UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

GESSICA BAPTISTA DE MELO

Blastocystis sp.: epidemiologia molecular e relação com doenças em cenários brasileiros.

São Paulo

2022

GESSICA BAPTISTA DE MELO

Blastocystis sp.: epidemiologia molecular e relação com doenças em cenários brasileiros.

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek
Coorientador: Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Melo, Gessica Baptista de
Blastocystis sp. : epidemiologia molecular e relação com doenças em cenários brasileiros / Gessica Baptista de Melo. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Ronaldo Cesar Borges Gryschek.
Coorientadora: Fabiana Martins de Paula.

Descritores: 1.Blastocystis sp 2.Urticária 3.Diabetes 4.Subtipos 5.Cultura in vitro 6.Brasil

USP/FM/DBD-251/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Melo GB. *Blastocystis* sp.: epidemiologia molecular e relação com doenças em cenários brasileiros. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À Deus toda honra e glória.

Ao meu marido, Adamo (em memória), um dos meus maiores incentivadores nesta caminhada. Sempre estará guardado em minha mente e coração.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao principal autor e consumador deste trabalho, Deus, por estar sempre comigo em todos os momentos, me mostrando que os sonhos Dele são maiores e que nada acontece nessa vida sem um propósito maior.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek e Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula, a quem tanto admiro e respeito. Obrigada por todo apoio, paciência e sabedoria nesta caminhada acadêmica. Serei eternamente grata por confiarem em mim e abrirem as portas do laboratório para a realização deste estudo. Sempre foram mais que apenas orientadores, são pessoas que quero levar para a vida.

À minha família, meus maiores incentivadores, que sempre estiveram comigo me apoiando nessa jornada, em especial a minha mãe Joice Baptista de Melo, vó Maria e irmã Gisele Melo, não sei o que seria da minha vida sem vocês. Ao meu filho, Gabriel Baptista da Silva, por ser o meu maior motivo para recomeçar todos os dias. Eu amo muito vocês.

Ao meu falecido marido Adamo Bastos, a quem sempre me apoiou. Sei o quanto você estaria orgulhoso por me ver finalizar mais essa etapa em minha vida. Sinto muito sua falta. Sigo cumprindo o que você me pediu pela última vez: “Fica bem e cuida do nosso bebê”.

À Soraya Domingues, família Le Pieri Cosméticos e Giudit Cosméticos, por me acolherem no momento mais difícil da minha vida, serei eternamente grata por esse apoio e carinho.

À minha amiga Karina Martins e Elaine Santos, por serem mais que amigas, irmãs em todos os momentos. Obrigada por toda paciência e carinho comigo.

Aos colegas do Laboratório de Investigação Médica LIM06 do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo por toda amizade e auxílio nas etapas deste trabalho.

Esse projeto teve o apoio financeiro da CAPES e FAPESP.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

(Carl Jung)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Este trabalho foi realizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Investigação Médica – 06 da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o auxílio financeiro ao aluno dado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Sumário

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO 20

1.1 Diagnóstico da infecção por *Blastocystis* sp. 21

1.2 Estudos *in vivo* e *in vitro* de *Blastocystis* sp. 22

1.3 Aspectos clínicos 23

2. OBJETIVOS 27

2.1 Objetivo geral 27

2.2 Objetivos específicos 27

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS 29

4. RESULTADOS 31

Capítulo I Situação atual das pesquisas que envolvem *Blastocystis* sp., um protista enigmático, no Brasil 32

Capítulo II Relatório atualizado sobre *Blastocystis* sp. em um hospital universitário do Brasil: uma experiência retrospectiva de 6 anos 40

Capítulo III Caracterização dos subtipos de *Blastocystis* sp. isolados de pacientes com urticária, São Paulo, Brasil 54

Capítulo IV Subtipos de *Blastocystis* em pacientes com diabetes mellitus da região Centro-Oeste do Brasil 62

Capítulo V Manutenção *in vitro* e identificação molecular de *Blastocystis* sp. em isolados humanos brasileiros: resultados preliminares 72

5. DISCUSSÃO 80

6. CONCLUSÕES 87

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89

Anexos 101

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos dos 500 prontuários incluídos no estudo..... 50

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição das amostras de fezes analisadas na Seção de Parasitologia do Instituto Central do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ao longo dos anos (2016 a 2021) (p= 0,02394) 51

Figura 2 – Procedência das amostras de fezes, analisadas no período de 2016 a 2021, na Seção de Parasitologia do Instituto Central do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em relação a região da cidade de São Paulo (p=0,1862) 52

Figura 3 – Procedência das amostras de fezes analisadas no período de 2016 a 2021, na Seção de Parasitologia do Instituto Central do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em relação ao serviço solicitante. DHAS (Departamento Hospital Auxiliar de Suzano), HLS, ICHC (Instituto Central Hospital das Clínicas), ICR (Instituto da Criança e do Adolescente), ICSP (Instituto do Câncer do estado de São Paulo), IMREA (Instituto de Medicina Física e Reabilitação), INCOR (Instituto de Coração), IOT (Instituto de Ortopedia e Traumatologia), IPQ (Instituto de Psiquiatria), PA (Pronto Atendimento), CACEC (Centro de Atendimento ao Colaborador) 53

RESUMO

Melo GB. *Blastocystis* sp.: epidemiologia molecular e relação com doenças em cenários brasileiros. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Blastocystis sp. é descrito como um protista unicelular que apresenta alta prevalência em amostras fecais de humanos e animais, ainda envolto por aspectos controversos quanto à sua patogenicidade e epidemiologia. No Brasil, existem poucos estudos relacionados com o entendimento de aspectos relevantes deste enigmático organismo. Diante disso, foram propostas diferentes abordagens, como o panorama geral das pesquisas no Brasil nos últimos 20 anos; a ocorrência de *Blastocystis* sp. no complexo Hospital das Clínicas (HC-FMUSP) no período de 2016-2021; a caracterização molecular de isolados de pacientes com urticária crônica e diabetes, e realizar o cultivo *in vitro* de isolados humanos. Os dados tanto da revisão da literatura sobre a pesquisa de *Blastocystis* sp. no Brasil quanto a avaliação da sua positividade no complexo HC-FMUSP reforçam a presença deste organismo em nosso meio e levanta a possibilidade de novos estudos para entender a sua real significância clínica. Em relação a urticária, não foi possível estabelecer uma relação direta com a infecção de *Blastocystis* sp. Contudo, obteve-se a identificação de grande diversidade intra e inter-subtipos circulantes nesses pacientes. Em relação aos diabéticos, embora este protista tenha sido mais prevalente neste grupo, ainda não se pode estabelecer uma relação entre diabetes e *Blastocystis* sp. E por fim, os dados sobre a manutenção *in vitro* de isolados humanos permitiram o observar diferentes tempos de cultivo e de formas evolutivas presentes nos diferentes subtipos e alelos. Assim, são necessários mais estudos focados na interação entre *Blastocystis* sp. e o hospedeiro para o entendimento do impacto deste organismo na saúde pública.

Descritores: *Blastocystis* sp. Urticária. Diabetes. Subtipos. Cultura *in vitro*. Brasil.

ABSTRACT

Melo GB. *Blastocystis* sp.: molecular epidemiology and relationship with diseases in Brazilian scenarios. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Blastocystis sp. is described as a protozoan prevalent in faecal samples from humans and animals, but still involves controversial aspects regarding its pathogenicity and epidemiology. In Brazil, there are few studies related to the understanding of relevant aspects of this enigmatic organism. Therefore, different approaches were proposed, such as the overview of research in Brazil in the last 20 years; the occurrence of *Blastocystis* sp. in the HC complex (Hospital das Clínicas) in the period of 2016 to 2021; the molecular characterization of isolates from patients with urticaria and diabetes, and perform *in vitro* cultivation of human isolates. The data of the literature review on the research of *Blastocystis* sp. in Brazil regarding the evaluation of its positivity in the HC-FMUSP complex reinforce the presence of this organism in our environment and raises the possibility of further studies to understand its real clinical significance. In relation to urticaria, it was not possible to establish a direct relationship with *Blastocystis* sp. Infection. Yet, it was possible to identify high intra and inter-subtypes diversity circulating in these patients. Regarding diabetics, although this protist was more prevalent in this group, it has not yet been possible to establish a relationship between diabetes and *Blastocystis* sp. Finally, our findings on the *in vitro* maintenance of human isolates allowed us to observed different cultivation times and forms present in different subtypes and alleles. Thus, further studies are needed focusing on the interaction between *Blastocystis* sp. and the host, to understand the impact of this organism on public health.

Keywords: *Blastocystis* sp. Urticaria. Diabetes. Subtypes. *In vitro* culture. Brazil.

1. Introdução

Acredita-se que o organismo que conhecemos hoje como *Blastocystis* sp. foi descoberto bem antes de sua primeira descrição na literatura[1]. Ao longo da história, pesquisadores relataram que células esféricas ocas são predominantes em amostras fecais de humanos e animais, muito semelhantes a artefatos e células degradadas. O primeiro relato publicado sobre *Blastocystis* sp. foi realizado em 1911 por Alexeieff [2], ao observar células esféricas em amostras fecais de aves, ratos, répteis e sanguessugas. Em 1912, Brumpt[3] observou estas mesmas formas celulares em isolados de materiais fecais humanos e o reclassificou como uma espécie de levedura distinta denominando-a *Blastocystis hominis.* Em 1967 foram descritas características baseadas em aspectos morfológicos e fisiológicos semelhantes à de protozoários, levantando dúvidas quanto a sua classificação como levedura, o que levou à sua reclassificação como protozoário membro do sub-reino Protozoa[4]. Atualmente, estudos baseados na análise filogenética de sequências parciais da região ribossomal (SSU rDNA), o classificam como membro do filo Stramenopiles, composto por protistas unicelulares e pluricelulares[5,6].

Mesmo após mais de 100 anos de sua primeira descrição, a real importância clínica e biológica deste enigmático protista ainda permanece pouco compreendida. *Blastocystis* sp. possui distribuição mundial, com cerca de mais de um bilhão de indivíduos infectados[7,8]. Em constante crescimento, sua positividade tem variado de 0,5 - 62% em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente[9,10].

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 e ao consumo de alimentos e água contaminada com as formas císticas[11,12]. *Blastocystis* sp. é considerado um organismo polimórfico, sendo reconhecidas as formas cística, vacuolar, ameboide e granular, e com menor frequência as formas multivacuolar e avacuolar[12,13]. O papel funcional de cada forma ainda permanece incerto, bem como sua transmissão. Porém, estudos sugerem que possivelmente ocorra via fecal-oral pela ingestão de formas císticas[14,15].

Até o momento, o gênero *Blastocystis* é composto por 28 subtipos (ST1-ST17, ST21, ST23-ST29 e ST30-ST32) que podem infectar muitos animais além do homem[16,17,18]. No entanto, mais de 90% dos casos isolados em humanos ao redor do mundo pertencem a quatro subtipos (ST1, ST2, ST3 e ST4)[11,18]. Os subtipos ST5-ST8 são raramente

encontrados em humanos, sendo isolados com maior frequência em aves e primatas não humanos[10,18]. Por outro lado, subtipos antes descritos somente em humanos (como por exemplo ST9) estão sendo relatados em animais; o inverso também tem sido mencionado, como o ST12 antes em animais agora em humanos[16,17]. A prevalência dos subtipos de *Blastocystis* sp. possivelmente está relacionada com a região estudada[9].

Os STs de *Blastocystis* sp. apresentam uma grande diversidade genética, porém ainda não se sabe ao certo se essa variabilidade pode influenciar fatores funcionais no hospedeiro[19]. Relatos apontam uma considerável variação genética inter e intra subtipos podendo influenciar a sua patogenicidade[20,21]. É provável que estejamos expostos aos diferentes subtipos em nosso dia a dia, mas é necessário compreender quais são os fatores determinantes para que ocorra a colonização de determinado subtipo, bem como a presença de manifestações clínicas.

1.1 Diagnóstico da infecção por *Blastocystis* sp.

Convencionalmente, *Blastocystis* sp. é detectado através da identificação microscópica de suas formas em amostras de fezes. Os métodos utilizados como padrão para o diagnóstico na rotina laboratorial são exame direto, sedimentação espontânea, técnica de concentração em formol-éter, esfregaço corados por Giemsa e Lugol[13]. Os métodos que apresentam alta sensibilidade são os métodos de cultura axênica *in vitro* e os esfregaços permanentes corados com hematoxilina férrica ou tricrômio[10,13,22,23]. É importante ressaltar que as técnicas de coloração e as culturas, não são, na maioria das vezes, realizadas nos laboratórios de rotina, pois são técnicas que demandam mais tempo para execução[12,13] Além disso, existem relatos que mencionam a ineficácia de métodos que utilizam amostras preservadas ou adição de água, podendo acarretar a lise das células de *Blastocystis* sp., gerando resultados falso-negativos[13].

Técnicas imunológicas, como a Reação de Imunofluorescência Indireta e teste imunoenzimático (ELISA) têm sido mencionadas na detecção de anticorpos anti *Blastocystis* sp. em pacientes assintomáticos e sintomáticos[10,24,25]. A técnica de Western-Blotting apontou bandas proteicas especificas como marcadores de patogenicidade de *Blastocystis* sp.[26]. Recentemente, Dogruman-Al et al.[27] descreveram um novo teste

ELISA para a detecção de copro-antígenos, seja em amostras de fezes frescas, preservadas ou congeladas, propondo esse teste como uma forma alternativa para o diagnóstico e triagem de *Blastocystis* sp.

Os métodos baseados na pesquisa de DNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e suas variações, como a Análise do Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição (RFLP), e a PCR em tempo real, vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos como ferramenta complementar para a detecção de *Blastocystis* sp.[19,28,29]. Regiões codificantes do RNA ribossomal são utilizadas com frequência para a identificação de relações filogenéticas entre as espécies, ou ainda para a detecção de subespécies, o que pode contribuir para o diagnóstico especifico de *Blastocystis* sp.[8].

A partir da análise das subunidades do DNA ribossomal (SSU-rDNA) de *Blastocystis* foram propostos iniciadores específicos para cada STs, facilitando o seu diagnóstico[30,31]. No entanto, com o intuito de uniformizar a nomenclatura dos diferentes STs de *Blastocystis* sp., foi proposta a terminologia consenso, segundo a qual a região *barcode* descrita por Scicluna et al.[32], localizada entre um iniciador de ampla especificidade eucariótica (RD5) e uma sequência específica encontrada nos STs (BhRDr) seja utilizada para caracterização molecular[33]. Adicionalmente, tem sido proposta a identificação criada a partir da tipagem de sequências de multiplos *locus* gênicos (MLST) constituídas de genes conservados, denominados "*housekeeping*", codificantes de enzimas metabólicas ou proteínas de regulação[34]. Stensvold et al. 2012[35], avaliando sequencias por MLST de *Blastocystis* sp. sugeriram diferenças notáveis dentro dos STs, principalmente ST3 e ST4 que podem estar relacionadas implicações clínicas importantes, além de uma ferramenta de comparação de STs identificados e seus alelos[36]. Com isso, a caracterização da variabilidade genética deste organismo pode contribuir para o entendimento da sua possível patogenicidade[37].

1.2 Estudos *in vivo e in vitro* de *Blastocystis* sp.

Ao longo dos anos, tem aumentado o número de estudos com o intuito de entender os sistemas biológicos e fatores genéticos de *Blastocystis* sp.[10,33,38]. No entanto, estes fatores ainda permanecem envoltos por controvérsias e suposições. Estudos focados na

manutenção *in vitro* de isolados de *Blastocystis* ainda são restritos[23,38,39]. No geral, a cultura *in vitro* tem sido realizada como método para o diagnóstico parasitológico ou como uma técnica anterior ao diagnóstico molecular, e não como técnica alternativa para o estudo da biologia deste organismo[40,41,42].

Um dos principais obstáculos ao estudar a possível patogenicidade de *Blastocystis* sp. é a falta de um modelo animal eficaz[43]. Na tentativa de entender a possível relação entre *Blastocystis* e seus hospedeiros foram descritos alguns estudos experimentais[15,20,44]. A patogenicidade dos isolados pode estar relacionada com o tamanho do inóculo e com o tempo de infecção[15]. Estudos *in vitro* e em modelos experimentais de roedores, principalmente com ST7 e ST4, têm constatado alterações histopatológicas leves nos tecidos do hospedeiro, além de processos inflamatórios, possivelmente relacionadas à maior adaptação dos mesmos ao hospedeiro[20,45]. No entanto, devemos mencionar que podem existir variações na relação do hospedeiro para diferentes subtipos de *Blastocystis*, o que pode tornar complexos os estudos experimentais deste organismo[10,46].

Atualmente uma discussão recorrente nas pesquisas com *Blastocystis* sp. é a possibilidade deste organismo ser considerado um membro da microbiota do hospedeiro[45]. Os mecanismos das interações entre *Blastocystis* sp. e microbiota intestinal ainda são relativamente pouco definidos. Com isso, novas pesquisas devem ser conduzidas em humanos ou outros hospedeiros naturais ao nível de subtipo para determinar se é um membro da microbiota intestinal ou um patógeno.

1.3 Aspectos clínicos

A blastocistose, possível doença causada por *Blastocystis* sp., não possui sintomas gastrointestinais específicos que facilitem o diagnóstico clínico numa primeira avaliação[47,48]. São observados sintomas como diarreia, dores abdominais, vômito, fadiga, à semelhança do que ocorre com outras enteroparasitoses[10,49].

A patogenicidade de *Blastocystis* sp. pode estar relacionada com o número de formas presentes, determinados subtipos e o estado imunológico do hospedeiro[10,50]. Além disso, tem sido levantada a hipótese de que a relação entre *Blastocystis* sp. e a microbiota intestinal possa estar relacionada com manifestações clínicas[45,47,49].

Estudos apontam que 82% das amostras fecais de indivíduos aparentemente saudáveis foram positivos para *Blastocystis* sp., reforçando a sua descrição como um componente estável no trato intestinal[10,49]. Curiosamente, na revisão realizada por Deng et al.[45], a colonização de *Blastocystis* sp. pode estar fortemente associada com mudanças nos componentes da microbiota intestinal. Adicionalmente, indivíduos com diagnóstico positivo para *Blastocystis* apresentam maior diversidade de bactérias compondo a microbiota quando comparados com aqueles com diagnóstico negativo para a parasitose.

Em contraste, associações baseadas em relatos de casos sugerem *Blastocystis* sp. como possível responsável por manifestações gastrointestinais e extra intestinais, como síndrome do intestino irritável (SII) e urticárias[49,51-55].

No geral, a ligação entre uma parasitose e sintomas alérgicos são limitados, entendendo-se que alguns parasitas estejam entre os mais potentes indutores na produção de IgE[56]. Há descrições de que *Blastocystis* sp. pode estar associado a quadros de urticárias, sobretudo quando há presença da forma ameboide aderida às células epiteliais intestinais. Como resultado dessa adesão ocorre o recrutamento de células inflamatórias, que ativam mastócitos e basófilos, levando a manifestações como a urticária[51,54,57].

Por outro lado, antígenos de *Blastocystis* sp. podem ativar clones específicos de linfócitos Th2, promovendo a liberação de citocinas, como interleucinas 3, 4, 5 ou 13, levando a produção de IgE[53,55]. Porém, o mecanismo fisiopatológico envolvido na indução da urticária por *Blastocystis* sp. ainda permanece por ser esclarecido. O que se sabe é que em alguns casos ocorre melhora das manifestações gastrointestinais e alérgicas após o tratamento de *Blastocystis* sp.[48,58,59].

Outro ponto a ser ressaltado sobre *Blastocystis* sp. é sua elevada ocorrência em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com AIDS, receptores de transplante de órgãos e pacientes com câncer[60-63]. Isto pode estar relacionado com as deficiências imunológicas presentes nessas populações[61,64]. Neste contexto, infecções parasitárias intestinais apresentam maior frequência em pacientes com diabetes em relação a não-diabéticos[65-67]. No entanto, a ocorrência de *Blastocystis* sp. nesta população é pouco conhecida[65,66].

No Brasil, existem poucos estudos relacionados com o entendimento de aspectos relevantes deste enigmático organismo. Diante disso, foram propostas diferentes abordagens, como o panorama geral das pesquisas no Brasil nos últimos 20 anos; a ocorrência de *Blastocystis* sp. no complexo HC no período de 2016-2021; bem como a caracterização molecular de isolados de pacientes com urticária crônica e diabetes, e realizar o cultivo *in vitro* de isolados humanos.

2. Objetivos

2. 1 Objetivo Geral

Proporcionar maior conhecimento sobre aspectos epidemiológicos e clínicos da infecção por *Blastocystis* sp. em diferentes cenários, no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

1. Atualização sobre a situação atual das pesquisas que envolvem *Blastocystis* sp. no Brasil ao longo das duas últimas décadas (2000-2020), bem como apontar aspectos relevantes desse enigmático organismo (Capítulo 1);

2. Avaliar a ocorrência de *Blastocystis* sp. nos exames parasitológicos de rotina realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP) na cidade de São Paulo, durante os anos 2016-2021 (Capítulo 2);

3. Avaliar a ocorrência e caracterização molecular *de Blastocystis* sp. em isolados de indivíduos com urticária acompanhados no Ambulatório de Dermatologia do HC/FMUSP (Capítulo 3)

4. Avaliar a ocorrência e caracterização molecular *de Blastocystis* sp. em isolados de indivíduos com diabetes mellitus da cidade de Jataí, Goiás (Capítulo 4);

5. Desenvolver e implementar na rotina do Laboratório de Investigação Médica (LIM06), o cultivo in vitro de *Blastocystis* sp. a partir de isolados humanos (Capítulo 5).

