *Australas J Dermatol*. 2006;47(2):117-9.

81. Lepczynska M, Dzika E, Kubiak K, Korycinska J. The role of *Blastocystis* sp. As an etiology of irritable bowel syndrome. *Pol Ann Med*. 2016;23(1):57-60.
82. Cassano N, Scoppio BM, Loviglio MC, Vena GA. Remission of delayed pressure urticaria after eradication of *Blastocystis hominis*. *Acta Derm Venereol*. 2005;85(4):357–8.
83. Mineo JR, Silva DAO, Sopoiete MC, Leal GS, Vidigal LH, Tápia L. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. *Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação*. 1 ed. Uberlândia:EDUFU;2005
84. Lutz A. O *Schistosoma mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1919;11:121-55.
85. Faust EC, D'Antoni JS, Odom V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *Am J Trop Med*. 1938;18:169-83.
86. Gomori G. A rapid-one step trichrome. *Am J Clin Pathol*. 1950;20:661-4.
87. Leishman WB. Note on a simple and rapid method of producing Romanowsky staining in malarial and other blood films. *Br Med J*. 1901;2:757-8.
88. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. V.2.
89. Zerpa L, Huicho L, Naquira C, Espinoza I. A simplified culture method for *Blastocystis hominis*. *Rev Mex Patol Clin*. 2000;47(1):17-9.
90. Wang W, Cuttell L, Bielefeldt-Ohmann H, Inpankaew T, Owen H, Traub RJ. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasit Vectors*. 2013;24(6):215.
91. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-7.
92. Kurt O, Al FD, Tanyuksel M. Eradication of *Blastocystis* in humans: really necessary for all? *Parasitol Int*. 2016;65(6):797-801.

93. Ozyurt M, Kurt O, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infection in Turkey. *Parasitol Int.* 2008;57(3):300-6.
94. Mattiucci S, Crisafi B, Gabrielli S, Paoletti M, Cancrini G. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infections in humans in Italy. *Epidemiol Infect.* 2016;144(3):635-46.
95. 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.
96. Leder K, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Wolfe R. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *J Gastro Hepatol.* 2005;20(9):1390-4.
97. Meloni D, Sanciu 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(3):613-9.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ___ F ___
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ___ F ___
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Identificação de genótipos de *Blastocystis* spp. em pacientes com urticária crônica”

1. ”

PESQUISADOR: Dr. Ronaldo César Borges Gryschek
 CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL nº: 39.680 (CREMESP)
 UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()
 (Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 03 (três) anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. As informações seguintes estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que tem por objetivo inicial caracterizar os subtipos de *Blastocystis* spp. presentes em pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo.
2. Os trabalhos executados pretendem avaliar os indivíduos com relação à infecção por

Blastocystis spp. através da detecção do DNA do parasito nas fezes (por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)). *Blastocystis* spp. é um organismo presente no trato intestinal dos seres humanos e de outros animais, observado frequentemente em amostras fecais. Este organismo envolve aspectos patogênicos e zoonóticos poucos conhecidos. Atualmente tem sido associado com doenças intestinais, como a síndrome do intestino irritável e manifestações clínicas de hipersensibilidade alérgica cutânea, como a urticária crônica. Técnicas moleculares baseadas na amplificação de DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido utilizadas para auxiliar no estudo de seus mecanismos de ação patogênicos que ainda permanecem desconhecidos. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar os subtipos de *Blastocystis* sp. presentes em pacientes do Ambulatório de Dermatologia e Seção de Parasitologia da Divisão do Laboratório Central do Hospital das Clínicas/FMUSP.

3. Deve ficar claro que sua participação é totalmente livre e voluntária e que sua eventual recusa em participar do estudo não ocasionará nenhum tipo de prejuízo pessoal ao (à) Sr(a) e sua família.
 4. Sua participação no estudo consiste em:
 - A. Fornecer uma amostra de fezes
 5. Tais procedimentos não envolvem risco importante à sua saúde.
 6. Para este estudo não há procedimentos alternativos mais vantajosos que os propostos anteriormente.
 7. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek que poderá ser encontrado no Laboratório de Esquistossomose do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, na A. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº 500, prédio II, 2º andar, telefone 11- 3061-8220. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)- Rua Ovídio Pires de Campos, 255 – 5º andar – telefone 11 3069-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20; FAX 11 3069-6442 ramal 26 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br
 8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento, se for o caso.
 9. Direito de confidencialidade – as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
 10. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais deste estudo, assim que os pesquisadores tiverem conhecimento desses resultados. Os resultados dos exames serão fornecidos individualmente aos pacientes durante seu acompanhamento ambulatorial. Se consentido, os dados dos exames constarão nos prontuários dos pacientes para o acompanhamento da rotina ambulatorial.
 11. Despesas e compensações: não há nenhuma espécie de despesa pessoal para o participante em qualquer fase deste estudo, incluindo exames e remédios que venham a ser indicados no tratamento de alguma parasitose identificada. Da mesma forma não há compensação financeira relacionada à sua participação. Caso surja alguma despesa adicional ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
 12. Solicitamos também sua autorização para que o material coletado durante o estudo possa, eventualmente, ser utilizado em estudos futuros relacionados às mesmas questões que estamos tentando resolver com a presente pesquisa.
2. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Blastocystis* spp. EM PACIENTES COM URTICÁRIA CRÔNICA”**

Eu discuti com o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou também claro que a minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente a participar desse estudo e estou ciente que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou

durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente / representante legal

São Paulo, _____ de 2014.

Assinatura de testemunha, para casos de participantes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

São Paulo, _____ de 2014.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.
Dr. Ronaldo César Borges Gryscek

ANEXO B – Aprovação projeto de pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE BLASTOCYSTIS SPP. EM PACIENTES COM URTICÁRIA CRÔNICA

Pesquisador Responsável: Ronaldo Cesar Borges Gryscek **Versão:** 2

Pesquisador Executante: Gessica Baptista de Melo **CAAE:** 20886213.2.0000.0068

Co-autores: Fabiana Martins de Paula, Celina Wakisaka Maruta, Paulo Ricardo Criado, Vera Lúcia Pagliusi Castilho, Elenice Messias do Nascimento Gonçalves

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Orientador: Ronaldo Cesar Borges Gryscek

Instituição: HCFMUSP

Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11249

Número do Parecer: 488.701

Data da Relatoria: 11/12/13

Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto de estudo prospectivo que envolve a pesquisa parasitológica e caracterização molecular de protozoário intestinal, com a finalidade de demonstrar a possível correlação dessa parasitose com a urticária crônica. O projeto não apresenta qualquer quesito/conflito sob o ponto de vista ético.

Objetivo da Pesquisa: Demonstrar a possível correlação da infecção intestinal pelo *Blastocystis* spp com a urticária crônica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não haverá qualquer risco para os pacientes e controles, pois a intervenção é representada somente pela avaliação clínica, exame protoparasitológico de fezes e técnicas moleculares para a caracterização do protozoário. Os possíveis benefícios serão representados pela comprovação de possível agente etiológico da urticária crônica, condição de difícil manejo e causa de má qualidade de vida para os pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Trata-se de pesquisa exequível, que poderá contribuir para o estudo dos mecanismos patogênicos da urticária crônica.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br