3. Casuística e métodos

Durante a execução deste trabalho de doutorado, foram desenvolvidos estudos com diferentes abordagens sobre *Blastocystis* sp. Para melhor visualização, os manuscritos científicos publicados foram apresentados em capítulos. Diante disso, a casuística, metodologia e resultados estão descritas em cada capítulo.

4. Resultados

Os artigos científicos produzidos foram alocados em capítulos.

Capítulo I

Situação atual das pesquisas que envolvem *Blastocystis* sp., um protista enigmático, no Brasil

(Current status of research regarding Blastocystis sp., an enigmatic protist, in Brazil)

Capítulo I

No Brasil, o primeiro estudo específico sobre *Blastocystis* sp. foi realizado por Guimarães e Sogayar[68]. Nesse estudo, a alta positividade desse organismo foi demonstrada por métodos parasitológicos em crianças e trabalhadores de creches. Ao longo dos anos, novos estudos foram desenvolvidos com o objetivo principal de detectar parasitoses intestinais, confirmando a alta taxa de positividade de *Blastocystis* sp. nas populações estudadas[40,42,69-74]. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Blastocystis* sp. em estudos brasileiros realizados num período de 20 anos (2000-2020).

A ocorrência de *Blastocystis* sp. no Brasil variou de 0,5% a 86,6% (média 23±21), considerando o diagnóstico parasitológico, com maior positividade na região Norte (27,3±22,4) e menor, na região Centro-Oeste (13,4±17,6). Até este momento, existem poucos estudos sobre a caracterização molecular, sendo o subtipo ST3 detectado com maior frequência, seguido por ST1 e ST2. Novos estudos são necessários, sobretudo no contexto da epidemiologia molecular de *Blastocystis* sp., com o objetivo de esclarecer a distribuição dos subtipos em determinada população, atentanto também para o potencial zoonótico desse organismo.

Capítulo I

CLINICS

REVIEW ARTICLE

Current status of research regarding *Blastocystis* sp., an enigmatic protist, in Brazil

Gessica Baptista de Melo[I,II] **Larissa Rodrigues Bosqui**[III] **Idessania Nazareth da Costa**[III] **Fabiana Martins de Paula**[I,II,*] **Ronaldo Cesar Borges Gryschek**[I,II]

[I] Laboratorio de Investigacao Medica (LIM06-Laboratorio de Imunopatologia da Esquistossome), Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR. [II] Secao de Helmintologia, Instituto de Medicina Tropical (IMT), Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR. [III] Laboratorio de Imunoparasitologia das Doencas Negligenciadas e Cancer, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, BR.

Melo GB, Bosqui LR, Costa IN, Paula FM, Gryschek RCB. Current status of research regarding *Blastocystis* sp., an enigmatic protist, in Brazil. Clinics (Sao Paulo). 2021;76:e2489

*Corresponding author. E-mail: fabiana.paula@hc.fm.usp.br

The present study aimed to evaluate the occurrence of *Blastocystis* sp. in Brazilian studies over a period of years (2000–2020), as well as point out relevant aspects of this enigmatic organism.

We performed a literature search using six sources of international databases. The data were divided into diagnostic by parasitological and molecular techniques, and relevant aspects. After applying the inclusion and exclusion criteria, 52 studies were included in the final analysis.

The occurrence of *Blastocystis* sp. in Brazil ranged from 0.5% to 86.6%, as determined using parasitological techniques. The highest occurrence was in the North (27.3%) and the lowest, in the Midwest region (13.4%). In Brazil, most studies have employed molecular techniques and are concentrated in the Southeast region. The *Blastocystis* sp. subtype ST3 had the highest average positivity, followed by ST1 and ST2.

These findings represent a panorama that reflects the reality of Brazil; thus, we believe that the effectiveness of parasitological diagnosis should be considered with regard to making an appropriate choice of technique for detecting *Blastocystis* sp. Additionally, we emphasize the importance of further studies in the context of molecular epidemiology with regard to this genus. *Blastocystis* sp. is not well understood yet, and very little information regarding this genus is available; hence, further research regarding this genus is urgently needed.

KEYWORDS: *Blastocystis* sp.; Parasitological Diagnosis; Molecular Diagnosis; Brazil.

INTRODUCTION

It is believed that the organism we know today as *Blastocystis* sp. was discovered well before its first description in the literature (1). Throughout history, researchers have reported that hollow spherical cells are prevalent in fecal samples from humans and animals, very similar to artifacts and degraded cells. The first accepted description of *Blastocystis* sp. was published by Alexeieff (2), when cells from animal fecal isolates resembled the fungus of the genus *Blastomyces* (Greek 'kystis': cyst) (3). Even 100 years after this first description, the real clinical and biological importance of this enigmatic protist is poorly understood.

Currently, it is classified as a protist member of the phylum Stramenopiles (4,5). It is known that this organism has a worldwide distribution, infecting more than one billion individuals (6,7). *Blastocystis* is genetically diverse, with 17 subtypes (ST1–ST17) based on polymorphic regions of its small subunit of the ribosomal RNA gene (SSU-rDNA) (7–10). Some of these subtypes are found in different hosts, but others are exclusively found in humans (8,10). Humans serve as hosts for nine subtypes (ST1–ST9), with ST3 being the most prevalent, followed by ST1, ST2, and ST4 (7,9). Several studies have identified *Blastocystis* subtypes in Brazil. Among these, it was observed that the distribution of this genus in Brazil follows the world standard, with the high prevalence of ST3, ST1, and ST2, in addition to the occurrence of subtypes rarely found in humans, such as ST6, ST7, and ST8 (11–14).

In Brazil, the first specific study of *Blastocystis* sp. was carried out by Guimarães and Sogayar (15). In this study, the high positivity of this organism was demonstrated by parasitological methods in children and daycare center workers. Over the years, new studies have been developed with the main objective of detecting intestinal parasites, confirming the high positivity rate of *Blastocystis* sp. (11–19). However, the importance of this organism remains to be determined. The present study aimed to evaluate the occurrence of *Blastocystis* sp. in Brazilian studies over a period of 20 years (2000-2020), as well as point out some relevant aspects of this mysterious organism.

METHODS

We conducted a comprehensive and descriptive literature search regarding the occurrence of *Blastocystis* sp. using

Copyright © 2021 **CLINICS** – This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium or format, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

Received for publication on October 19, 2020. **Accepted for publication on** May 31, 2021

DOI: 10.6061/clinics/2021/e2489

Capítulo I

parasitological and molecular techniques in Brazil. We performed a literature search in six international databases: US National Library Online (PubMed), Scientific Electronic Library Online (SciELO), Web of Science, Science Direct, Scopus, and Google Scholar, in order to obtain the maximum number of relevant studies for the scope of this review. The literature search process used the keywords terms: "parasite," "intestinal parasite," "*Blastocystis*" and "Brazil," alone or in combination with "AND." As inclusion criteria, we used original research papers or short communications reporting the occurrence of *Blastocystis* sp. from Brazil published online in English and Portuguese in the last 20 years (2000–2020). Studies published before 2000, those that did not report the occurrence of *Blastocystis* sp., and those that were not published in English or Portuguese were excluded.

Various characteristics, including first author, year of publication, region, state, population, diagnostic method, sample size, and positivity for *Blastocystis* sp. in each article included in this study were extracted and recorded using Excel software (Microsoft, Redmond, WA, USA). The data were divided into diagnostic by parasitological and molecular techniques, and relevant aspects.

RESULTS AND DISCUSSION

After applying the inclusion and exclusion criteria, 52 studies were included in the final analysis to estimate the occurrence and molecular identification of *Blastocystis* sp. in Brazil between 2000 and 2020.

Detection of *Blastocystis* sp. by parasitological techniques

Considering the parasitological diagnosis, the number of studies that reported positivity for *Blastocystis* sp. varied between the different regions of Brazil (Table 1) (20–64), with the Southeast region contributing 26 studies, followed by the South region with 11, the North region with 7, the Midwest region with 5, and the Northeast with 3. It is worth mentioning that of the studies included, only nine had the specific objective of searching for *Blastocystis* sp. in fecal samples.

The occurrence of *Blastocystis* sp. in Brazil ranged from 0.5% to 86.6% (median, 23 ± 21), as per the use of parasitological techniques (Table 1). It can be seen that the highest occurrence rate was in the north (27.3 ± 22.4), followed by the southeast (24.5 ± 23.8), south (22.2 ± 13.7), northeast (16.9 ± 20.2), and midwest regions (13.4 ± 17.6) (Figure 1).

In general, several techniques are employed for parasitological diagnosis, such as direct examination, spontaneous sedimentation, concentration techniques on formaldehyde-ether, and permanently stained smears (8,29,65–67). Of the evaluated studies, the most commonly used concentration techniques were the spontaneous sedimentation method (33/52) or centrifugation sedimentation (37/52). It is noteworthy that methods that require the addition of water or a preservative solution, with a centrifugation step, can destroy the structure of this organism, resulting in false-negative results (68). It is observed that the positivity for *Blastocystis* sp., considering the concentration methods, was quite variable, from 0.5 to 63.1% (28,39,51). Some authors claim that preservative solutions and centrifugation can assist in obtaining *Blastocystis* forms, even facilitating their visualization (29).

It can be observed that the results for *Blastocystis* sp. detection differed in various studies, for example, in studies using the TF-Test kit for parasitological determination (18,30,31). These discrepancies may be due to differences in the regions and populations studied, since Brazil is a country with diverse regional differences, especially in terms of climate and socioeconomic factors.

The most appropriate methods for diagnosis are *in vitro* cultures and permanent-stained smears, which enable the better visualization of, and differentiation between, different *Blastocystis* sp. forms, but require more time for implementation (8,29,66,68–71). Of the studies evaluated, a few studies used permanent stained smears (19/52) and only two studies used *in vitro* cultures as diagnostic techniques. It was observed that the average *Blastocystis*-positivity rate (22.1 ± 18.1) of these studies was not greater considering the average occurrence rate of this organism in Brazil. However, we can consider the best visualization of the forms, which considerably facilitates the identification of this organism. Nevertheless, recent studies (19,40) have shown similar results with regard to comparing the *in vitro* culture methods with the spontaneous sedimentation technique. It is interesting to note that in many of the studies evaluated herein, permanent stains were used to stain the sediments resulting from *in vitro* cultures (12,19), and not as an initial choice of technique after obtaining a smear from the fresh fecal sample.

The studies whose main objective was to evaluate the occurrence of *Blastocystis* in different fecal samples showed a positivity rate that ranged from 17.8 to 55.8% (Table 1). Of these, only two used permanently stained smears as a technique for parasitological diagnosis (19,49).

Important aspects related to the parasitological diagnosis of *Blastocystis* sp. First, it is known that the use of preservative solution in the fecal sample, associated with the choice of techniques for the detection of this parasite in routine laboratory settings, may result in an underestimation of the real number of positive samples. In addition, this method of diagnosis requires considerable technical expertise to recognize the different forms of this organism. Conversely, the high number of positive parasitological results for *Blastocystis* has attracted the attention of several researchers. This fact allows us to question whether this high number represents the real occurrence of *Blastocystis*, especially in view of the difficulty of its morphological identification (6). It also allows us to question the implications of this high positivity rate.

The great diversity of the collected data leads to a discussion and superficial analysis of the results. Moreover, it is noteworthy that most studies aimed to evaluate the overall occurrence of intestinal parasites, which makes the effective determination of its real prevalence difficult, especially with regard to the techniques of choice for the parasitological diagnosis of *Blastocystis* sp.

Detection of *Blastocystis* sp. by molecular techniques

We must emphasize that in most studies carried out in Brazil and cited here, molecular techniques were not used for molecular diagnosis, but instead, as tools for identifying *Blastocystis* subtypes present in samples that were previously reported to be positive for *Blastocystis* sp. based on parasitological techniques. The amplification of specific DNA from stool samples has allowed for new perspectives on the laboratory diagnosis of *Blastocystis* sp., mainly due to the high sensitivity and specificity of molecular techniques (6). However, the use of molecular techniques in all studies is sometimes difficult because of their high cost.

Capítulo I

Table 1 - Occurrence of *Blastocystis* sp. in fecal samples in humans based on the parasitological methods used, the region and state in Brazil, and the population studied (2000–2020).

Region	State	Population	Parasitological techniques	No. positive %	Reference
South	PR	Children	R, PS	8.9	Oishi et al. (20)
		All	R, KK, PS	28.2	Segui et al. (14)
		Children	R	31.8	Segui et al. (21)
		All	SS, R, PS	28.2	Takizawa et al. (22)
		Adult	SS, BM, F, PS	20.9	Kulik et al. (23)
		All	D, R, F, PS	26.5	Nascimento and Moitinho (24)
	SC	Children	SS, F, PS	40.4	Santos et al. (25)
		Children	D, SS, R	4.0	Batista et al. (26)
		Adult	SS, BM, F, G	14.3	Nolla et al. (27)
		Children	SS, F	0.5	Quadros et al. (28)
	RS	ND	SS, R, PS	40.0	Eymael et al. (29)
Southeast	SP	Children	TF	69.6	Santos et al. (30)
		All	TF	66.6–86.6	Rebolla et al. (18)
		All	D, F, PS	7.9	David et al. (12)
		Children	F, TF, PS	1.2	David et al. (30)
		All	D, SS, BM, F, PS	4.6	Miné and Rosa (32)
		All	R, BM, KK, PS	12.1	Anaruma Filho et al. (33)
		All	D, BM, F, KK	16.7	Martins et al. (34)
		Children	SS, R, F, PS	14.3	Carvalho et al. (35)
		Children	SS, R, PS	1.6	Carvalho-Almeida et al. (36)
		Children	D, SS, F	38.3	Amato Neto et al. (37)
	RJ	All	SS, F, IC	55.8	Barbosa et al. (19)
		Adult	SS, BM	41.2–45.2	Gama et al. (38)
		All	BM, F, KK	12.7	Faria et al. (39)
		All	SS, IC	27.0–35.5	Valença-Barbosa et al. (40)
		Children	SS, R, BM, F	3.8	Torres de Freitas et al. (41)
		All	SS, BM	6.7	Macedo et al. (42)
		All	R, PS	4.4–8.7	Silva-Neto et al. (43)
		All	SS, R, BM, F	6.1	Uchôa et al. (44)
		Children	D, R, PS	1.4	Carvalho-Costa et al. (45)
		Children	R	7.6	Pinheiro et al. (46)
		Adult	SS, BM, F	12.1	Port Lourenço et al. (47)
		All	SS, BM, F, PS	1.1	Uchoá et al. (48)
	MG	All	D, R, PS	17.8	Cabrine-Santos et al. (49)
		Adult	R	24.5–41.9	Gil et al. (17)
		All	R	22.4	Gil et al. (50)
		All	R, KK	63.1	Martins et al. (51)
Midwest	MS	Adult	SS, R	3.9	Curval et al. (52)
		All	SS	40.9	Aguiar et al. (53)
	MT	Children	SS, PS	0.5	Luz et al. (54)
		All	SS, R	21.0	Malheiros et al. (11)
	GO	Adult	SS, BM, F, PS	0.5	Souza Junior et al. (55)
North	AM	All	SS, TF	43.4	Gonçalves et al. (56)
		All	SS	0.7	Visser et al. (57)
		All	R, BM, KK, PS	39.1	Carvalho-Costa et al. (58)
	PA	All	SS, KK	5.2	Cardoso et al. (59)
		All	D, SS	37.3	Loureiro et al. (60)
		All	D, SS, F, PS	57.8	Borges et al. (16)
	RO	All	R, F	7.7	Palhano-Silva et al. (61)
Northeast	SE	Children	R	40.1	Oliveira et al. (62)
	PE	Adult	R, BM, PS	7.3	Arcoverde et al. (63)
	PI	All	SS	3.4	Alves et al. (64)

ND, no date; parasitological techniques, D, direct method; SS, spontaneous sedimentation method; R, centrifugation sedimentation; BM, Baermann-Moraes method; F, flotation concentration; KK, Kato-Katz method; IC, *in vitro* culture; TF, TF-test kit; HM, Harada-Mori method; G, Graham method; PS, permanent-stained smears. PR, Paraná; SC, Santa Catarina; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo; RJ, Rio de Janeiro; MG, Minas Gerais; MS, Mato Grosso do Sul; MT, Mato Grosso; GO, Goiás; AM, Amazonas; PA, Pará; RO, Rondonia; SE, Sergipe; PE, Pernambuco; PI, Piauí.

Till date, in Brazil, only 10 studies have employed molecular techniques and these are concentrated in the southeast region. Of these, only Silva et al. (72) reported the use of PCR as a diagnostic method (16.0%) for *Blastocystis* sp. in fecal samples from transplant candidates. Other studies used PCR only after confirmation of the positive parasitological diagnosis, with the aim of the molecular characterization of *Blastocystis* subtypes in the samples.

Molecular methods are commonly used to identify and determine the distribution of different subtypes of *Blastocystis* sp. (73). As a result, aspects that remain unknown, especially, epidemiological and pathological characteristics,

Capítulo I

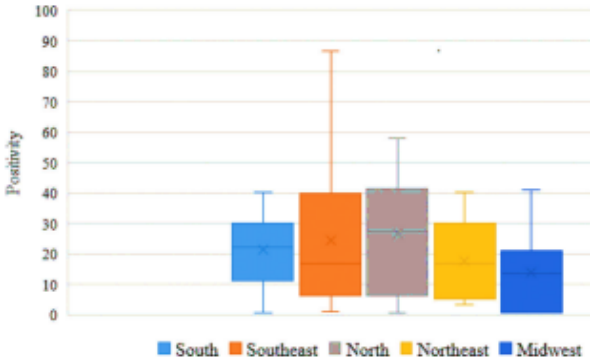

Figure 1 - Occurrence of *Blastocystis* sp. in fecal samples in humans based on the parasitological methods used for their detection and the region in Brazil (2000–2020).

have been noted. It is currently known that the genus *Blastocystis* is composed of 17 subtypes (ST1–ST17) that can infect human and non-human hosts (9,10). We highlight that the first study characterizing *Blastocystis* subtypes carried out in Brazil was by Malheiros et al. (11), who analyzed the fecal samples of indigenous people from the Mato Grosso State.

The distribution of *Blastocystis* subtypes in Brazil is shown in Table 2 (11–14,19,20,40,72,74,75); ST3 showed the highest average positivity rate (38.5 ± 11.4), followed by ST1 (35.0 ± 9.1) and ST2 (16.2 ± 8.4). These data confirm the findings from previously published international literature, which shows that more than 90% of isolates in humans belong to four subtypes (ST1, ST2, ST3, and ST4) (7,9), while the others occur more frequently in animals (7,8). Mixed infections were demonstrated in five studies, which showed an average positivity rate of 3.4% ± 4.9. Several reports in the current literature indicate the occurrence of mixed infections.

Different primers have been described for the detection of *Blastocystis* sp. DNA, considering the analysis of *Blastocystis* SSU-rDNA. Initially, specific primers were used for each subtype (76,77), followed by a primer-called pan-*Blastocystis* barcode (78). Although this barcode region is the most used, other initiators have been proposed, especially in several studies carried out in Brazil (19,40). Harmonization of the current nomenclature used in this field has been proposed to facilitate the comparison and characterization of various *Blastocystis* subtypes in different studies (10).

With the growing number of studies, *Blastocystis* subtypes that had not been described in Brazil have recently been identified. In this context, we can mention that ST4, which was considered to be restricted to Europe (79), has recently been described in four studies in Brazil (14,19,40,74); ST4 has been associated with the presence of symptoms of *Blastocystis* infection (79). In addition, ST7 (12,72,75) and ST8 (14,19) have been reported in the southeast and southern regions of Brazil.

Although molecular PCR has clearly enabled further improvements in diagnostic and epidemiological studies, its successful application depends on understanding the limitations and assumptions associated with its use (31). In this regard, DNA extraction from fecal samples, the choice of a suitable primer, and obtaining viable sequences should be considered important limitations associated with the use of PCR-based methods (80).

Although the subtypes of *Blastocystis* sp. present great genetic variability, it is not known whether this can influence factors related to the host (70). This variability has been demonstrated in studies conducted in Brazil and may explain the pathology of this organism (8,67,73). Among the studies evaluated, only a few addressed the pathological aspects related to the presence of this organism. Melo et al. 2019 (74) reported the occurrence of *Blastocystis* sp. in patients with chronic urticaria; however, the absence of a control group compromises the conclusions drawn.

It is important to highlight the recent approach followed in *Blastocystis*-related studies with regard to its presence in the intestinal microbiota and the possible pathological implications of this phenomenon (10,81). However, no study in Brazil has evaluated this issue yet.

RELEVANT ASPECTS

The fecal-oral route of transmission and its survival capacity in different organisms, such as humans and animals, likely explains the global distribution of *Blastocystis* (10). In addition, the American continent is now considered to have ideal conditions for the high prevalence of this organism, such as increased rates of poverty, inadequate sanitation, and lack of potable water in many regions (10).

It is common to evaluate different environmental samples with the expectation of a transmission link between intestinal parasites and the environment. In studies carried out in Brazil, the high positivity rate of *Blastocystis* in natural water sources (82) and in plants sold in markets (83) was noted. This reinforces the need for monitoring parasite contamination and the importance of educational campaigns.

Another pertinent issue when considering this organism is the possibility of zoonotic transmission. Research reinforces the need for the investigation of *Blastocystis* sp. in samples of wild and domestic animals (84,85). Data concerning the occurrence of its subtypes in humans and animals in Brazil are limited. From the evaluated studies, it was possible to identify ST1–5 and ST8 in samples from non-human hosts (40,75,86). We believe that new studies can determine the origin of these subtypes and the relationship between humans and animals with regard to harboring this organism.

An interesting point to address is the different epidemiological patterns of the colonization and/or infection of this

Capítulo I

Table 2 - Occurrence of the subtypes of *Blastocystis* sp. human fecal samples based on the region and state in Brazil and the primers used.

Region	State	Primers	Subtypes (%)												Reference
			ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	mixed STs	non-identified ST		
South	PR	pan-*Blastocystis* barcode	36.4	21.2	39.4	-	-	-	-	-	-	3.0	-		Oishi et al. (20)
		pan-*Blastocystis* barcode	36.3	15.7	41.2	2.9	-	1.0	-	2.9	-	-	-		Segui et al. (14)
Southest	SP	pan-*Blastocystis* barcode	37.5	12.5	45.8	-	-	-	4.2	-	-	-	-		Silva et al. (72)
		pan-*Blastocystis* barcode	25.0	17.8	28.5	21.4	-	3.6	-	-	-	3.6	-		Melo et al. (74)
		pan-*Blastocystis* barcode	54.4	7.0	33.3	-	-	-	5.3	-	-	-	-		Oliveira-Arbex et al. (75)
		pan-*Blastocystis* barcode	22.5	12.5	60.0	-	-	5.0	-	-	-	-	-		Melo et al. (13)
		pan-*Blastocystis* barcode	34.3	10.5	43.2	-	-	3.0	6.0	-	-	3.0	-		David et al. (12)
	RJ	Blast 505-532/Blast 998-1017	27.0	27.0	34.0	3.5	-	-	-	7.0	-	-	1.17		Barbosa et al. (19)
		Blast 505-532/Blast 998-1017	35.9	6.2	42.2	1.6	-	-	-	-	-	14.1	-		Valença-Barbosa et al. (40)
Midwest	MT	pan-*Blastocystis* barcode	41.0	32.0	17.0	-	-	-	-	-	-	10.0	-		Malheiros et al. (11)

PR, Paraná; SP, São Paulo; RJ, Rio de Janeiro; MT, Mato Grosso.

organism. Although there is evidence that some subtypes may be related to clinical manifestations, the studies presented in Brazil are still inconclusive (74), mainly due to the high proportion of asymptomatic carriers (12,72). Information regarding the variation in the distribution of subtypes in Brazil has only just begun to emerge, and there are still major gaps to be filled. Thus, new studies on the molecular epidemiology of *Blastocystis* can help improve the knowledge about the pathogenicity of its infection.

CONCLUSION

The history of research regarding *Blastocystis* sp. exposes much uncertainty regarding its biological and pathogenic aspects. This observation reflects the reality of Brazil; thus, we believe that the effectiveness of parasitological diagnosis should be considered with regard to making an appropriate choice of technique for detecting *Blastocystis* sp. Thus, based on our review, we suggest the use of fresh fecal smears, followed by permanent staining, to increase the effectiveness of the results. It should be remembered that Brazil is a country with wide regional and dimensional variations, in addition to socioeconomic factors that can directly affect the positivity rate of *Blastocystis*.

Additionally, we emphasize the importance of further studies in the context of molecular epidemiology, particularly in increasing knowledge about the genetic diversity of *Blastocystis* sp. This would improve the elucidation of the biological and pathological aspects regarding this genus that remain unclear. *Blastocystis* sp. is an important organism, and further studies will work toward answering the many questions that studies regarding this genus have brought about so far.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant N° 2015/18213-6) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES grant N° 1749729).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Melo GB and Paula FM contributed to the conception and design of the study. Melo GB and Bosqui LR performed the literature search. Melo GB and Paula FM wrote the manuscript. Melo GB, Paula FM, Bosqui LR, Costa IN and Gryschek RCB reviewed and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*--past and future. Clin Microbiol Rev. 1991; 4(1):61-79. https://doi.org/10.1128/CMR.4.1.61
2. Alexeieff A. Sur la nature les formations dites "Kystes de *Trichomonas intestinalis*". C R Soc Biol (Paris). 1911;71:296-8.
3. Mehlhorn H, Tan KS, Yoshikawa H. *Blastocystis*: Pathogens or passenger? An evaluation of 101 years of research. Trop Parasitol. 2016;6(2):163-4. https://doi.org/10.4103/2229-5070.190838
4. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(1):42-53. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00339.x
5. Hoevers JD, Snowden KF. Analysis of the ITS region and partial ssu and lsu rRNA genes of *Blastocystis* and *Protenromonas lacertae*. Parasitology. 2005;131(Pt 2):187-96. https://doi.org/10.1017/S0031182005007596
6. Stensvold CR. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. Trop Parasitol. 2013;3(1):26-34. https://doi.org/10.4103/2229-5070.113896

Capítulo I

7. 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. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.011
8. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):639-65. https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08
9. 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. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.017
10. Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. Parasit Vectors. 2019;12(1):376. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3641-2
11. 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):1050-3. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0481
12. David ÉB, 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. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0714-8
13. 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:e3. https://doi.org/10.1017/pao.2017.3
14. Seguí R, Muñoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Köster PC, de Lucio A, et al. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. Parasit Vectors. 2018;11(1):490. https://doi.org/10.1186/s13071-018-3054-7
15. Guimarães S, Sogayar ML. *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(3):427-9. https://doi.org/10.1590/S0074-02761993000300012
16. Borges JD, Alarcón RS, Neto VA, Gakiya E. [Intestinal parasitosis in Indians of the Mapuera community (Oriximiná, State of Pará, Brazil): high prevalence of *Blastocystis hominis* and finding of *Cryptosporidium* sp and *Cyclospora cayetanensis*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(3):348-50. https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000300022
17. Gil FF, Barros MJ, Macedo NA, Júnior CG, Redoan R, Busatti H, et al. Prevalence of intestinal parasitism and associated symptomatology among hemodialysis patients. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55(2):69-74. https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000200001
18. 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. https://doi.org/10.1590/s1678-9946201658031
19. Barbosa CV, Barreto MM, Andrade RJ, Sodré F, d'Avila-Levy CM, Peralta JM, et al. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. PLoS One. 2018;13(3):e0193860. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193860
20. Oishi CY, Klisiowicz DDR, Seguí R, Köster PC, Carmena D, Toledo R, et al. Reduced prevalence of soil-transmitted helminths and high frequency of protozoan infections in the surrounding urban area of Curitiba, Paraná, Brazil. Parasite Epidemiol Control. 2019;7:e00115. https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00115
21. Seguí R, Klisiowicz D, Oishi CY, Toledo R, Esteban JG, Muñoz-Antoli C. Intestinal symptoms and *Blastocystis* load in schoolchildren of Paranaguá Bay, Paraná, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2017;59:e86. https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759086
22. Takizawa Md, Falavigna DL, Gomes ML. Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, Southern Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009;51(1):31-5. https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000100006
23. Kulik RA, Falavigna DL, Nishi L, Araujo SM. *Blastocystis* sp. and other intestinal parasites in hemodialysis patients. Braz J Infect Dis. 2008;12(4):338-41. https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000400017
24. Nascimento SA, Moitinho Mda L. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga City, Paraná State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005;47(4):213-7. https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000400007
25. Santos J, Duarte ARM, Gadotti G, Lima LM. Parasitoses intestinais em crianças de creche comunitária em Florianópolis, SC, Brasil. Rev Patol Trop. 2014;43(3):332-40. https://doi.org/10.5216/rpt.v43i3.32201
26. Batista T, Trevisol FS, Trevisol DJ. Parasitoses intestinais em pré-escolares matriculados em creche filantrópica no sul de Santa Catarina. Arq Catarin Med. 2009;38(3):39-45.
27. Nolla AC, Cantos GA. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil [Relationship between intestinal parasites in food handlers and epidemiological factors in the city of Florianópolis, Santa Catarina, Brazil]. Cad Saude Publica. 2005;21(2):641-5. https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000200033
28. Quadros RM, Marques S, Arruda AA, Delfes PS, Medeiros IA. Parasitas intestinais em centros de educação infantil municipal de Lages, SC, Brasil [Intestinal parasites in nursery schools of Lages, southern Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37(5):422-3. https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000500012
29. Eymael D, Schuh GM, Tavares RG. Padronização do diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas de coloração [Standardization of *Blastocystis hominis* diagnosis using different staining techniques]. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(3):309-12. https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000300019
30. Santos BM, Soares FA, Rosa SL, Gomes DCF, Suzuki CTN, Nagata WB, et al. A study of intestinal parasites in children of an urban region with excellent sanitary condition reveals high occurrence of *Blastocystis* spp. Rev Patol Trop. 2017;46(4):321-30. https://doi.org/10.5216/rpt.v46i4.51016
31. David EB, Coradi ST, Oliveira-Sequeira TCG, Ribolla PEM, Katagiri S, Guimarães S. Diagnosis of *Giardia* infections by PCR-based methods in children of an endemic area. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2011;17(2):209-15. https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000200012
32. 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. https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000600004
33. Anaruma Filho F, Corrêa CRS, Ribeiro MCSA, Chieffi PP. Parasitoses intestinais em áreas sob risco de enchente no município de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. Rev Patol Trop. 2007;36(2):159-69. https://doi.org/10.5216/rpt.v36i2.1805
34. Martins LPA, Serapião AATB, Valenciano RF, Pires JEC, Castanho REP. Frequência de *Blastocystis hominis* e outras enteroparasitoses em amostras fecais analisadas no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Marília-SP. Rev Patol Trop. 2007;36(1):47-53. https://doi.org/10.5216/rpt.v36i1.1815
35. de Carvalho TB, de Carvalho LR, Mascarini LM. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006;48(5):269-73. https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000500006
36. Carvalho-Almeida TT, Pinto PL, Quadros CM, Torres DM, Kanamura HY, Casimiro AM. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006;48(1):27-32. https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000100006
37. Amato Neto V, Rodriguez Alarcon RS, Gakiya E, Ferreira CS, Bezerra RC, dos Santos AG. Elevada porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo, SP [Blastocystosis: a high proportion of cases found in schoolchildren of São Paulo, State of São Paulo, Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37(4):354-6. https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000400013
38. Gama NA, Adami YL, Lugon JR. Assessment of *Blastocystis* spp. infection in hemodialysis patients in two centers of the metropolitan area of Rio de Janeiro. J Kidney Treat Diagn. 2018;1(2):49-52.
39. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, de Freitas MB, Almendra R, et al. Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(3):e0005445. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005445
40. Valença Barbosa C, de Jesus Batista R, Pereira Igreja R, d'Avila Levy CM, Werneck de Macedo H, Carneiro Santos HL. Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. Parasit Vectors. 2017;10(1):518. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2458-0
41. Freitas JT, Matos JS, Scarabeli SC, Fonseca ABM, Barbosa AS, Bastos OMP, et al. Intestinal parasites in children with neurological disorders treated at a rehabilitation institution in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. Rev Patol Trop. 2017;46(2):171-84. https://doi.org/10.5216/rpt.v46i2.47482
42. Macedo HW, Gonçalves AMH, Almeida CB, Dias LVB, Muniz MF. Infecção por *Blastocystis hominis* e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em pacientes atendidos em um hospital localizado em Niterói, Rio de Janeiro. Rev Patol Trop. 2010;39(1):56-62. https://doi.org/10.5216/rpt.v39i1.9499
43. Silva-Neto LM, Oliveira RV, Laggagio V, Camillo-Coura LC, Zanini GM. Ocorrência de *Blastocystis hominis* e outros parasitos intestinais em uma comunidade de Paracambi-RJ no período de abril a junho de 2005. Rev Patol Trop. 2010;39(2):105-13. https://doi.org/10.5216/rpt.v39i2.10729
44. Uchôa CM, Albuquerque MC, Carvalho FM, Falcão AO, Silva P, Bastos OM. Parasitismo intestinal em crianças e funcionários de creches comunitárias na cidade de Niterói-RJ, Brasil. Rev Patol Trop. 2009;38(4):267-78. https://doi.org/10.5216/rpt.v38i4.8590

Capítulo II

Relatório atualizado sobre *Blastocystis* sp. em um hospital universitário do Brasil: uma experiência retrospectiva de 6 anos

(Updated report of Blastocystis sp. in a teaching hospital of Brazil: a 6-year retrospective experience)

O manuscrito será submetido ao periódico *Clinics.*

ARTIGO ORIGINAL

Relatório atualizado sobre *Blastocystis* sp. em um hospital universitário do Brasil: uma experiência retrospectiva de 6 anos

Gessica Baptista de Melo,[I] Marcelo Alves Ferreira[II] , Vera Lucia Pagliusi Castilho,[III] Elenice Messias do Nascimento Gonçalves, [III] Ronaldo Cesar Borges Gryschek, [I] Fabiana Martins de Paula, [I]

[I] Laboratório de Investigação Médica (LIM06-Laboratório de Imunopatologia da Esquistossome), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.

[II] Laboratório de Investigação Médica (LIM 59- Laboratório de Biologia Celular), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.

[III] Seção de Parasitologia, Divisão do Laboratório Central, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.

*Autor correspondente: E-mail: fabiana.paula@hc.fm.usp.br

ORCID ID

Gessica Baptista de Melo (0000 0002 1265 5667), Marcelo Alves Ferreira (0000-0003-4181-760), Vera Lucia Pagliusi Castilho (0000-0003-3109-9704), Elenice Messias do Nascimento Gonçalves (0000-0002-7922-5776), Fabiana Martins de Paula (0000 0003 3343 0149) and Ronaldo Cesar Borges Gryschek (0000 0003 2227 3037)

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Melo GB e Paula FM contribuíram para a concepção e desenho do estudo. Castilho VLP e Gonçalves EMN realizaram a busca dos resultados clínicos. Ferreira MA realizou análise estatística. Melo GB e Paula FM redigiram o manuscrito. Melo GB, Paula FM, Ferreira MA, Castilho VLP, Gonçalves EMN e Gryschek RCB revisaram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

RESUMO

Mesmo diante de tantos avanços nos estudos já descritos, alguns fatores biológicos e clínicos, além da real prevalência de *Blastocystis* sp., permanecem por serem totalmente esclarecidos. Estima-se que esteja presente na maioria das populações ao redor do mundo. Consequentemente, o número de estudos com intuito de mensurar a ocorrência de *Blastocystis* sp. em diferentes populações tem aumentado de maneira considerável. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Blastocystis* sp. nos exames parasitológicos de rotina de pacientes encaminhados ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP), durante o período de 2016 a 2021. Os resultados dos exames parasitológicos revelaram que *Blastocystis* sp. foi observado em 69,6% das amostras de fezes. Em relação a procedência dos pacientes, a maioria era procedente do município de São Paulo (55,6%), seguido pela grande São Paulo (31,6%) e outras localidades (12,8%). Quanto a positividade por regiões do município de São Paulo, observamos que a região oeste apresentou maior ocorrência. Considerando o maior número de solicitações por parte do Instituto Central do Hospital das Clínicas (ICHC), os indivíduos foram encaminhados por diferentes ambulatórios, com maior frequência pelos serviços de transplantes de órgãos (28,4%), Ambulatório de Dermatologia (11,5%), Gastroenterologia (10,9%) e Moléstias infecciosas (7,7%). Com isso, o presente estudo evidencia a alta positividade para *Blastocystis* sp. em amostras analisadas no HC-FMUSP, e reforça a necessidade do entendimento da importância desse achado no contexto da saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: *Blastocystis* sp.; Ocorrência; Hospital universitário; Brasil.

INTRODUÇÃO

Blastocystis sp. é um protista entérico intestinal que pertence ao filo Stramenopiles[1], considerado um dos organismos mais prevalentes em amostras fecais humanas[2-5]. Adicionalmente, até o presente, foram descritos 28 subtipos geneticamente distintos (ST1-ST17, ST21, ST23-ST29 e ST30-ST32) isolados de humanos e não humanos[2,6-8]. Existe um crescente número de estudos sobre a prevalência, distribuição de subtipos e associação com a microbiota, além do potencial em causar doença[2,9,10]. No entanto, muitas questões permanecem sem solução, pois os resultados relatados diferem amplamente de acordo com a seleção e a estratégia de amostragem, método de diagnóstico e de subtipagem[10].

Estima-se que mais de um milhão de pessoas sejam positivas para *Blastocystis* sp. ao redor do mundo variando de região para região, de acordo com as condições higiênico-sanitárias[2,9,11]. Em recente revisão da literatura[12], a ocorrência de *Blastocystis* sp. no Brasil varia de 0,5% a 86,6%, considerando o diagnóstico por técnicas parasitológicas. Apesar de vários estudos terem sido realizados no estado de São Paulo, nenhum abordou a frequência de *Blastocystis* sp. em amostras de pacientes do Hospital das Clinicas da Faculadade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a positividade para *Blastocystis* sp. nos exames parasitológicos de rotina realizados pela Seção de Parasitologia, da Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP, durante o período de 2016 a 2021.

MATERIAIS E MÉTODOS

Declaração de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP (nº 3.325.341).

Área de estudo

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

(HC/FMUSP) é um complexo hospitalar da cidade de São Paulo e autarquia estadual especial, vinculada à Secretaria de Estado da Saúde para coordenação administrativa. Em adição, é vinculado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para fins de ensino, pesquisa e prestação de ações, e serviços de saúde de alta complexidade voltados às pessoas de diferentes regiões do Brasil.

Banco de dados

Trata-se de um estudo de análise descritiva retrospectiva realizado com a colaboração da Seção de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central (SPD-DLC, HC/FMUSP). Foi criado um banco de dados com as informações dos resultados dos exames parasitológicos de fezes registrados entre 1º de janeiro de 2016 e 31 de dezembro de 2021. As técnicas realizadas na SPD-DLC para a emissão do resultado parasitológico de fezes são método de Lutz, Faust, coloração permanente por Trichrome e Leishman[13].

Foram analisadas entre 2016 e 2021, pela SPD-DLC, 15,438 amostras de fezes procedentes de 8.561 pacientes; os indivíduos com vários resultados parasitológicos foram incluídos uma única vez na análise, considerando-se somente a primeira amostra. Desse total foram incluídos 500 prontuários randomizados (amostra aleatória de 500 prontuários objetivando o poder de teste igual a 0,8 na análise). Os dados dos indivíduos como sexo, idade, local de residência, Serviço de Referência e resultado parasitológico foram anonimizados, e registrados neste banco de dados.

Análise estatística

As variáveis categóricas foram comparadas pelo utilizando o teste $\chi 2$ de Pearson. Uma probabilidade (P) com valores inferiores ou iguais a 0,05 foi considerada estatisticamente significativa. O poder de teste atingido com a amostra utilizada foi de 0,799 e o tamanho do efeito (ω) foi de 0,16. Todas as análises estatísticas foram realizadas na plataforma R para programação estatística (versão 4.1.2).

RESULTADOS

Em relação aos anos analisados, a distribuição de resultados não foi homogênea (Tabela 1, Figura 1). Porém, o conjunto dos dados demonstra um pequeno aumento no número de exames parasitológicos realizados nos anos de 2017 a 2020.

Na Tabela 1, estão apresentados os dados demográficos, localidade e serviço solicitante dos prontuários incluídos no estudo. Do total de indivíduos, 285 (57,0%) e 215 (43,0%) eram do sexo feminino e masculino, respectivamente, com idade variando de menor que um ano até 92 anos (39,6 ± 22,2). Os resultados dos exames parasitológicos revelaram que *Blastocystis* sp. foi observado em 69,6% (348) das amostras de fezes. Não houve diferença estatística significativa entre sexo e positividade por *Blastocystis* (p=0,3622). Em relação à idade, a média entre os positivos foi de 41,2 ± 21,0 e entre os negativos foi de 35,9 ± 24,4 (p =0,0316). Além de *Blastocystis* sp. foram observadas outras espécies de parasitas intestinais, como: *Entamoeba histolytica*/*dispar*, *Giardia intestinalis* e *Crystosporidium* sp.

Em relação à procedência dos pacientes, a maioria habitava no município de São Paulo, com 278 (55,6%), seguido pela grande São Paulo com 158 (31,6%) e outros com 64 (12,8%) (Tabela 1). Não houve diferença na positividade em relação a procedência da amostra (p=0.1862).

Os resultados, considerando as regiões de São Paulo, estão demonstrados na Figura 2. Quando comparamos a positividade nas regiões, observamos que a região oeste apresentou maior frequência de exames positivos, seguida pelas regiões central e leste. No entanto, não foi observada diferença significante entre as regiões da capital paulista quanto a positividade (p=0,1558).

Em relação aos serviços solicitantes, ICR e ICSP apresentaram menor positividade de *Blastocystis* do que o esperado, e INCOR e SAMSS o oposto (Figura 3). Considerando o maior número de solicitações do ICHC, os indivíduos foram encaminhados por diferentes ambulatórios, com maior frequência Serviços de transplantes de órgãos (28,4%), Ambulatório de Dermatologia (11,5%), Gastroenterologia (10,9%) e Moléstias infecciosas (7,7%), destes 64,5% apresentaram resultados positivos para *Blastocystis* sp.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os fatores envolvidos e a consequência da alta frequência de *Blastocystis* sp. no mundo, permanecem por serem esclarecidos[3,14]. Acredita-se que a detecção deste organismo em uma grande proporção de indivíduos saudáveis possa sugerir que *Blastocystis* sp. seja um componente normal da microbiota intestinal[3,4].

Os resultados aqui encontrados confirmam esta alta positividade (69,6%) de *Blastocystis* sp., assim como em outros estudos realizados no estado de São Paulo[15-17]. Em contraste, alguns estudos realizados em diferentes regiões do estado de São Paulo apontam uma positividade média inferior em relação a que observamos em nosso estudo[18-20]. Vale considerar que as técnicas utilizadas para o diagnóstico parasitológico foram diferentes das utilizadas no SPD-DLC. Os nossos achados mostraram que não houve correlação estatística entre a positividade para *Blastocystis* e sexo, ou com idade.

Embora sua patogenicidade não tenha sido cabalmente confirmada, tem-se atribuído a esse agente manifestações clínicas como diarreia, síndrome do intestino irritado e urticária[9,21,22]. Interessante que no presente estudo uma alta proporção dos casos positivos para *Blastocystis* sp. foram procedentes dos ambulatórios de transplante de órgãos, gastroenterologia e dermatologia, fato que pode estar associado a uma maior solicitação de exames parasitológicos nesses serviços, e não com a frequência da infecção propriamente dita. Nosso grupo, avaliando pacientes com urticária oriundos do HC-FMUSP, verificou a alta positividade para *Blastocystis* sp.[23]. Adicionalmente, a literatura tem apontado a alta positividade de *Blastocystis* em indivíduos imunocomprometidos[24,25]. Os achados de Silva et al.[26], avaliando indivíduos candidatos a transplantes atendidos no HC-FMUSP reforçam a necessidade de novos estudos para investigar a presença de *Blastocystis* sp. nessa população.

Com relação a distribuição dos casos positivos e as regiões na cidade de São Paulo, esperava-se que ocorreria uma maior positividade naquelas com menor índice de desenvolvimento humano. No entanto, os presentes resultados não apontaram diferença significativa entre as regiões na cidade.

O presente estudo apresenta limitações, relacionadas com a falta de dados clínicos dos indivíduos, o que impossibilitou estabelecer uma associação da positividade com a presença ou ausência de sintomas.

De forma geral, o conjunto de dados sugere a intensa circulação desse organismo na cidade de São Paulo, apontando que as condições ambientais possam favorecer a sua transmissão, seja por higiene inadequada, seja pelo consumo de água contaminada. Porém não devemos esquecer também da possibilidade de *Blastocystis* sp. constituir parte da microbiota intestinal da maioria dos indivíduos.

Assim o presente estudo aponta a alta positividade para *Blastocystis* sp. em amostras analisadas no HC-FMUSP, e reforça a necessidade do entendimento da importância desse achado no contexto da saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. Nature. 1996;4:380-98.
2. Deng L, Wojciech L, Gascoigne NR, Peng G, Tan KS (2021). New insights into the interactions between Blastocystis, the gut microbiota, and host immunity. PLoS pathogens. 2021;17(2):e1009253.
3. Kurt O, Al FD, Tanyuksel M. Eradication of *Blastocystis* in humans: really necessary for all? Parasitol Int. 2016;65(6):797-801.
4. Scanlan PD. *Blastocystis:* past pitfalls and future perspectives. Trends Parasitol. 2012;28(8):327-34.
5. Tan KS. New insights on classification, identification and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):639-65.
6. Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. Parasites & Vectors. 2019;12(1):1-9.
7. Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, et al. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. Infection, Genetics and Evolution. 2016;41:32-35.
8. 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.
9. Khorshidvand Z, Khazaei S, Amiri M, Taherkhani H, Mirzaei, A. Worldwide prevalence of emerging parasite *Blastocystis* in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis. Microbial pathogenesis. 2021;152:104615.
10. Cinek O, Polackova K, Odeh R, Alassaf A, Kramná L, Ibekwe MU, et al. *Blastocystis* in the faeces of children from six distant countries: prevalence, quantity, subtypes and the relation to the gut bacteriome. Parasites & Vectors. 2021;14(1):1-16.
11. Andersen LOB, Stensvold CR. (2016). *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? Journal of clinical microbiology. 2016;54(3):524-528.
12. Melo GBD, Bosqui LR, Costa IND, Paula FMD, Gryschek RCB. (2021). Current status of research regarding *Blastocystis* sp., an enigmatic protist, in Brazil. Clinics. 2021;76.

13. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. fourth ed. American Society for Microbiology. 2001. Washington, DC.
14. Nieves-Ramirez ME, Partida-Rodriguez O, Laforest-Lapointe I, Reynolds LA, Brown EM, Valdez-Salazar A, et al. Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis* is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. 2018. mSystems 3:e00007-18.
15. Santos BM, Soares FA, Rosa SL, Gomes DCF, Suzuki CTN, Nagata WB, et al. A study of intestinal parasites in children of an urban region with excellent sanitary condition reveals high occurrence of *Blastocystis* spp. Rev Patol Trop. 2017;46(4):321-30.
16. 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.
17. Amato Neto V, Rodríguez Alarcon RS, Gakiya E, Ferreira CS, Bezerra RC, dos Santos AG. Elevada porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo, SP [Blastocystosis: a high proportion of cases found in school children of São Paulo, State of São Paulo, Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37(4):354-6.
18. 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.
19. Miné JC, Rosa JAD. 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. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008;41:565-569.
20. Anaruma Filho F, Corrêa CRS, Ribeiro MCSA, Chieffi PP. Parasitoses intestinais em áreas sob risco de enchente no município de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. Rev Patol Trop. 2007;36(2):159-69.
21. 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.
22. 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. Parasite Vect. 2008;21(1):40.
23. Melo GB, Malta FM, Maruta CW, Criado PR, Castilho VLP, Goncalves EMDN, et al. Characterization of subtypes of *Blastocystis* sp. isolated from patients with urticaria, São Paulo, Brazil. Parasite Epidemiol Control. 2019;7:e00124.
24. Zhang W, Ren G, Zhao W, Yang Z, Shen Y, Sun Y, et al. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* and subtyping of *Blastocystis* in cancer patients: relationship to diarrhea and assessment of zoonotic transmission. Front. Microbiol. 2017;8:1835.
25. Rasti S, Hassanzadeh M, Hooshyar H, Momen-Heravi M, Mousavi SGA, Abdoli A. Intestinal parasitic infections in different groups of immunocompromised patients in Kashan and Qom cities, central Iran. Scand. J. Gastroenterol. 2017;52:738–741
26. Silva MRA, Melo GB, Malta FM, Abdala E, Costa SF, Pierrotti LC, et al. (2020). Subtypes of *Blastocystis* sp. isolated in fecal samples from transplant candidates in São Paulo, Brazil. Parasite epidemiology and control. 2020;8:e00128.

Tabela 1. Dados demográficos dos 500 prontuários incluídos no estudo.

Características		Total	Positivo	Negativo	P value
Sexo N(%)	Feminino	285 (57,0)	203 (70,2)	82 (28,8)	0,3622
	Masculino	215 (43,0)	145 (67,4%)	70 (32,6)	
Idade (média ±DP)	<1 a 92 anos	500	41,2 (±21,0)	35,9 (±24,4)	0,0316
Procedência N(%)	Cidade SP	278 (55,6)	76 (27,3)	202 (72,7)	0,1862
	Grande SP	158 (31,6)	107 (67,3)	51 (32,3)	
	Outras localidades	64 (12,8)	39 (60,9)	25 (39,1)	
Serviço solicitante N(%)	DHAS	2 (0,4)	2 (100)	0	1,3992e-07
	HLS	4 (0,8)	4 (100)	0	
	ICHC	313 (62,6)	229 (73,2)	84 (26,8)	
	ICR	102 (20,4)	50 (49,0)	52 (51,0)	
	ICSP	23 (4,6)	10 (43,5)	13 (56,5)	
	IMREA	1 (0,2)	1 (100)	0	
	INCOR	15 (3,0)	15 (100)	0	
	IOT	6 (1,2)	4 (66,7)	2 (33,3)	
	IPQ	8 (1,6)	8 (100)	0	
	PA	2 (0,4)	2 (100)	0 (0)	
	CACEC	24 (4,8)	23 (95,8)	1 (4,2)	
Ano N(%)	2016	70 (14,0)	41 (58,6)	29 (41,4)	0,02394
	2017	96 (19,2)	70 (72,9)	26 (27,1)	
	2018	101 (20,2)	80 (79,2)	21 (20,8)	
	2019	100 (20,0)	72 (72,0)	28 (28,0)	
	2020	64 (12,8)	44 (68,7)	20 (31,3)	
	2021	68 (13,6)	40 (58,8)	28 (41,2)	

DHAS (Departamento Hospital Auxiliar de Suzano), HLS, ICHC (Instituto Central Hospital das Clínicas), ICR (Instituto da Criança e do Adolescente), ICSP (Instituto do Câncer do estado de São Paulo), IMREA (Instituto de Medicina Física e Reabilitação), INCOR (Instituto de Coração), IOT (Instituto de Ortopedia e Traumatologia), IPQ (Instituto de Psiquiatria), PA (Pronto Atendimento), CACEC (Centro de Atendimento ao Colaborador).

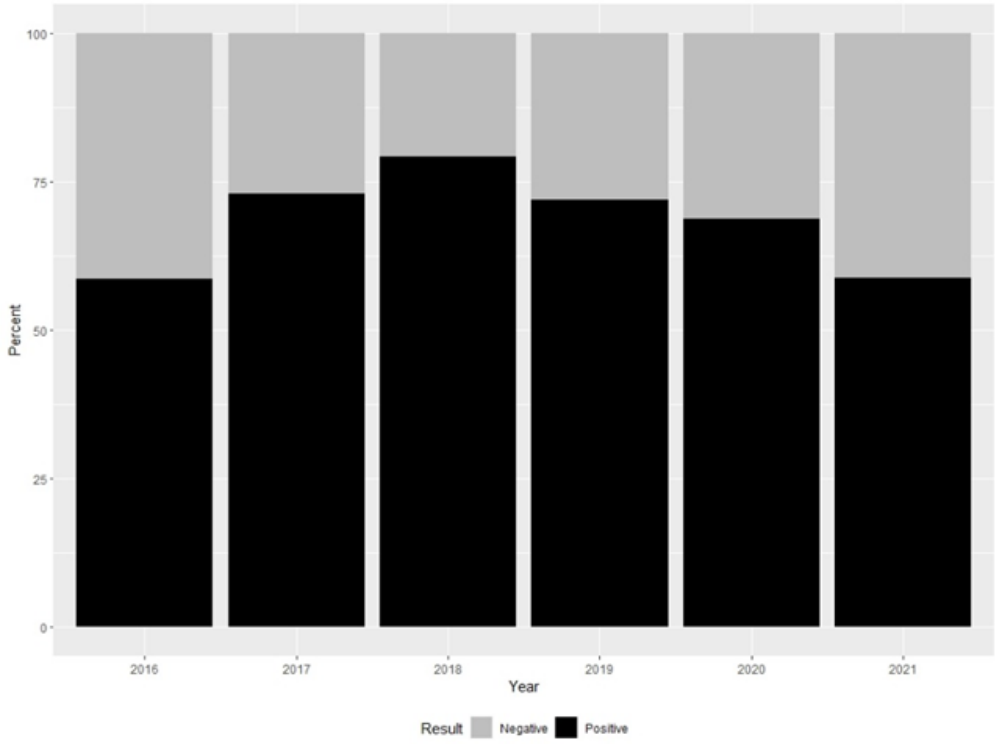

Figura 1 – Distribuição das amostras de fezes analisadas na Seção de Parasitologia do Instituto Central do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ao longo dos anos (2016 a 2021) (p= 0,02394).

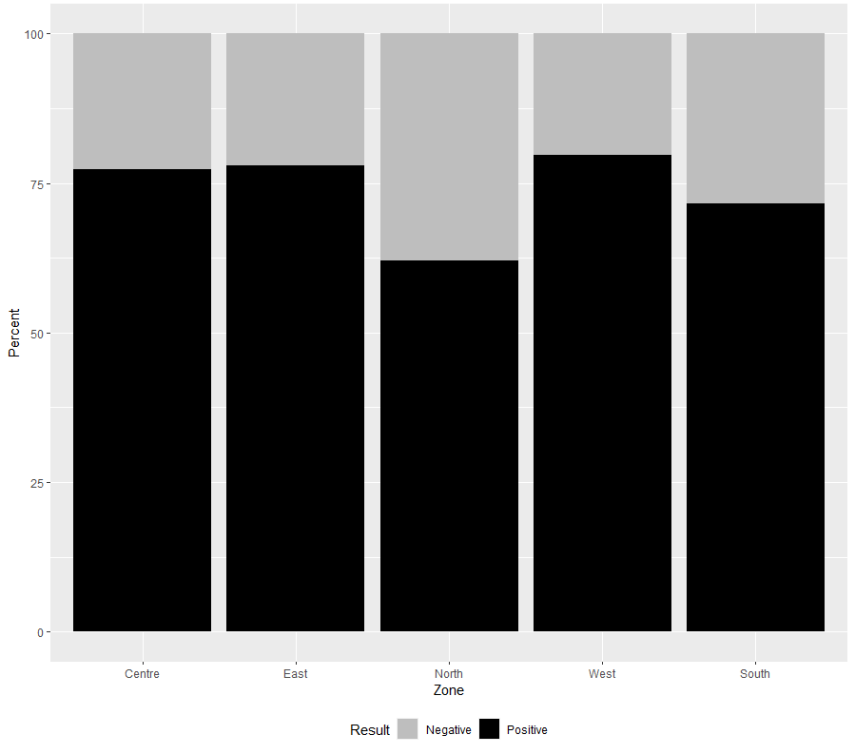

Figura 2 – Procedência das amostras de fezes, analisadas no período de 2016 a 2021, na Seção de Parasitologia do Instituto Central do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em relação a região da cidade de São Paulo (p=0,1862).

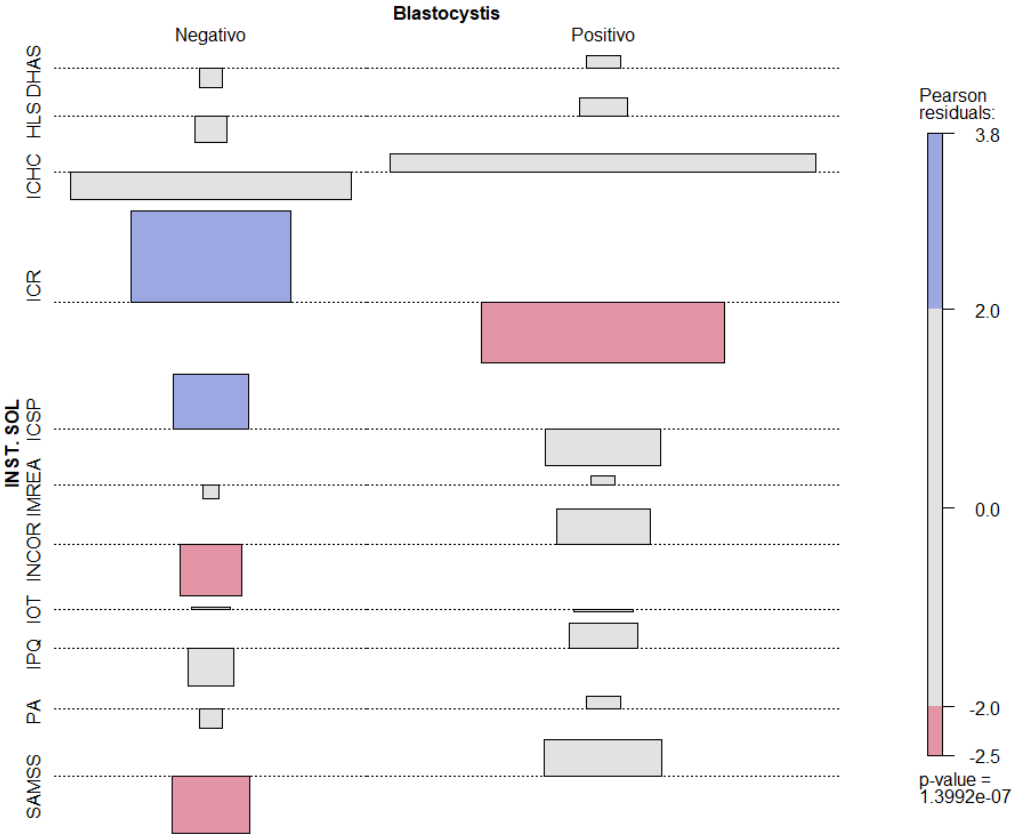

Figura 3 – Procedência das amostras de fezes analisadas no período de 2016 a 2021, na Seção de Parasitologia do Instituto Central do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em relação ao serviço solicitante. DHAS (Departamento Hospital Auxiliar de Suzano), HLS, ICHC (Instituto Central Hospital das Clínicas), ICR (Instituto da Criança e do Adolescente), ICSP (Instituto do Câncer do estado de São Paulo), IMREA (Instituto de Medicina Física e Reabilitação), INCOR (Instituto de Coração), IOT (Instituto de Ortopedia e Traumatologia), IPQ (Instituto de Psiquiatria), PA (Pronto Atendimento), CACEC (Centro de Atendimento ao Colaborador).

Capítulo III

Caracterização dos subtipos de *Blastocystis* sp. isolados de pacientes com urticária, São Paulo, Brasil

(Characterization of subtypes of Blastocystis sp. isolated from patients with urticaria, São Paulo, Brazil)

Capítulo III

Nos últimos anos, estudos mencionam que a patogenicidade de *Blastocystis* sp. pode ser devida à presença de subtipos específicos ou condições imunológicas do hospedeiro[75,76]. Associações baseadas em relatos de casos, sugerem *Blastocystis* sp. como agente causador de manifestações clínicas gastrointestinais e extraintestinais, como síndrome do intestino irritável e urticária[40,54,59,77-80]. No contexto da urticária, ainda é incerto se esse organismo está diretamente relacionado à manifestação alérgica ou apenas um componente comum da microbiota intestinal.

No Brasil, até momento existem poucos estudos sobre a caracterização molecular de *Blastocystis* sp., nenhum deles no contexto de urticária[41,42,69,71,73]. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência e caracterização molecular de *Blastocystis* sp. em pacientes com urticaria acompanhados no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP), na cidade de São Paulo, Brasil.

Com relação aos resultados parasitológicos, 53,5% dos pacientes foram positivos para *Blastocystis* sp. Diferentes subtipos foram identificados: ST1 (25%), ST2 (17,8%), ST3 (28,5%), ST4 (21,4%), ST6 (3,6%), e um isolado com infecção mista com os subtipos 1 e 3. Os subtipos mais frequentemente identificados em pacientes com lesões ativas foram ST3, seguido pelo ST1, ST2 e ST4. Nossas análises moleculares nos permitiram fazer uma avaliação inicial da presença dos subtipos de *Blastocystis* nesta população no Brasil. Contudo, mais estudos focados na possível relação entre este protista e urticária são encorajado.

Capítulo III

Parasite Epidemiology and Control 7 (2019) e00124

Contents lists available at ScienceDirect

Parasite Epidemiology and Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parepi

Characterization of subtypes of *Blastocystis* sp. isolated from patients with urticaria, São Paulo, Brazil

Gessica Baptista de Melo [a,*], Fernanda de Mello Malta [b], Celina Wakisaka Maruta [c], Paulo Ricardo Criado [c,d], Vera Lucia Pagliusi Castilho [e], Elenice Messias do Nascimento Gonçalves [e], Maria Cristina de Carvalho do Espirito-Santo [a], Fabiana Martins de Paula [a], Ronaldo Cesar Borges Gryschek [a]

[a] *Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose (LIM-06), Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*
[b] *Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical (LIM-07), Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*
[c] *Departamento de Dermatologia, Hospital Das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*
[d] *Faculdade de Medicina Do ABC, São Paulo, Brazil*
[e] *Seção de Parasitologia, Divisão Do Laboratório Central, Hospital Das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received 2 August 2019
Received in revised form 18 October 2019
Accepted 5 November 2019

Keywords:
Blastocystis sp.
Subtype
Urticaria
Brazil

A B S T R A C T

Blastocystis sp. is described as an enteric protist prevalent in fecal samples from humans and animals; its pathogenicity and epidemiology are still controversial. Currently, it has been associated with intestinal diseases such as irritable bowel syndrome and clinical manifestations of allergic skin, such as chronic urticaria. In the context of urticaria, it is still uncertain whether this organism is directly related to the allergic manifestation or just a common component of the intestinal microbiota. This study aimed to evaluate the occurrence and molecular diversity of *Blastocystis* sp. in individuals with urticaria from a dermatology outpatient clinic, São Paulo, Brazil. Fecal samples of 58 patients with urticaria were examined using parasitological methods; and subsequently tested by polymerase chain reaction using *Blastocystis*-specific primers. The subtypes (STs) and alleles (a) were determined using BLASTn and MLST tools. ST1, ST2, ST3, ST4, ST6 and mixed infection (ST1 + ST3) were identified in the patients with urticaria; ST1 (a4), ST3 (a34 and a36) and ST4 (a42) were the most prevalent. Our molecular analyses allowed an initial description of *Blastocystis* subtypes in patients with urticaria from São Paulo city, Brazil.
© 2019 Published by Elsevier Ltd on behalf of World Federation of Parasitologists. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

* Corresponding author.
E-mail addresses: gessicamelo@hotmail.com, gessicab_melo@usp.br (G.B. Melo).

https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00124
2405-6731/© 2019 Published by Elsevier Ltd on behalf of World Federation of Parasitologists. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Capítulo III

1. Introduction

Blastocystis sp. is described as one of the most common enteric protists that inhabits the gastrointestinal tract of humans and animals (Kurt et al., 2016; Scanlan, 2012; Cassano et al., 2005). Currently, at least 17 different subtypes (STs) have been recognized, ten of which are found in human samples (ST1-9 and ST12) (Ramírez et al., 2016; Alfellani et al., 2013). Despite recent progress in the number of studies, biological and pathogenic aspects remain controversial. Recent studies described *Blastocystis* sp. as a possible common member of the intestinal microbiota, which may develop clinical manifestations depending on the interaction with the host's intestinal microbiota components (Nieves-Ramírez et al., 2018; Kurt et al., 2016; Scanlan, 2012).

Some studies have indicated that the pathogenic potential of *Blastocystis* sp. can occur through the presence of certain STs or host immunological conditions (Mattiucci et al., 2016; Kurt et al., 2016). In recent years, associations based on case reports have suggested *Blastocystis* sp. as a possible causative agent of clinical manifestations, gastrointestinal and extraintestinal, such as the pathogenesis of urticaria (Casero et al., 2015; Vogelberg et al., 2010; Katsarou-Katsari et al., 2008; Gupta and Parsi, 2006; Valsecchi et al., 2004; Cassano et al., 2005; Barbosa et al., 2018). Parasitic helminths have been considered capable of causing urticaria manifestations by inducing the production of immunoglobulin E (Bakiri and Mingomataj, 2010; De Gentile et al., 1999; Lynch et al., 1998). However, it is unclear if an intestinal protist can act as a causative agent of cutaneous manifestations (Lepczyńska et al., 2016; Bakiri and Mingomataj, 2010).

In Brazil, there are few studies on the molecular characterization of *Blastocystis* sp., none of which are in the context of urticaria (Seguí et al., 2018; Oliveira-Arbex et al., 2018; Melo et al., 2017; David et al., 2015; Malheiros et al., 2011). Thus, the purpose of studying the diversity STs and alleles is mainly to obtain greater knowledge about the diversification of *Blastocystis* STs, as well as to compare different alleles belonging to the same ST and investigate whether certain alleles are responsible for certain clinical manifestations. Therefore, there is a need for comparative investigations between patients with urticaria and *Blastocystis* sp. This study aimed to evaluate the occurrence of *Blastocystis* sp. and characterization of genetic diversity in individuals with urticaria from a dermatology outpatient clinic (Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo [HC/FMUSP]), São Paulo, Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Study population and collection of faecal samples

The local ethical committee from HC/FMUSP approved this study (protocol no. 488−701). This study was carried out from January 2017 to December 2018 in the dermatology outpatient clinic at HC/FMUSP. A total of 58 individuals (49 females and 9 males, age range from 13 to 73 years) were included. The inclusion criteria were patients with urticaria with at least 6 weeks of evolution and with a parasitological diagnosis. The exclusion criteria were patients with urticaria with a triggering factor defined as persistent bacterial or viral infections (hepatitis B, hepatitis C, AIDS or presence of positive serology for HIV), pregnant women, lactating women, patients on immunosuppressive drugs, and those with dialytic chronic renal failure. All patients were informed about the research and invited to participate. After written consent for research purposes was obtained, routine parasitological examination was requested.

Socio-demographic (age, sex, education level) and clinical (medication used at time of collection and D-dimer plasma levels) data were considered. Patients with active chronic urticaria have D-dimer serum levels greater than 500 ng/mL fibrinogen equivalent unit (FEU) (Criado et al., 2011).

The fecal samples investigated were assessed by conventional microscopy and polymerase chain reaction (PCR). The parasitological diagnosis was made at the Section of Parasitology, Central Laboratory Division (HC/FMUSP) using the Faust, Lutz, and permanent-stained smears methods. Parasitological results for *Blastocystis* sp. followed the criteria mentioned by Tan (2008) based on the intensity of infection by quantified parasite cells in the fecal samples: rare (one to two cells in every 10 high-power fields), few to moderate (one cell in five high-power fields) or several (five or more cells per high-power field).

Blastocystis-positive samples were sent to the Medical Research Laboratory (LIM06/FMUSP) for molecular analysis.

2.2. Extraction of genomic DNA and PCR amplification

Genomic DNA was extracted from approximately 200 mg of frozen fecal samples using a commercial QIAamp Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions.

PCR amplification was performed using *Blastocystis*-specific *SSU*-rDNA primers RD5 (5′-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3′) and BhRDr (5′-GAGCTTTTTAACTGC AACAACG-3′) described by Scicluna et al. (2006). PCR reactions were performed in a 10 μL volume containing ~50 ng μL^{-1} of DNA, 2.0 μg BSA, 0.2 mM each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 2pM of each primer, 1 × PCR buffer and 1.25 U GoTaq® DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, USA). PCR conditions consisted of an initial denaturation cycle at 94 °C for 2 min, 30 cycles including denaturation at 94 °C for 1 min, annealing 61.8 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min and final extension at 72 °C for 2 min. PCR amplification was conducted with a Mastercycler EP Gradient S Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel containing Sybr Safe (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, USA) with a size marker of 100bp.

Capítulo III

2.3. Subtyping and phylogenetic analysis

Amplicons of the expected size were purified using ExoSAP enzyme (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and sequenced by both strands using an ABI PRISM® BigDye™ Terminator kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), following the Sanger et al. (1977) sequencing methodology. DNA sequencing was performed using an automated ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

The consensus sequences in the samples were aligned using BioEdit software and analyzed for the presence of double peaks. For subtype and allele assignment the sequences were compared with *Blastocystis* sequences in GenBank using the BLAST tool and *Blastocystis* 18S database available at https://pubmlst.org/blatocystis/. Sequence data were deposited in the GenBank database under the accession numbers: GenBank: MK782495-MK782527.

3. Results

At the time of collection, 22.4% (13 of 58) of patients had no active lesions and were controlled with antihistamines (loratadine and hydroxyzine), 63.8% (37 of 58) had active lesions and were treated with antihistamines (loratadine and hydroxyzine) and 13.8% (8 of 58) patients had no activity data. The values of D-dimer plasma levels ranged from 190 to >10,000 ng/mL FEU. The associated clinical diagnoses were glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, diabetes mellitus, systemic arterial hypertension, dyslipidemia, epilepsy, subclinical hypothyroidism, multiple sclerosis, Barrett esophagus, fibromyalgia, rhinitis, and gastroesophageal reflux disease. Only one patient reported diarrhea during the visit.

With regard to the parasitology results, 53.5% (31 of 58) of patients were positive for *Blastocystis* sp., three (5.2%) samples presented numerous forms of *Blastocystis* sp. and, rare forms were found in the others. Of these samples, 13.8% (8 of 58) were positive for other enteroparasites: *Endolimax nana* (n = 2), *Entamoeba coli* (n = 1), *E. nana* and *E. coli* (n = 3), *Taenia* spp. (n = 1), and *Giardia lamblia* (n = 1). The expected fragment of *Blastocystis*-specific *SSU*-rDNA was found in 53.5% (31 of 58) of the patients. These positive samples were submitted to sequencing, and some isolates showed low-quality sequences. Comparison of the results obtained with microscopic and PCR methods for the detection of *Blastocystis* sp. are shown in Table 1.

Different subtypes were identified: ST1 in seven isolates (25%), ST2 in five isolates (17.8%), ST3 in eight isolates (28.5%), ST4 in six isolates (21.4%), ST6 in one isolate (3.6%), and in a single isolate was observed a mixed infection ST1 + ST3 (Fig. 1). Allele sequence analyses showed a4 in ST1; a9 and a12 within ST2; a34, a36 and a37 in ST3; a42 and a94 within ST4 and a122 in ST6; a4 and a37 were observed in the sample with mixed infection (ST1 + ST3). The subtypes most frequently identified in patients with active lesions were ST3, ST1, ST2, and ST4 (Table 2).

Socio-demographic (age, sex, education level), clinical (clinical diagnosis, D-dimer plasma levels) data for 28 patients with urticaria and a positive molecular diagnosis of *Blastocystis* sp. are shown in Table 3.

4. Discussion

The factors involved in the possible human infection by *Blastocystis* sp. and the reason for its high frequency worldwide has resulted in increasing numbers of studies (Oliveira-Arbex et al., 2018; Kurt et al., 2016; Alfellani et al., 2013; Scanlan, 2012; Malheiros et al., 2011). Some authors describe the host's immune status, the number or type of intestinal forms, the components of the intestinal microbiota, and the presence of particular subtypes as possible concomitant conditions that may contribute to the high occurrence of *Blastocystis* infection (Nieves-Ramírez et al., 2018; Kurt et al., 2016; Arik Yilmaz et al., 2016).

In the context of urticaria, it is still not known whether this organism has a direct relationship with allergic manifestations (Arik Yilmaz et al., 2016; Hameed et al., 2011; Bakiri and Mingomataj, 2010; Katsarou-Katsari et al., 2008). Zaglool et al. (2012), evaluating patients with allergic skin symptoms, showed that 13.7% were infected with *Blastocystis* sp. In our study, it was shown that 53.5% of the patients with urticaria presented a positive parasitological diagnosis for *Blastocystis* sp. Similarly, Hameed et al. (2011) demonstrated that 61% of patients with urticaria had a positive diagnosis of *Blastocystis* sp.

Table 1
Comparison of the results obtained with microscopic (MC) and PCR methods for the detection of *Blastocystis* sp. in faecal samples from patients with urticaria.

Method	Patients with urticaria (N = 58)	
	N	%
MC + PCR+	21	36.2
MC + PCR−	10	17.2
MC− PCR+	10	17.2
MC− PCR−	17	29.3

+, positive samples; −, negative samples.

Capítulo III

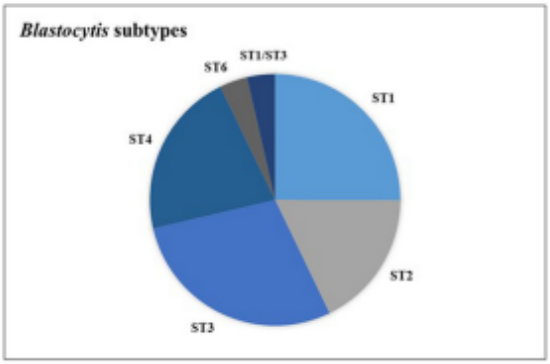

Fig. 1. *Blastocystis* subtypes identified from patients with urticaria.

Table 2
Clinical data and subtypes/alleles identified in fecal samples sequenced from patients with urticaria.

Subtypes	Alleles	AL	NAL	ND
ST1	Allele 4	6	0	1
ST2	Allele 9	1	0	1
	Allele 12	3	0	0
ST3	Allele 34	3	1	0
	Allele 36	3	0	0
	Allele 37	1	0	0
ST4	Allele 42	4	0	1
	Allele 92	0	0	1
ST6	Allele 122	1	0	0
ST1/ST3	Allele 4/37	1	0	0

AL, active lesions; NAL, no active lesions; ND, no data.

Table 3
Socio-demographic (age, sex, education level), clinical (clinical diagnosis, D-dimer plasma levels) data for 28 patients with urticaria and a positive molecular diagnosis of *Blastocystis* sp.

Isolate	Gender	Age (years)	Education level[a]	D-Dimer (ng/mL)	Clinical diagnosis	ST/allele
1UC	F	26	High	ND	ND	ST1/4
2UC	F	49	Low	720	G6PD deficiency	ST1/4
5UC	F	32	Low	690	From another clinic	ST3/36
6UC	F	40	Low	1360	Sinusitis	ST1 and ST3/4 and 37
7UC	F	73	Low	1140	AH	ST2/12
9UC	F	60	Low	230	GRD, DM, depression	ST4/42
10UC	M	45	High	ND	Dyslipidemia, DM, AH	ST2/12
12UC	M	52	High	ND	From another clinic	ST3/34
13UC	F	38	Low	550	From another clinic	ST3/34
15UC	F	50	Low	615	AH, DM, asthma	ST1/4
18UC	F	42	High	230	Epilepsy	ST1/4
20UC	F	40	High	ND	From another clinic	ST1/4
21UC	F	57	High	ND	ND	ST4/94
23UC	F	26	Low	2140	From another clinic	ST1/4
25UC	F	33	High	ND	ND	ST4/42
26UC	F	32	High	ND	Multiple sclerosis	ST4/42
28UC	F	59	High	ND	ND	ST2/9
33UC	F	49	Nd	ND	Epilepsy, DM, AH	ST2/9
40UC	M	51	Low	3940	From another clinic	ST6/122
41UC	F	59	Nd	748	From another clinic	ST3/36
43UC	F	57	Low	ND	DM, AH, dyslipidemia	ST3/34
46UC	F	30	High	ND	From another clinic	ST4/42
47UC	F	57	Low	ND	Rhinitis, fibromyalgia, DM, dyslipidemia, gastritis	ST4/42
48UC	M	49	High	630	From another clinic	ST3/34
53UC	F	35	Low	276	Obesity	ST3/36
54UC	M	56	Low	ND	From another clinic	ST1/4
55UC	F	52	High	250	DM, AH, dyslipidemia, hypothyroidism	ST2/12
56UC	F	54	Low	1.747	Barrett esophagus	ST3/37

AH, arterial hypertension; DM, diabetes mellitus; F, female; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GRD, gastroesophageal reflux disease; M, male; ND, no data.

[a] Low, primary school or less; high, secondary school or more.

Capítulo III

Most of our patients were female. Similarly, Bálint et al. (2014) noticed a greater proportion of female patients in relation to the males with skin manifestations. With regard to the educational background of the study population, we found that most of the individuals has a low educational level; the same picture was shown by Abdulsalam et al. (2013).

Amplification of specific DNA from fecal samples has allowed new perspectives on the laboratory diagnosis of *Blastocystis* sp., especially in view of the difficulty with morphological differentiation (Stensvold, 2013). In our study, we verified the specific target was amplified in 54.4% of the fecal samples. However, some isolates with positive parasitology were negative by molecular diagnosis. PCR inhibitors in fecal samples or isolates that are not amplifiable by primers can explain non-amplification of *Blastocystis* DNA (Stensvold et al., 2006; Abdulsalam et al., 2013). In contrast, 37% of the negative parasitological isolates showed positive amplification of *Blastocystis* DNA, reinforcing the usefulness of PCR as a sensitive diagnostic tool (Stensvold et al., 2006).

Based on analysis of the *SSU*-rDNA, at least 17 subtypes of *Blastocystis* sp. have been detected to date, colonizing humans, other mammals, birds, reptiles, and insects (Lepczyńska et al., 2016; Alfellani et al., 2013; Scanlan, 2012). Analyzing the overall prevalence of *Blastocystis* subtypes, the highest occurrence of ST1 and ST2 has been reported in South and North America; ST1 and ST3 in Australia, Europe, and Southeast Asia, and ST4 in Europe (Alfellani et al., 2013; Abdulsalam et al., 2013). Our molecular analysis revealed the presence of five subtypes: ST1, ST2, ST3, ST4, and ST6. A higher frequency of ST1, ST2 and ST3 has been reported in the literature, and our results confirm these findings (Ramírez et al., 2016; Alfellani et al., 2013). Other studies conducted in Brazil reported the highest frequency of the same subtypes in different populations (Barbosa et al., 2018; Valença-Barbosa et al., 2017). On the other hand, two other studies demonstrated a higher occurrence of ST1 in relation to ST3 (Oliveira-Arbex et al., 2018; Malheiros et al., 2011).

There is evidence that ST2, ST3 and ST4 are etiologically associated with urticaria (Lepczyńska et al., 2016; Vogelberg et al., 2010; Katsarou-Katsari et al., 2008). Until recently, ST4 was considered to be restricted to the European continent, and was had not been identified in isolates from regions of Brazil (Melo et al., 2017; Ramírez et al., 2016; David et al., 2015; Alfellani et al., 2013). However, the ST4 was identified in this study and in other recent studies conducted in Rio de Janeiro (Seguí et al., 2018; Barbosa et al., 2018; Valença-Barbosa et al., 2017). ST4 was isolated from a patient without active lesions and with no reports of gastrointestinal symptoms. Domínguez-Márquez et al. (2009) reported the presence of ST4 in 94.1% of samples from symptomatic patients in Spain.

ST6 was identified in our isolates; this is found sporadically in humans and is described as a circulating avian subtype (Ramírez et al., 2016; Wawrzyniak et al., 2013). This subtype were detected in isolates found in Europe and Brazil (Seguí et al., 2018; Alfellani et al., 2013).

The detection of *Blastocystis* sp. in a large proportion of healthy individuals has suggested that this organism is a normal component of the intestinal microbiota (Kurt et al., 2016; Scanlan, 2012). On the other hand, it has been reported in the literature that the pathogenic expression of enteric protozoa such as *Blastocystis* sp., *Entamoeba histolytica*, species of *Eimeria* and *Giardia* may be related to the type of organisms present in the intestinal microbiota (Lepczyńska et al., 2016). The present results demonstrate that the most frequent protozoan in association with *Blastocystis* was *E. nana* in five isolates (ST1 and ST3).

It has been reported that certain subtypes may promote urticaria in only some patient groups (Lepczyńska et al., 2016). These findings may be due to the presence of high intra-subtype diversity (Stensvold, 2013). Our molecular analyses confirmed the high diversity within the subtypes, particularly the highest number of alleles within ST3, followed by ST1. Similar frequencies of alleles within ST3 have recently been reported in isolates from Brazil (Oliveira-Arbex et al., 2018; Seguí et al., 2018; David et al., 2015). Considering allele diversity, a4 (ST1), a12 (ST2), a34 and a36 (ST3), a42 (ST4) and a122 (ST6) were the most frequent in our study, especially in individuals with active lesions. Our results were similar to those reported by Casero et al. (2015) showing a34 (ST3) as the predominant genetic variant in patients with urticaria.

It has been reported that depending on the method used for subtyping, the occurrence of mixed infections may be underestimated (Scanlan et al., 2015; Stensvold, 2013). Our findings showed that 3.6% of the isolates were composed of mixed infections (ST1/ST3). A similar frequency was described by Abdulsalam et al. (2013) in isolates from patients in the Libyan region. Different studies carried out in Brazil point to the presence of mixed infections (David et al., 2015; Malheiros et al., 2011).

A potential limitation of this study may be the sample size of the urticaria population and the absence of a control group, which may have contributed to the difficulty in making robust conclusions. However, the identification of *Blastocystis* sp. in a large number of samples from patients with urticaria confirms the need for further studies, especially to understand the possible relationship between this protist and urticaria.

5. Conclusion

Our molecular analyses allowed us to make an initial assessment of the presence of *Blastocystis* STs/alleles from patients with urticaria in Brazil. In the present study, we found ST1 (a4), ST 2 (a12), ST3 (a34 and a36), ST4 (a42) and ST6 (a122) in the isolates from patients with urticaria who had active lesions. Thus, more studies focusing on *Blastocystis* and urticaria are encouraged.

Capítulo III

Conflicts of interest

The authors declare that has no conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank Magali Orban for support in separating the samples, and we are grateful to all patients for agreeing to participate in this study. This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant no. 2015/18213-6) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES grant no. 1749729).

References

Abdulsalam, A.M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H.M., et al., 2013. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates in Sebha, Libya. PLoS One 8, e84372.
Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., Vidal-Lapiedra, A., et al., 2013. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop. 126, 11–18.
Arik Yilmaz, E., Karaatmaca, B., Sackesen, C., et al., 2016. Parasitic infections in children with chronic spontaneous urticaria. Int. Arch. Allergy Immunol. 171, 130–135.
Bakiri, A.H., Mingomataj, E.C., 2010. Parasites induced skin allergy: a strategic manipulation of the host immunity. J. Clin. Med. Res. 2, 247–255.
Bálint, A., Dóczi, I., Bereczki, L., et al., 2014. Do not forget the stool examination!-cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. Parasitol. Res. 113, 1585–1590.
Barbosa, C.V., Barreto, M.M., Andrade, R.J., 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, e0193860.
Casero, R.D., Mongi, F., Sánchez, A., et al., 2015. *Blastocystis* and urticaria: examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. Acta Trop. 148, 156–161.
Cassano, N., Scoppio, B.M., Loviglio, M.C., et al., 2005. Remission of delayed pressure urticaria after eradication of *Blastocystis hominis*. Acta Derm. Venereol. 85, 357–358.
Criado, P.R., Antinori, L.C.L., Maruta, C.W., Reis, V.M.S., 2011. Evaluation of D-dimer serum levels among patients with chronic urticaria, psoriasis and urticarial vasculitis. An. Bras. Dermatol. 88, 355–360.
David, É.B., Guimarães, S., de Oliveira, A.P., et al., 2015. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. Parasites Vectors 8, 1–12.
De Gentile, L., Grandière-Perez, L., Chabasse, D., 1999. [Urticaria and parasites]. Allerg. Immunol. (Paris) 31, 288–291 ([in French]).
Domínguez-Márquez, M.V., Guna, R., Muñoz, C., et al., 2009. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol. Res. 105, 949–955.
Gupta, R., Parsi, K., 2006. Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. Australas. J. Dermatol. 47 (2), 117–119.
Hameed, D.M., Hassanin, O.M., Zuel-Fakkar, N.M., 2011. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. Parasitol. Res. 108, 553–560.
Katsarou-Katsari, A., Vassalos, C.M., Tzanetou, K., et al., 2008. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. Acta Derm. Venereol. 88, 80–81.
Kurt, Ö., Doğruman Al, F., Tanyüksel, M., 2016. Eradication of *Blastocystis* in humans: really necessary for all? Parasitol. Int. 65, 797–801.
Lepczyńska, M., Chen, W.C., Dzika, E., 2016. Mysterious chronic urticaria caused by *Blastocystis* spp.? Int. J. Dermatol. 55, 259–266.
Lynch, N.R., Hagel, I.A., Palenque, M.E., et al., 1998. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. J. Allergy Clin. Immunol. 101, 217–221.
Malheiros, A.F., Stensvold, C.R., Clark, C.G., et al., 2011. Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 85, 1050–1053.
Mattiucci, S., Crisafi, B., Gabrielli, S., et al., 2016. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infections in humans in Italy. Epidemiol. Infect. 144, 635–646.
Melo, G.B., Paula, F.M., Malta, F.M., et al., 2017. Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo city, Brazil. Parasitol Open 3, e3.
Nieves-Ramírez, M.E., Partida-Rodríguez, O., Laforest-Lapointe, I., et al., 2018. Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis* is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. mSystems 3 e00007-18.
Oliveira-Arbex, A.P., David, É.B., Guimarães, S., 2018. *Blastocystis* genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. Infect. Genet. Evol. 57, 59–63.
Ramírez, J.D., Sánchez, A., Hernández, C., et al., 2016. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. Infect. Genet. Evol. 41, 32–35.
Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463–5467.
Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Cotter, P.D., 2015. Development and application of a *Blastocystis* subtype-specific PCR assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population. Appl. Environ. Microbiol. 81, 4071–4076.
Scanlan, P.D., 2012. *Blastocystis:* past pitfalls and future perspectives. Trends Parasitol. 28, 327–334.
Scicluna, S.M., Tawari, B., Clark, C.G., 2006. DNA barcoding of *Blastocystis*. Protist 157, 77–85.
Seguí, R., Muñoz-Antoli, C., Klisiowicz, D.R., et al., 2018. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. Parasites Vectors 11, 490.
Stensvold, C.R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H.V., Arendrup, M.C., 2006. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. J. Parasitol. 92, 1081–1087.
Stensvold, C.R., 2013. *Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. Tropenmed. Parasitol. 3, 26–34.
Tan, KS, 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis. spp. Clin. Microbiol. Rev. 21, 639–665.
Valença Barbosa, C., de Jesus, B.R., Pereira Igreja, R., et al., 2017. Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. Parasites Vectors 10, 518.
Valsecchi, R., Leghissa, P., Greco, V., 2004. Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection. Acta Derm. Venereol. 84, 322.
Vogelberg, C., Stensvold, C.R., Monecke, S., et al., 2010. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. Parasitol. Int. 59, 469–471.
Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., et al., 2013. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. Ther. Adv. Infect. Dis. 1, 167–178.
Zaglool, D., Khodari, Y., Farooq, M., 2012. *Blastocystis hominis* and allergic skin diseases; a single centre experience. J. Health Sci. 2, 66–69.

Capítulo IV

Subtipos de *Blastocystis* em pacientes com diabetes mellitus da região Centro-Oeste do Brasil

(Blastocystis subtypes in patients with diabetes mellitus from the Midwest region of Brazil)

Capítulo IV

O diabetes mellitus é uma doença metabólica com distribuição mundial[65], considerada um grave problema de saúde no Brasil e no mundo, tanto em termos de número de pessoas afetadas, quanto em mortes prematuras[65,81-83]. As parasitoses intestinais continuam sendo responsáveis por alta morbidade e mortalidade, especialmente em países em desenvolvimento[65,66]. *Blastocystis* sp. é relatado com frequência na rotina de exames parasitológicos, sendo um dos protistas entéricos mais prevalentes em amostras fecais humanas, porém sua capacidade de causar doença ainda é incerta[11,84]. No Brasil, nenhum dos estudos publicados até o momento explorou a presença de *Blastocystis* sp. em pacientes com diabetes mellitus. Com isso, avaliamos em nosso estudo a ocorrência e identificação molecular de *Blastocystis* sp. entre pacientes com diabetes mellitus na região Centro-Oeste, Goiás, Brasil.

O exame microscópico revelou positividade de 12,1% e 7,9% para *Blastocystis* sp. em diabéticos e não-diabéticos (controle), respectivamente. A amplificação do DNA foi obtida em 34,4% nos pacientes diabéticos e 30,3% em indivíduos aparentemente saudáveis. A análise filogenética identificou seis subtipos de *Blastocystis* sp. nos diabéticos e não-diabéticos, representados por ST1, ST3, ST2 com maiores frequências, seguido pelo ST8, ST6 e ST7. Os mesmos subtipos também foram identificados no grupo controle, com exceção do ST7.

Vale ressaltar que este estudo foi o primeiro relato sobre a ocorrência e distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. em pacientes com diabetes mellitus no Brasil. Embora não tenhamos observado associação entre *Blastocystis* sp. e diabetes, o potencial risco da ocorrência dessa infecção não deve ser excluído.

Capítulo IV

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

JOURNAL OF THE SÃO PAULO INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

http://doi.org/10.1590/S1678-9946202163032

Blastocystis subtypes in patients with diabetes mellitus from the Midwest region of Brazil

Gessica Baptista de Melo[1,2], Marcia Carolina Mazzaro[3], Michele Soares Gomes-Gouvêa[2,4], Émelin Alves dos Santos[3], Laura Vilela de Souza[3], Jefferson Elias-Oliveira[3], Ronaldo Cesar Borges Gryschek[1,2], Rosângela Maria Rodrigues[3], Fabiana Martins de Paula[1,2]

ABSTRACT

Blastocystis sp. is an enteric protist commonly found in human fecal samples. In Brazil, few studies have been developed, but none of them has explored the presence of *Blastocystis* in patients with diabetes mellitus. We evaluated the occurrence and molecular identification of *Blastocystis* sp. among patients with diabetes mellitus in the Midwest region, Goias State, Brazil. Genomic DNA was obtained from 175 fecal samples (99 from the diabetic group and 76 from the control group). PCR was performed using pan-*Blastocystis* primers from the SSU-rDNA gene. Microscopic examination revealed positivity of 12.1% and 7.9% for *Blastocystis* in diabetics and in controls, respectively. Amplification of *Blastocystis* DNA was observed in 34.4% (34 of 99) and 30.3% (23 of 76) from the diabetic and control groups, respectively. Phylogenetic analyses and BLAST searches revealed six subtypes among *Blastocystis* isolates in the diabetic group, represented by ST1 (38.2%), ST2 (11.8%), ST3 (35.3%), ST6 (2.9%), ST7 (2.9%) and ST8 (8.8%). In the control group, ST1 (21.8%), ST2 (21.8%), ST3 (43.5%), ST6 (4.4%) and ST8 (8.7%) were identified. This study is the first report regarding the occurrence and subtypes distribution of *Blastocystis* in patients with diabetes mellitus in Brazil. The results reinforce the potential risk of *Blastocystis* infection in patients with diabetes, in addition, it contributes to the understanding of the genetic diversity of this enigmatic organism.

KEYWORDS: *Blastocystis* sp. Diabetes mellitus. Subtype. Allele. Brazil.

[1]Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose (LIM 06), São Paulo, São Paulo, Brazil

[2]Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

[3]Universidade Federal de Jataí, Laboratório de Parasitologia, Jataí, Goiás, Brazil

[4]Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical (LIM 07), São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to: Fabiana Martins de Paula
Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Investigação Médica (LIM 06), Av. Dr. Eneas Carvalho de Aguiar, 470, Prédio II, 2º andar, CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brazil
Tel: +55 11 3061-8220, +55 11 3064-5132

E-mail: fabiana.paula@hc.fm.usp.br

Received: 19 October 2020

Accepted: 15 March 2021

INTRODUCTION

Diabetes is a metabolic disease that has become more frequent over the years, and has a worldwide distribution[1]. Type 2 diabetes (T2D) is responsible for approximately 90% of the cases of diabetes mellitus[2]. This disease has been considered a serious health problem in Brazil and worldwide, both in terms of the number of affected people, as well as disabilities and premature deaths[2-4].

Intestinal parasites continue to be considered an important public health problem worldwide, responsible for high morbidity and mortality, especially in developing countries[1,5]. *Blastocystis* sp. has been highly reported in routine parasitological examinations, being one of the most prevalent enteric protists in human fecal samples[6]. On the other hand, its ability to cause disease is debated, and it is a subject of ongoing research[7]. Molecular studies have demonstrated a variable genetic diversity with description of 17 distinct subtypes (STs) to date, 10 of which have been found in humans (ST1-9 and ST12)[7,8]. In addition, it has been shown that certain subtypes can be considered more pathogenic to humans than others[6,7].

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Capítulo IV

Intestinal parasites and diabetes have been constantly evaluated, mainly due to the possibility of immune dysfunction in diabetes allowing the development of more severe parasitic infections[9]. In this context, certain parasitic infections can occur more frequently in patients with diabetes mellitus than in non-diabetics[1,5,10]. On the other hand, the occurrence of *Blastocystis* sp. is little known, especially in patients with diabetes[1,5]. Studies carried out in the Midwest region of Brazil indicate positivity ranging from 0.5 to 40.9% for *Blastocystis* sp., but none of them analyzed patients with diabetes[11-14]. Here, we present data on the occurrence and on the molecular identification of *Blastocystis* sp. in fecal samples of patients with diabetes mellitus living in Jatai, Goias State, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Ethical Statement

The present study was approved by the Ethics and Research Committee of Universidade Federal de Goias (protocol N° 929187/2015). After written informed consent was obtained, one fecal sample from each participant was collected.

Study site

This study was carried out from January 2015 to December 2016 in the Jatai municipality, Goias State, which is located in the Midwest region of Brazil (17°52'33"S, 51°43'17"W), 535 km from Brasilia (the capital of Brazil). Jatai has a total population of 100,882 inhabitants[15].

Sampling

This study included unpreserved fecal samples from individuals of both genders, with ages ranging from 18 to 89 years old. The individuals were divided into two groups:

- The diabetic group (n = 99) was composed of patients with type 2 diabetes mellitus (T2D) attending the Program of Education and Control of Diabetes in the Basic Health Unit of Jatai municipality. Inclusion criteria of the diabetic group were the diagnosis of DM2; blood tests associated to the diabetes control performed in the last two years; glycated haemoglobin (HbA1c) > 6.5%.
- Inclusion criteria of the diabetic group were the diagnosis of DM2, and > 30 years old; blood tests associated to the diabetes control performed in the last two years.
- The control group (n = 76) included T2D patients' companions or other patients in treatment at the Basic Health Unit, who have declared not to have T2D; had the glycated haemoglobin (HbA1c) evaluated with results < 6.5% and have not used anthelmintic/antiprotozoal drugs in the last year.

Fecal samples were immediately transported to the Laboratorio de Parasitologia, Universidade Federal de Jataí in Goias State, and processed within 12 h of collection by Lutz and Baermann modified methods for microscopic examination[16]. A second aliquot was immediately frozen at -20 °C for extracting genomic DNA. This subsample set was shipped to Laboratorio de Investigacao Medica (LIM/06), Hospital das Clinicas of the Faculdade de Medicina of the Universidade de Sao Paulo, for molecular analysis.

DNA extraction and PCR amplification

Genomic DNA was extracted directly from fecal samples using the QIAamp Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's recommendations. DNA was eluted in a final volume of 100 µL and stored at -20ºC in the freezer until the PCR (Polymerase Chain Reaction) analysis. DNA isolates were analysed for the presence of *Blastocystis* sp. through PCR performed with pan-*Blastocystis* primers RD5 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') and BhRDr (5'-GAGCTTTTAACTGCAACAA CG-3') described by Scicluna *et al.*[17], that amplify a DNA fragment of approximately 600 bp from the *SSU* rDNA gene.

Four microliters of the DNA solution were added into the standard PCR mixture with a total reaction volume of 20 µL. GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µL, Promega Corporation, Madison, WI, USA) was used in all the PCR reactions. Amplification cycles were composed of an initial denaturation step of 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min (denaturation), 61.8 °C for 1 min (annealing) and 72 °C for 1 min (extension), and a final extension of 72 °C for 2 min. In all PCR amplifications, a positive control (PCR mixture with *Blastocystis* sp. culture isolate) and a negative control (PCR mixture with non-template water) were included. Amplification products were analysed on 2% agarose gel electrophoresis stained with Sybr Safe (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, USA) and visualized under UV light.

Subtyping and phylogenetic analyses of *Blastocystis* sp.

PCR products were purified using the Exo-SAP-IT™ PCR clean-up (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA)

Capítulo IV

and sequenced by the two-directional sequencing for increasing the sequencing accuracy using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit and the same primers used in the PCR. Sequencing data were generated on an ABI 3500 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

The quality of sequences was evaluated using the Phred-Phrap software and the consensus sequence of each sample was assembled using the CAP3 software available at the Electropherogram quality analysis webpage[18]. Sequences were aligned and edited when necessary using CLUSTAL W and BioEdit v.7.0.8 software programs (Ibis Bioscience, Carlsbad, CA, USA).

For subtypes identification the consensus sequence of each sample was analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)[19]. Sequences were also submitted to phylogenetic analysis together with published reference sequences from the GenBank database to confirm the subtype classification. Subtype identification and allele discrimination based on 18S rRNA gene of *Blastocystis* were performed using the *Blastocystis* database[20].

Phylogenetic analysis was performed with the Mega software (Version 10) through the Molecular Evolutionary Genetics Analysis package, using the Maximum Likelihood method and Tamura 3-parameter model[21]. Genetic distances were calculated using Kimura's two-parameter model. Bootstrap analysis with 1,000 replicates was performed to test the reliability of the tree with values ≥ 70 indicated on the branches.

Data analysis

The agreement between microscopy and molecular analyses was measured using the Cohen's kappa coefficient (κ) (GraphPad Prism®, Melbourne, Australia). The data were analyzed using the Fisher's exact test to compare the frequency data generated by the study groups. Odds ratios (ORs) and their corresponding 95% confidence intervals (CIs) were used. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Fecal samples were collected from a total of 175 individuals. The diabetic group was composed of 38 (38.4%) males and 61 (61.6%) females, ranging from 32 to 87 years (62.8 ± 10.5 years), with a mean HbA1c of 8.9% (ranging from 6.8 to 16.8%) The control group was composed of 33 (43.4%) males and 43 (56.6%) females, ranging from 21 to 89 years (56.6 ± 18.5 years). There was no statistically significant difference in the comparison of variables between the two groups.

Overall, the microscopic examination revealed the presence of parasites in 31.3% (31/99) of the diabetic patients who harbored at least one intestinal parasite/commensal species. The most predominant species were non-pathogenic amebae (42.42%, 42/99); followed by *Blastocystis* sp. (12.1%, 12/99), *Entamoeba hystolytica* complex (2.02%, 2/99), *Giardia intestinalis* (1.01%, 1/99), and by helminths *Strongyloides stercoralis* and *Hymenolepsis nana* (1.01%, 1/99). In the control group, the microscopic examination showed that 25% (19/76) of fecal samples had at least one intestinal parasite/commensal species. Among identified species, there were non-pathogenic amebae (36.84%, 28/76); followed by *Blastocystis* sp. (7.89%, 6/76), *Entamoeba hystolytica* complex (5.26%, 4/76), and by helminths *S. stercoralis* and *Trichuris trichiura* (1.32%, 1/76).

PCR products of the expected size (around 600 bp) were observed in 44.4% (44/99) and in 34.2% (26/76) of the DNA samples from the diabetic and control groups, respectively, $p > 0.05$. Among the 70 PCR-positive samples, 57 (34 and 23 from the diabetic and control groups, respectively) were confirmed to be positive to *Blastocystis* by the sequencing of the amplification product. A total of 13 samples were excluded due to poor sequence quality (n = 7) and no similarity with *Blastocystis* in GenBank (n = 6). Additional analyses are being conducted to accurately determine their taxonomic identity.

Considering the results of the microscopic and molecular analyses, 36.0% (63/175) of the samples were positive for *Blastocystis*. Comparing the number of *Blastocystis*-positive samples identified by microscopy and molecular analyses, a low concordance was observed [κ = 0.194 (0.060–0.328)], $p < 0.001$. Six samples (three in each group) were *Blastocystis* sp.-positive by microscopy, nonetheless, they were negative by molecular analyses. Table 1 shows the distribution of diabetic and control participants according to age, gender and *Blastocystis*-positive results.

The 57 successfully subtyped sequences showed a high similarity (98.78 to 100%) in comparison with *Blastocystis* sequences reported in GenBank (Supplementary Table S1). The nucleotide sequences obtained in this study have been deposited in the GenBank database under the accession numbers: MN585810-MN585817, MN585819, MN585821-MN585822, MN585824, MN585826-MN585832, MN585834-MN585837, MN585839, MN585841-MN585847, MN585849-MN585850, MN585852, MN585854-MN585864, MN585866-MN585867 and MN585870-MN585879.

The nucleotide sequence analysis revealed the presence of six subtypes among the diabetic isolates: ST1 (13/34;

Capítulo IV

Table 1 - Association between the positivity to *Blastocystis* sp. and characteristics of the diabetic and the control group.

	Diabetic group	Control group	*P* value	OR (95% CI)
Characteristics				
Gender*				
♂	15 (40.5%)	14 (46.1%)	0.8060	0.8866 (0.3382-2.323)
♀	22 (59.5%)	12 (53.9%)	0.3938	1.452 (0.6226 -3.474)
Age*				
< 65 years	14 (37.8%)	16 (61.5%)	0.3328	0.6539 (0.2745-1.544)
≥ 65 years	23 (62.2%)	10 (38.5%)	0.1278	2.154 (0.8054 -5.955)
Results				
Microscopy	12 (12.1%)	6 (7.9%)	0.3779	1.605 (0.5774 -4.846)
PCR	34 (34.4%)	23 (30.3%)	0.5745	1.204 (0.6332 -2.309)

*considering the results of microscopy and the molecular analyses

38.2%), ST2 (4/34; 11.8%), ST3 (12 /34; 35.3%), ST6 (1/34; 2.9%), ST7 (1/34; 2.9%) and ST8 (3/34; 8.8%). Subsequently, we identified the alleles present in each subtype from isolates of the diabetic group: ST1 (allele 4), ST2 (alleles 9 and 12), ST3 (alleles 34, 36 and 37), ST6 (allele 122), ST7 (allele 99) and ST8 (allele 21) (Table 2, Supplementary Table S1). In the control group, five subtypes were identified: ST1 (5/23; 21.8%), ST2 (5/23; 21.8%), ST3 (10/23; 43.5%), ST6 (1/23; 4.4%) and ST8 (2/23; 8.7%). The following were identified in the ST1 (allele 4), ST2 (alleles 11 and 15), ST3 (alleles 34 and 36), ST6 (allele 134) and ST8 (allele 21) (Table 2, Supplementary Table S1). The higher occurrence of ST1 in diabetic isolates in relation to the control group (72.2 vs 27.8%; $p = 0.01030$) can be observed. There was no significant difference between the other subtypes.

Based on the barcode sequence the similarity of the sequences within each subtype was calculated and showed a range from 99.987 to 100%. Considering the inter-subtypes ST1 and ST2 (99.974) shows highest similarity, while ST2 and ST7 (99.849) shows lowest similarity. To establish a probable correlation between diabetic and intra-subtype variation, genetic similarity between sequences of diabetic and controls isolates among each subtype was calculated, and it showed the lowest similarity in ST2 (99.994%) versus the highest similarity in ST3 isolates (100%).

A Phylogenetic tree was constructed, and it revealed that all six subtypes were clearly separated (Figure 1). Moreover, the tree indicated that sequences obtained from the *Blastocystis* isolates from the diabetic group were not separated from those from the control group. This suggests that there was no association between the presence of diabetes and *Blastocystis* sp.

DISCUSSION

Blastocystis sp. has been one of the most prevalent anaerobic protists found in human fecal specimens[22]. However, it still remains surrounded by many uncertainties, especially regarding its pathogenic potential[7]. Patients with diabetes mellitus can present intestinal parasites infections with more serious complications[5]. In addition, the literature

Table 2 - Distribution of *Blastocystis* sp. subtypes and alleles in the diabetic and the control group.

Subtypes	Diabetic group			Control group			Total		
	Alleles	*n*	(%)	Alleles	*n*	(%)	Alleles	*n*	(%)
ST1	4	13/13	100	4	5/5	100	4	18/18	100
ST2	9	1/4	25	-	-	-	9	1/9	11.1
	-	-	-	11	3/5	60	11	3/9	33.3
	12	3/4	75	-	-	-	12	3/9	33.3
	-	-	-	15	2/5	40	15	2/9	22.2
ST3	34	6/12	50	34	8/10	80	34	14/22	63.6
	36	2/12	16.7	36	2/10	20	36	4/22	18.2
	37	4/12	33.3	-	-	-	37	4/22	18.2
ST6	122	1/1	100	-	-	-	122	1/2	50
	-	-	-	134	1/1	100	134	1/2	50
ST7	99	1/1	100	-	-	-	99	1/1	100
ST8	21	3/3	100	21	2/2	100	21	5/5	100

Capítulo IV

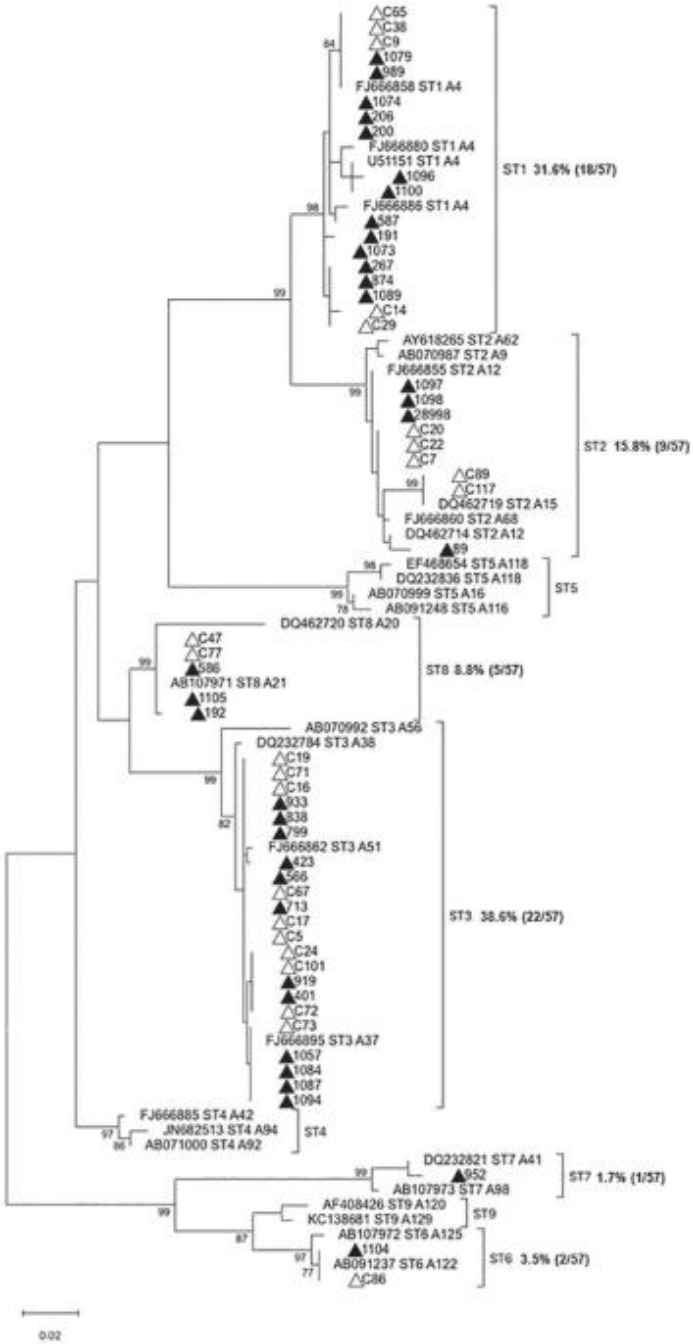

Figure 1 - Phylogenetic analysis of *Blastocystis* SSU rDNA sequences (around 600bp) generated in the diabetic group (identified by filled black triangles) and the control group (identified by empty black triangles). Reference sequences from GenBank (identified by accession numbers and subtypes). The phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method. Bootstrap values < 70% are not shown. The subtype prevalence in the 57 samples is shown on the right as a percentage.

has been emphasized the high frequency of protozoan and helminths in patients with type 2 diabetes in relation to type 1 diabetes[10]. It is worth noting that, to our knowledge, there are no studies conducted in Brazil that explored the occurrence of *Blastocystis* sp. in patients with diabetes mellitus.

Parasitological techniques by microscopy are used as the main diagnostic tool for *Blastocystis* in the majority of laboratories. In the present study, *Blastocystis* positivity by microscopic examination of 12.1% and 7.9% were observed in the diabetic and the control group, respectively. This positivity was lower in previous studies[12,23] and higher in others[11,13,14] carried out in the Midwest region of Brazil. In addition, Bafghi *et al.*[5] demonstrated inferior results (2.4%) in diabetic patients' from Iran. In our study, we used parasitological techniques employed in the routine of clinical laboratories that may have contributed to the low positivity. However, some authors have reported the importance of using stained smears and culture methods for the diagnosis of *Blastocystis*[6,22], mainly to improve the visualization and distinction of *Blastocystis* forms[6].

Poor quality sequences were not considered in the genetic analysis. These sequences may occur due to incomplete replication of the DNA strand during the cycle as a result of a PCR product combining sequences from the two sources (different organisms)[24]; or due to the extensive sequence similarity in some regions of the SSU rDNA[25]. Thus, the positivity of *Blastocystis* should always be confirmed by sequencing.

Molecular analysis (34.4% and 30.3% in the diabetic and the control groups, respectively) showed a higher positivity in relation to the microscopic examination. One possible explanation is that the non-use of high sensitivity parasitological techniques to detect this protist[22]. On the other hand, it is important to highlight the occurrence of some positive parasitological samples that were PCR-negative. Isolates that were not amplified by pan-*Blastocystis* primers (barcode region) or the presence of PCR inhibitors in fecal samples can be considered to explain the non-amplification of *Blastocystis* DNA[26]. In addition, in *Blastocystis* research, molecular tools can have a crucial impact on the understanding of its epidemiology, genetic diversity and transmission[27]. Thus, our findings reinforce the usefulness of PCR, followed by sequencing, as a sensitive diagnostic method for the detection of this organism.

In the last years, a variety of studies have been developed to identify *Blastocystis* sp. subtypes that were circulating in the human population[7,8]. Through the molecular identification of the barcode region, six subtypes were identified: ST1, ST2, ST3, ST6, ST7 and ST8. Globally, subtypes ST1-ST4 have been identified as the most common in humans[7,8]. It is interesting to note that there was a predominance of ST1, followed by ST3 and ST8 in diabetics, whileST3 was observed followed by ST1 and ST2 in the control group. In the Midwest region, only one study[23] evaluated the presence of *Blastocystis* subtypes reinforcing the greater occurrence of ST1, followed by ST2 and ST3. In other regions of Brazil, the situation is similar to the results of the control group with the highest occurrence of ST3, followed by ST1 and ST2[28-31].

The identification of ST6-ST8 subtypes can characterize a potential area for zoonotic transmission. Subtypes 6 and 7 are usually found in birds, while ST8 is commonly found in non-human primates and it has also been reported in marsupials[8]. These subtypes are found sporadically in humans, with lower frequencies[7,8]. ST6 and ST8 were identified in other Brazilian isolates, recently reported by Melo *et al.*[30] and Seguí *et al.*[28], who analyzed clinical stool samples in Sao Paulo State and fecal samples of children in Parana State, respectively. Curiously, ST7 was detected only in the Brazilian studies carried out in the Southeast region[31,32]. In the present study, we observed relatively high occurrences of these subtypes, mainly ST8 (8.8% of diabetic and 8.7% of control isolates). Interestingly, in our results, there were no mixed infections among our isolates.

Blastocystis 18S alleles retrieved for each ST showed particular alleles in patients with diabetes mellitus, such as alleles 9 and 12 (ST2), allele 37 (ST3) and allele 122 (ST6), whereas in the control group isolates, alleles 11 and 15 (ST2) and allele 134 (ST6) were identified. The genetic diversity of alleles in this study was low when compared to studies already reported in Brazil[28,31,32]. Nonetheless, it should be noted that the allele 99 (ST7) was identified, and it had not yet been described in Brazil until now. Lastly, the presence of particular alleles associated with clinical implications needs to be further studied. In addition, different subtypes of *Blastocystis* appear to modulate the intestinal microbiota differently[33], and nutritional status of the individual may be an important risk factor[34].

Globally, the prevalence of *Blastocystis* infections in the two groups was similar in the present study, corroborating the results from a study carried out in Thailand[35], that evaluated the presence of *Blastocystis* in diabetics and non-diabetics. Nevertheless, other studies indicated that type 2 diabetes in humans can be associated with compositional changes in the intestinal microbiota[36], favouring the occurrence of *Blastocystis* in this group of patients.

The present study has some limitations that may have prevented us from reaching more robust conclusions, such as the accuracy of the parasitological diagnosis, as well as the lack of clinical and epidemiological data (location, previous contact with animals, presence or absence of

symptoms etc). Sociodemographic, hygienic and clinical aspects would have been very important, especially to understand the possible association between *Blastocystis* sp. Infections and patients with diabetes mellitus.

CONCLUSIONS

In conclusion, the present study is the first report regarding *Blastocystis* sp. occurrence and subtype distribution. in patients with diabetes mellitus in Brazil. This protist was more identified in the T2D group than in the control group. Although we observed no association between *Blastocystis* infection and diabetes, the potential risk of *Blastocystis* infection should not be excluded. All things considered, our results update the distribution of the subtypes and alleles of *Blastocystis* sp. in Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank all the patients who contributed to this study.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

GBM and FMP conceived and designed the study; MCM, EAS, LVS, JEO and RMR collected the samples and carried out the clinical assessment; GBM performed the experiments; GBM, MGG and FMP carried out the analysis and interpretation of these data; GBM, FMP and RCBG drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

1. Akinbo FO, Olujobi SO, Omoregie R, Egbe E. Intestinal parasitic infections among diabetes mellitus patients. Biomark Genomic Med. 2013;5:44-7.
2. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 9ª ed. Brussels: IDF; 2019. [cited 2021 Mar 15]. Available from: www.idf.org/diabetesatlas
3. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract. 2010;87:4-14.
4. Costa AF, Flor LS, Campos MR, Oliveira AF, Costa MF, Silva RS, et al. Burden of type 2 diabetes mellitus in Brazil. Cad Saude Publica. 2017;33:e00197915.
5. Bafghi AF, Afkhami-Ardekani M, Tafti AD. Frequency distribution of intestinal parasitic infections in diabetic patients: Yazd 2013. Iran J Diabetes Obes. 2015;7:33-7.
6. Stensvold CR, Clark CG. Current status of Blastocystis: a personal view. Parasitol Int. 2016;65:763-71.
7. 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;126:11-8.
8. Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD. A summary of Blastocystis subtypes in North and South America. Parasit Vectors. 2019;12:376.
9. Alemu G, Jemal A, Zerdo Z. Intestinal parasitosis and associated factors among diabetic patients attending Arba Minch Hospital, Southern Ethiopia. BMC Res Notes. 2018;11:689.
10. Machado ER, Matos NO, Rezende SM, Carlos D, Silva TC, Rodrigues L, et al. Host-parasite interactions in individuals with Type 1 and 2 diabetes result in higher frequency of Ascaris lumbricoides and Giardia lamblia in Type 2 diabetic individuals. J Diabetes Res. 2018;2018:4238435.
11. Curval LG, França AO, Fernandes HJ, Mendes RP, Carvalho LR, Higa MG, et al. Prevalence of intestinal parasites among inmates in Midwest Brazil. PLoS One. 2017;12:e0182248.
12. Aguiar JI, Gonçalves AQ, Sodré FC, Pereira SR, Bóia MN, 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;40:631-4.
13. Luz JG, Carvalho AG, Marques AP, Marcondes AA, Roma JH, Castro LS, et al. Intestinal parasitic infections and associated risk factors in preschoolers from different urban settings in Central-Western Brazil. Asin Pac J Trop Dis. 2017;7:405-10.
14. Souza Júnior ES, Garcia-Zapata MT. Diagnóstico laboratorial de enteroparasitoses oportunistas, com ênfase nas microsporidioses humanas, em Goiânia-GO Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39:560-4.
15. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades e estados: Jataí. [cited 2021 Mar 15]. Available from: https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/go/jatai.html
16. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 4ª ed. Washington: ASM Press; 2001.
17. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of Blastocystis. Protist. 2006;157:77-85.
18. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Electropherogram quality analysis. [cited 2021 Mar 15]. Available from: http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/
19. National Center for Biotechnology Information. Blast®. [cited 2021 Mar 15]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn
20. PubMLST. Blastocystis spp. [cited 2021 Mar 15]. Available from: http://pubmlst.org/blastocystis/
21. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X:

Capítulo IV

Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol Biol Evol. 2018;35:1547-9.

22. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21:639-65.
23. Malheiros AF, Stensvold CR, Clark CG, Braga GB, Shaw JJ. 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.
24. Stensvold CR, Tan KS, Clark CG. Blastocystis. Trends Parasitol. 2020;36:315-6.
25. Stensvold CR. Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for Blastocystis subtyping. J Clin Microbiol. 2013;51:190-4.
26. Stensvold CR, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC. Detection of Blastocystis hominis in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. J Parasitol. 2006;92:1081-7.
27. Stensvold CR. Blastocystis: genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. Trop Parasitol. 2013;3:26-34.
28. Seguí R, Muñoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Koster PC, de Lucio A, et al. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of Giardia duodenalis and Blastocystis sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. Parasit Vectors. 2018;11:490.
29. Barbosa CV, Barreto MM, Andrade RJ, Sodré F, d'Avila-Levy CM, Peralta JM, et al. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): prevalence and genetic diversity of Blastocystis subtypes. PLoS One. 2018;13:e0193860.
30. Melo GB, Paula FM, Malta FM, Maruta CW, Criado PR, Castilho VL, et al. Identification of Blastocystis subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil. Parasitol Open. 2017;3:e3.
31. David EB, Guimarães S, 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.
32. Oliveira-Arbex AP, David EB, Guimarães S. Blastocystis genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. Infect Genet Evol. 2018;57:59-63.
33. Forsell J, Bengtsson-Palme J, Angelin M, Johansson A, Evengård B, Granlund M. The relation between Blastocystis and the intestinal microbiota in Swedish travellers. BMC Microbiol. 2017;17:231.
34. Lepczyńska M, Białkowska J, Dzika E, Piskorz-Ogórek K, Korycińska J. Blastocystis: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36:1531-40.
35. Popruk N, Prasongwattana S, Mahittikorn A, Palasuwan A, Popruk S, Palasuwan D. Prevalence and subtype distribution of Blastocystis infection in patients with diabetes mellitus in Thailand. Int J Environ Res Public Health. 2020;17:8877.
36. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. PLoS One. 2010;5:e9085.

Capítulo V

Manutenção *in vitro* e identificação molecular de *Blastocystis* sp. em isolados humanos brasileiros: resultados preliminares

(Culture isolation and molecular identification of Blastocystis sp. in Brazilian human isolates: preliminar results)

Capítulo V

Blastocystis sp. é descrito como um protista unicelular que coloniza o trato intestinal de humanos e animais, comumente encontrado em amostras fecais nos laboratórios clínicos[7,85]. A relevância em entender os fatores biológicos e genéticos deste organismo é premente[10,33,38].

Estudos realizados no Brasil não utilizam o cultivo *in vitro* de *Blastocystis* sp. como ferramenta de avaliação biológica, mas sim como método de diagnóstico parasitológico ou como técnica de concentração anterior a identificação molecular[40-42,71]. Assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e implementar na rotina do laboratório clínico (LIM06 do HC-FMUSP), o cultivo *in vitro* de *Blastocystis* sp. a partir de isolados humanos, avaliando o tempo de geração e as formas presentes, além da identificação dos subtipos nos isolados.

As culturas foram monitoradas a cada 72 h por microscopia de luz, onde na maioria dos isolados, a forma vacuolar foi a mais observada. Com relação a identificação molecular, foram observados os subtipos 1, 2, 3, 4 e 7. Os subtipos 4, 2 e 1 demonstraram maior adaptação à manutenção *in vitro* por terem sido mantidos por um maior tempo em cultivo, quando comparados com os outros subtipos.

Esses resultados permitiram observar o tempo de geração e o tipo de formas presentes de diferentes subtipos de *Blastocystis* a partir de isolados humanos. Com isso, reforçamos que a cultura *in vitro* pode ser utilizada em estudos futuros, como importante ferramenta para o entendimento da biologia de *Blastocystis* sp.

Capítulo V

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

JOURNAL OF THE SÃO PAULO INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

BRIEF COMMUNICATION

http://doi.org/10.1590/S1678-9946202062051

Culture isolation and molecular identification of *Blastocystis* sp. in Brazilian human isolates: preliminary results

Gessica Baptista de Melo[1], William Roldan[1], Fernanda de Mello Malta[2], Susana Angelica Zevallos Lescano[1], Vera Lúcia Castilho[3], Elenice Messias do Nascimento Gonçalves[3], Fabiana Martins de Paula[1], Ronaldo Cesar Borges Gryschek[1]

[1]Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose (LIM-06), São Paulo, São Paulo, Brazil

[2]Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical (LIM-07), São Paulo, São Paulo, Brazil

[3]Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Seção de Parasitologia, Divisão do Laboratório Central, São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to: Gessica Baptista de Melo
Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose (LIM-06),
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470,
CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brazil
Tel: +55 11 30618220

E-mail: gessicamelo@hotmail.com

Received: 20 December 2019

Accepted: 1 July 2020

ABSTRACT

Blastocystis sp. is a protist commonly found in stool samples of humans and animals. Biological and genetic factors of this organism remain controversial. The present study aimed to develop and implement the *Blastocystis in vitro* culture of Brazilian human isolates for routine use. The fecal isolates (n = 20) were maintained in our laboratory by several passages in Pavlova's medium. Cultures were monitored every 72 h by light microscopy. Genomic DNA was extracted to identify the subtypes (STs). In most isolates, the vacuolar form was prevalent. The amoeboid, granular and cystic forms were observed during *in vitro* cultivation. STs 1, 2, 3, 4 and 7 were identified. Our preliminary results show the generation time and forms present in the *in vitro* culture of *Blastocystis* subtypes isolated from Brazilian human isolates. Therefore, we emphasize the use of *in vitro* culture as a tool in future studies for the better understanding of the biological aspects of *Blastocystis* sp.

KEYWORDS: *Blastocystis sp. In vitro* culture. Subtypes. Brazil.

Blastocystis sp. is a unicellular protist that colonizes the intestinal tract of humans and is commonly found in stool samples in clinical laboratories[1,2]. Currently, studies based on the phylogenetic analysis of partial sequences of the ribosomal region (*SSU*-rDNA) classify *Blastocystis* sp. as a member of the Stramenopiles phylum[3,4]. The relationship between this organism and clinical manifestations in humans has been controversial until now[1,2].

Over the years, the number of studies on biological and genetic factors of *Blastocystis* sp. has increased[5-7]. *In vitro* culture has been evaluated as a method for the sensitive diagnosis of *Blastocystis* infections[1,8,9]. *In vitro* culture has been shown to be two to five-fold more sensitive than standard smears and formalin-ethyl acetate concentration[8] that allows the parasite purification from fecal debris. The latter can negatively influence the molecular analysis, preventing its application in the clinical diagnosis of *Blastocystis* sp.[9]. In Brazil, studies have used *in vitro* culture of *Blastocystis* sp. as a parasitological diagnostic method[10,11] and as a method for molecular typing[12-14] but has not been reported as a tool for biological evaluations. The present study aimed to develop and implement in the clinical laboratory routine, the *in vitro* culture of *Blastocystis* from Brazilian human isolates to evaluate the generation time and the forms present in the culture, and to identify the subtypes in the isolates.

The isolates were obtained from 20 fecal samples that yield positive results for *Blastocystis* sp. according to microscopic examinations held at the Section of Parasitology, Central Laboratory Division (HC/FMUSP), using the Faust, Lutz

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Capítulo V

and permanent-stained smears methods[15]. All the isolates were obtained from fresh fecal samples of asymptomatic patients. All the procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards (protocol Nº 488-701) of the Ethical Committee of the Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Brazil (HC/FMUSP). The samples were divided into two portions: one portion was cultured on the same day of collection and the other portion was stored at -20 °C for molecular analyses.

For the *in vitro* culture, approximately 200 mg of fecal samples containing a few forms (< 5 cells per field, x 400 magnification) and containing numerous forms (> 5 cells per field, x 400 magnification) were inoculated into 2-mL tubes containing Pavlova's medium[16] with 12 mg/mL ampicillin, 4 mg/mL streptomycin and 10% inactivated (50°C for 50 min) human serum. The culture tubes were incubated at 37 °C under anaerobic conditions. *Blastocystis* cultures were monitored every 72 h by light microscopy. Ten microliters of the culture were collected and *Blastocystis* forms were counted at x 400 magnification. Cultures were considered negative when *Blastocystis* sp. forms were not observed after 72 h. If *Blastocystis* sp. forms were detected, one aliquot of the culture was subcultured in fresh medium and the remaining was stored at -20 °C for molecular analyses. In addition, cell growth and viability, the type and number of *Blastocystis* forms, and the presence or absence of yeasts and bacteria before and during the subculture were evaluated.

For molecular analyses, DNA was extracted from the isolates obtained after 72 h of cultivation (exponential growth period) of fresh fecal samples, and from isolates recovered after more prolonged periods of *in vitro* cultivation, corresponding to the deceleration (reduction of cell division) and decline (initiation of cell lysis) periods. Genomic DNA of *Blastocystis* sp. was obtained using a QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. To determine the subtypes and alleles of *Blastocystis* sp., a fragment of approximately 600 bp, located at the *SSU*-rDNA, was amplified as described by Scicluna *et al.*[17]. PCR was performed following the protocol described by Melo *et al.*[18]. The amplification products were identified in 2% agarose gel electrophoresis with the addition of SYBR safe (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, USA).

Both strands of the amplicons were sequenced using the ABI PRISM® BigDye™ Terminator kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, USA), according to Sanger *et al.*[19] sequencing method. To determine the subtype and alleles of each sample, *Blastocystis* sp. sequences retrieved from the NCBI website using the BLASTn tool[20] and *Blastocystis* subtypes (18S) sequence typing[21] were aligned and compared with the sequences obtained in this study. The sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers MK511783-MK511793.

The *in vitro* culture can be used to identify *Blastocystis* sp. from fecal samples, mainly to facilitate the morphological discrimination, and has an excellent diagnostic performance compared with conventional microscopy[9]. However, many other biological aspects remain unexplored and a possible explanation is the lack of an adequate experimental model, that has not yet been well established for *Blastocystis*. In this context, the *in vitro* culture can be a promising tool for a better understanding of these aspects, such as antigen and antibody production, host-parasite interactions and strain differences[2,6,22].

The presence of a large number of forms was observed in the growing period of *in vitro* cultivation (exponential growth period), as already described in the literature[7,9]. Of the 20 isolates subjected to culture, 16 were maintained for up to 72 h. In our isolates, vacuolar, granular, amoeboid, cystic, multivacuolar and avacuolar forms were detected. In most isolates, the vacuolar form was the most prevalent form in the exponential growth period (Figure 1). The vacuolar form has been considered the typical *Blastocystis* cell form and the predominant form of the organism in culture[6-8], mainly in short-term *in vitro* cultivation[9]. In this study, the granular form was observed after 72 h but was not observed in the decline period. While the cultures were maintained, the amoeboid, granular and cystic forms were observed. Zhang *et al.*[22] described cysts in long-term cultures. In addition, the amoeboid forms have rarely been reported in cultures, mainly in fecal samples from symptomatic patients[6], however, only one isolate (IS05) was described.

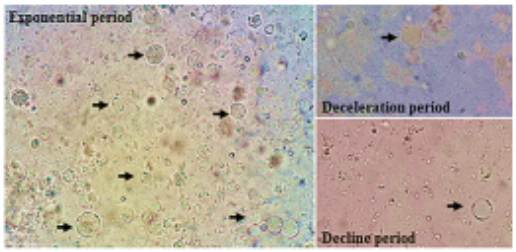

Figure 1 - Light microscopy images of the morphological forms of *Blastocystis* sp. observed in the exponential, deceleration and decline periods of *in vitro* cultivation. High-powered field (× 400 magnification).

In this study, the cultures were monitored for four months. The mean duration of *in vitro* cultures was 31.5 days (median,

Capítulo V

17 days). Some studies have reported that the growth time of *Blastocystis* cultures may vary accordimg to the culture conditions[7], and among different subtypes[23]. According to Irikov *et al.*[7], the maximum *Blastocystis* cell count occurs between 3 and 5 days of culture. In the present study, the exponential period occurred between 3 to 6 days of culture, and the deceleration period began after 10 days in most cultures. During the decline period, yeast cells were observed. Some studies suggest the use of antibiotic and anti-fungi cocktails to eliminate potential contamination by bacteria or yeast, but this does not guarantee the successful elimination of contaminants or the culture survival[6].

The cultures with the highest viability were obtained from the following isolates: IS05 (72 days), IS15 (130 days) and IS16 (34 days). They contained the largest number of forms, mainly granular forms. Although the cultivation period in this study was four months, isolate IS15 was still maintained in culture after 130 days.

Of the 16 isolates that were maintained for at least 72 h, only 14 had results confirmed by PCR, reinforcing the applicability of the culture as a diagnostic tool. On the contrary, a study by Roberts *et al.*[24] found a lower sensitivity of culture compared with PCR. In our analysis of the 14 PCR products, 11 were successfully sequenced and three samples were excluded due to the low-quality of sequences These findings are in accordance with the literature[13,14]. Table 1 details the morphological and molecular characterization of isolates cultivated *in vitro*.

Subtypes 1 (27.3%), 2 (9.1%), 3 (27.3%), 4 (27.3%), and 7 (9.1%) were identified by molecular analysis (Table 1).

Table 1 - Morphological characterization during *in vitro* cultivation in the exponential (after 72 h of cultivation), deceleration (reduction of cell division) and decline (initiation of cell lysis) periods, and molecular identification of Brazilian-human isolates of *Blastocystis*.

Isolate (IS)	*Blastocystis* forms inoculated	Type of *Blastocystis* forms			Mean number of *Blastocystis* forms	Total period of *in vitro* maintenance (days)	Similarity (%)	Subtype	Alleles	GenBank Accession number
		Exponential period	Deceleration period	Decline period						
IS1	N	Vacuolar, amoeboid, binary division	Vacuolar, amoeboid, cysts,	Vacuolar, avacuolar, yeast	2×10^6	21	99.14-100	3	37	MK511783
IS2	F	Vacuolar, avacuolar, binary division	Vacuolar, avacuolar, multivacuolar	Vacuolar, avacuolar, yeast	10^6	21	99.48-100	3	36	MK511784
IS3	F	Vacuolar, avacuolar, binary division	Vacuolar	Vacuolar, yeast	6×10^5	17	98.65-100	1	4	MK511785
IS4	F	Vacuolar, avacuolar, binary division	Vacuolar	Vacuolar, yeast	10^6	15	99.00-100	3	34	MK511786
IS5	F	Vacuolar, granular, binary division	Vacuolar, granular, amoeboid, cysts	Vacuolar, yeast	4×10^6	72	98.33-100	4	42	MK511787
IS7	F	Vacuolar	Vacuolar	Vacuolar, yeast	4×10^5	6	99.35	4	42	MK511788
IS8	N	Vacuolar	Vacuolar	Vacuolar, yeast	4×10^5	6	99.35	4	42	MK511789
IS11	F	Vacuolar	Vacuolar	Vacuolar, yeast	6×10^5	16	98.51-100	1	4	MK511790
IS12	N	Vacuolar, granular, binary division	Vacuolar, granular	Vacuolar	2×10^6	9	95.83-100	7	99	MK511791
IS15	N	Vacuolar, granular, binary division	Vacuolar, granular, cysts, schizogony	Vacuolar, granular	2×10^6	130	97.85-99.83	2	12	MK511792
IS16	F	Vacuolar, granular, binary division	Vacuolar, granular	Vacuolar	4×10^5	34	98.65-100	1	4	MK511793

F = few forms (< 5 cells per field; x 400 magnification); N = numerous forms (> 5 cells per field; x 400 magnification).

Capítulo V

The comparison of the sequences with reference ones described previously showed a similarity ranging from 95.83% to 100%. The allele assignment was obtained for all the sequences. For ST1 and ST4, all the sequences were classified as alleles 4 and 42, respectively. For ST3, three alleles were detected (34, 36 and 37), for ST2 (allele 12) and ST7 (allele 99). Variable alleles occurring within subtypes of *Blastocystis* in a given population are common[25].

Subtypes 1 (IS16) and 2 (IS15) were successfully maintained *in vitro* for 34 to 130 days, demonstrating that they were adapted to the culture conditions. In addition, we observed a shorter maintenance time of some isolates (IS7, IS8 and IS12) belonging to subtypes 4 and 7, that were maintained *in vitro* for 6 to 9 days. Furthermore, amoeboid forms were observed in IS05 (subtype 4), a characteristic that has been associated with the possible pathogenicity of *Blastocystis* sp.

Our findings show preliminary results involving the generation time and type of forms present *in vitro* during the maintenance of *Blastocystis* subtypes isolated in Brazil. Therefore, *in vitro* culture can be used as a tool in future studies, including a larger number of samples and clinical data, which will help the understanding of biological aspects of the *Blastocystis* sp.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP grant Nº 2015/18213-6) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior* (CAPES grant Nº 1749729).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. Blastocystis: to treat or not to treat. Clin Infect Dis. 2012;54:105-10.
2. Andersen LO, Stensvold CR. Blastocystis in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? J Clin Microbiol. 2016;54:524-8.
3. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. Nature. 1996;380:398.
4. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of Blastocystis hominis and of Stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. J Eukaryot Microbiol. 2002;49:42-53.
5. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen HV. Detecting Blastocystis using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;59:303-7.
6. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21:639-65.
7. Irikov OA, Antokhin AI, Romanov YA. Study of the dynamics of Blastocystis hominis reproduction in vitro. Bull Exp Biol Med. 2009;148:99-102.
8. 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;96:803-7.
9. 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. Int J Infect Dis. 2012;16:e23-8.
10. Valença-Barbosa C, de Jesus Batista R, Pereira Igreja R, d'Avila Levy CM, Werneck de Macedo H, Carneiro Santos HL. Distribution of Blastocystis subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. Parasit Vectors. 2017;10:518.
11. Barbosa CV, Barreto MM, Andrade RJ, Sodré F, d'Avila Levy CM, Peralta JM, et al. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): prevalence and genetic diversity of Blastocystis subtypes. PLoS One. 2018;13:e0193860.
12. David EB, Guimarães S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Siqueira 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.
13. Seguí R, Muñoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Köster PC, de Lucio A, et al. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of Giardia duodenalis and Blastocystis sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. Parasit Vectors. 2018;11:490.
14. Oliveira-Arbex AP, David EB, Guimarães S. Blastocystis genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. Infect Genet Evol. 2018; 57:59-63.
15. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 4ª ed. Washington, DC: ASM Press; 2001.
16. Zerpa R, Huicho L, Náquira C, Espinoza I. A simplified culture method for Blastocystis hominis. Rev Mex Patol Clin. 2000;47:17-19.
17. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of Blastocystis. Protist. 2006;157:77-85.
18. Melo GB, Paula FM, Malta FM, Maruta CW, Criado PR, Castilho VL, et al. Identification of Blastocystis subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil. Parasitol Open. 2017;3:e3.
19. Sanger F, Nicklen S, Coulson, AR. DNA sequencing with

Capítulo V

chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74:5463-7.

20. National Center for Biotechnology Information. What is tbl2asn? [cited 2020 Jul 1]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/tbl2asn2
21. University of Oxford. Blastocystis subtype (18S) and sequence typing (MLST) databases. [cited 2020 Jul 1]. Available from: http://pubmlst.org/blastocystis/
22. Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC. Morphology and reproductive mode of Blastocystis hominis in diarrhea and in vitro. Parasitol Res. 2007;101:43-51.
23. Parija SC, Jeremiah S. Blastocystis: taxonomy, biology and virulence. Trop Parasitol. 2013;3:17-25.
24. 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;84:308-12.
25. Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD. A summary of Blastocystis subtypes in North and South America. Parasit Vectors. 2019;12:376.

5. Discussão

Apesar de mais de 110 anos de debates envolvendo o gênero *Blastocystis* sp., aspectos importantes ainda permanecem por ser evidenciados. Este tem sido descrito como um dos organismos mais comuns no trato gastrointestinal de humanos e animais ao longo dos anos[10,45,47,76]. Atualmente, esse panorama de alta frequência é verificado em todo o mundo, incluindo o continente americano, onde grande parte dos países, como o Brasil, apresentam condições ideais de manutenção desse organismo. As altas taxas de pobreza, saneamento inadequado e falta de água potável em muitas regiões são fatores que podem contribuir para sua disseminação[17].

Pensando em avaliar as pesquisas voltadas para o estudo de *Blastocystis* sp. no Brasil, realizamos um estudo bibliográfico descritivo e abrangente[86]. Um dos pontos que nos chamou atenção foi o número reduzido de estudos que tinham como objetivo principal a pesquisa da positividade de *Blastocystis* sp., no geral, os estudos abordavam a detecção de parasitas intestinais em diferentes populações. Mesmo diante disso, *Blastocystis* se destacou, na grande maioria, como um dos organismos mais prevalentes nas amostras estudadas, reforçando assim sua alta ocorrência em diferentes populações[86]. Além disso, foi verificado um grande intervalo, variando de 0,5% a 86,6%, na positividade, considerando o diagnóstico parasitológico nos últimos anos (2000-2020)[86]. Essas discrepâncias podem ser decorrentes das regiões e populações estudadas, uma vez que o Brasil é um país com grandes diferenças regionais, principalmente em termos climáticos e socioeconômicos. A maior taxa de positividade ocorreu na região Norte (27,3±22,4), seguida pela Sudeste (24,5±23,8), Sul (22,2±13,7), Nordeste (16,9±20,2) e centro-oeste (13,4±17,6).

A literatura é concordante, apontando que os métodos mais sensíveis para o diagnóstico são a culturas *in vitro* e os esfregaços permanentes, por permitirem melhor visualização e diferenciação das formas de *Blastocystis* sp.; em contrapartida, necessitam de maior tempo para implementação[10-13,22]. Infelizmente, dos estudos avaliados, poucos utilizaram a cultura *in vitro* (3,8%) e os esfregaços corados permanentes (36,5%) como técnicas diagnósticas de escolha[86]. Devemos enfatizar que as colorações permanentes foram utilizadas nos sedimentos resultantes de culturas *in vitro*, e não como uma técnica de escolha inicial. Em geral, várias técnicas foram empregadas para o diagnóstico parasitológico, como exame direto, sedimentação, técnicas de concentração em éter formaldeído e esfregaços corados permanentemente[86]. Dos estudos avaliados, os métodos

mais utilizados foram a sedimentação espontânea (63,5%) e por centrifugação (71,1%). Devemos ressaltar que as técnicas que necessitam da adição de água ou solução conservante, com etapa de centrifugação, podem destruir as formas deste organismo, ocasionando resultados falso-negativos[22].

Mesmo com a possibilidade de subestimação na detecção de *Blastocystis* sp. seja pela dificuldade na observação das formas evolutivas, ou pela não escolha de técnicas parasitológicas de maior sensibilidade, o elevado número de resultados positivos tem despertado a atenção de diversos pesquisadores. Esse fato nos permite questionar se esse número elevado representa a real ocorrência de *Blastocystis*, e quais são as implicações dessa alta taxa de positividade[86].

Uma questão abordada pelo nosso grupo foi avaliar a ocorrência de *Blastocystis* sp. no complexo HC-FMUSP. Assim desenvolvemos um estudo retrospectivo e descritivo sobre a positividade de *Blastocystis* sp. nos exames parasitológicos de rotina realizados pela Seção de Parasitologia, da Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP, durante o período de 2016 a 2021 (Melo et al., 2022, capítulo 2). Os resultados dos exames parasitológicos revelaram que *Blastocystis* sp. foi observado em 69,6% das amostras de fezes. Resultado concordante com outros estudos realizados no estado de São Paulo[70,87,88]. Outro destaque, foi a elevada frequência de exames positivos nas amostras procedentes dos ambulatórios de Dermatologia, serviço de transplantes e Gastroenterologia, o que pode estar associado a uma maior solicitação de exames parasitológicos nesses serviços, e não com a infecção de *Blastocystis* sp. propriamente dita. O fato é que existe a necessidade de novos estudos para melhor compreensão do seu real papel no hospedeiro, sendo patógeno ou membro da microbiota intestinal.

O crescente uso das ferramentas moleculares como técnicas diagnósticas pode contribuir para a detecção sensível e especifica de *Blastocystis* sp. Devemos ressaltar que na maioria dos estudos realizados no Brasil, as técnicas moleculares não foram utilizadas como uma ferramenta diagnóstica, exceto para identificação dos subtipos de *Blastocystis* sp. em amostras previamente relatadas como positivas pelo diagnóstico parasitológico[86]. Possivelmente isto ocorreu devido aos elevados custos das técnicas moleculares. Em contrapartida, nosso grupo, visando investigar a ocorrência de *Blastocystis* sp., em pacientes imunocomprometidos, observou que 16,0% das amostras apresentaram DNA específico[60].

Diferentes iniciadores têm sido descritos para a detecção de DNA de *Blastocystis* sp., considerando a análise de SSU-rDNA[31,32,89]. Inicialmente, foram utilizados iniciadores específicos para cada subtipo, seguidos por um iniciador denominado *"barcode"* pan-*Blastocystis*[31,32]. Embora essa região seja a mais utilizada, outros iniciadores têm sido propostos, como revisado pelo nosso grupo[86]. Embora a biologia molecular tenha permitido claramente melhorias adicionais aos estudos diagnósticos e epidemiológicos, sua aplicação bem-sucedida depende muito da compreensão das limitações[8]. Nesse sentido, a extração de DNA de amostras fecais, a escolha do iniciador e a obtenção de sequências viáveis devem ser consideradas limitações importantes associadas ao uso de métodos baseados na PCR.

Métodos moleculares são comumente utilizados para identificar e determinar a distribuição dos diferentes subtipos. Até agora foram descritos 28 subtipos geneticamente distintos dentro do gênero *Blastocystis* (ST1-ST17, ST21, ST23-ST29 e ST30-ST32), isolados de hospedeiros humanos e não humanos[16,17]. Ressaltamos que o primeiro estudo de caracterização dos subtipos de *Blastocystis* realizado no Brasil foi de Malheiros et al.[73], analisando amostras fecais de indígenas do Estado de Mato Grosso.

Anos mais tarde, estudos focados na diversidade genética permaneciam escassos no Brasil, o que impulsionou nosso grupo a desenvolver um dos primeiros estudos sobre a identificação molecular dos subtipos de *Blastocystis* sp. circulantes na cidade de São Paulo[69]. Em nossa análise foram identificados quatro subtipos (ST1, ST2, ST3 e ST6), sendo o ST3 (60,0%) mais prevalente entre os isolados humanos, seguido pelo ST1 (22,5%). Podemos destacar também a identificação do ST6 (5%), raramente descrito em amostras humanos. Essa análise molecular inicial nos permitiu prospectar pesquisas futuras para *Blastocystis* sp. em nosso laboratório. Consequentemente, observamos que essa distribuição refletia não somente o que estava acontecendo no Brasil, mas no mundo todo[69]. Estes dados corroboram com os achados da literatura internacional publicados anteriormente, mostrando que mais de 90% dos isolados em humanos pertencem a quatro subtipos (ST1, ST2, ST3 e ST4), enquanto os demais ocorrem com maior frequência em animais[11,16,18]. Nesse contexto, podemos citar que o ST4, antes considerado restrito à Europa, foi descrito em quatro estudos no Brasil; subtipo este que tem sido associado à presença de sintomas de infecção por *Blastocystis*[11,86]. Além disso, ST7 e ST8 foram relatados nas regiões Sudeste e Sul do Brasil[86].

Talvez uma das questões mais mencionadas e ainda sem resposta, é a possibilidade de *Blastocystis* sp. ser um organismo patogênico ou ser um componente da microbiota. Embora os subtipos de *Blastocystis* sp. apresentem uma variabilidade genética significativa, ainda não se sabe se isso pode influenciar a relação parasito-hospedeiro[19]. Diversos estudos descrevem que o estado imunológico do hospedeiro, o número ou tipo de formas e a presença de determinados subtipos podem estar associados com a possível infecção causada por este organismo[10,50,76]. Por outro lado, existem na literatura vários relatos de casos sugerindo *Blastocytis* sp. como possível agente causador de sintomas inespecíficos, ou de doenças como síndrome do intestino irritável e urticária[45,47,49,53].

No contexto da urticária, ainda não se sabe se este organismo tem relação direta com manifestações alérgicas[51,52,55,79]. No Brasil, um dos estudos pioneiros foi realizado pelo nosso grupo[90], avaliando a ocorrência de *Blastocystis* sp. em pacientes com urticária. Nesse estudo observamos informações interessantes, como a positividade de *Blastocystis* sp. em 53,5% nas amostras fecais dos pacientes, além da identificação dos subtipos ST3, ST1, ST4, ST2 e ST6. Vindo de encontro com os dados por nós obtidos, Zaglool et al.[52], avaliando pacientes com sintomas alérgicos da pele, mostraram que 13,7% estavam infectados com *Blastocystis* sp. Da mesma forma, Hameed et al.[53], demonstraram que 61% dos pacientes com urticária tinham diagnóstico parasitológico positivo de *Blastocystis* sp. Existem algumas evidências de que os subtipos 2, 3 e 4 estejam etiologicamente associados à urticária[51,54,77,78]. Dominguez-Marques et al.[91], descreveram a presença de ST4 em 94,1% das amostras de pacientes sintomáticos na Espanha. Por outro lado, foi relatado que certos subtipos possam estar relacionados à ocorrência de urticária apenas em alguns grupos de pacientes, o que pode ser explicado pela alta diversidade intra-subtipo[8,51]. Com isso, o entendimento da diversidade genética de *Blastocystis* sp. pode auxiliar na compreensão da sua epidemiologia, da dinâmica populacional, além de fatores zoonótico e patogênicos.

Outro ponto a ser esclarecido no contexto da infecção por *Blastocystis* sp. é a possibilidade de doença em indivíduos imunocomprometidos. Estes indivíduos, por terem suas condições biológicas e imunológicas comprometidas, podem ser mais suscetíveis a infecções ou desenvolver importantes manifestações clínicas como diarreia ou disenteria[92]. *Blastocystis* sp. foi destacado como um importante agente causador de diarreia em transplantados[93]. Inúmeros relatos da elevada ocorrência de *Blastocystis* sp.

tem sido descritos em diferentes populações de pacientes imunocomprometidos, não se conhecendo ao certo qual a(s) implicação(ões) clínica(s)[61-63,93,94]. Assim nosso grupo analisou amostras de indivíduos com diabetes e candidatos a transplantes, respectivamente[60,95].

Com o propósito de avaliar a ocorrência de *Blastocystis* sp. em amostras fecais de candidatos a transplantes, o nosso grupo[60] verificou que 16,0% das amostras apresentaram amplificação de DNA específico. Entre os subtipos identificados estão ST1, ST2, ST3 e ST7. Vale lembrar que esse estudo foi o pioneiro a realizar a caracterização molecular de isolados de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes. Com tudo, novas pesquisas são necessárias para entender o real papel de *Blastocystis* sp. no âmbito de pacientes imunocomprometidos.

O fato de certas infecções parasitárias serem mais comuns em indivíduos diabéticos do que não diabéticos tem sido frequentemente avaliado[65-67], principalmente pela possibilidade de disfunções imunológicas em diabéticos favorecer o desenvolvimento de infecções parasitárias graves[96]. Por outro lado, a ocorrência de *Blastocystis* sp. nesta população ainda é pouco estudada. Neste contexto, utilizamos a diagnóstico molecular como ferramenta para a detecção de DNA de *Blastocystis* sp. em indivíduos diabéticos e não diabéticos[95]. Nesse estudo, para nossa surpresa, observamos uma positividade de 44,4% e 34,2% nos indivíduos diabéticos e não diabéticos, respectivamente. Considerando os dois grupos foram identificados os subtipos 1, 2, 3, 6, 7 e 8.

Uma possibilidade de entendimento de aspectos biológicos de um organismo é realizando a sua manutenção *in vivo* e *in vitro*. No contexto de *Blastocystis* sp. poucos foram os estudos voltados para estes aspectos[23,38,39]. No Brasil, somente o estudo de Pavanelli et al.[15], utilizou a cultura in vitro, não como manutenção de subtipos, mas para a preparação de inóculos a serem utilizados em modelos experimentais. Este fato nos motivou a implementar a manutenção *in vitro* de *Blastocystis* sp. em nosso laboratório de isolados humanos[97]. Observamos diferentes tempos de manutenção e formas evolutivas nos isolados. Foram mantidos por mais tempo, o ST2 (130 dias), ST4 (72 dias) e ST1 (34 dias), indicando melhor adaptação às condições de cultura. Embora entre os isolados tenha sido identificado o ST3, considerado um subtipo antroponótico[11], este foi mantido por menor período (21dias). Os presentes resultados confirmaram a utilidade da cultura

in vitro como método diagnóstico, bem como uma ferramenta importante para avaliação de aspectos biológicos e patogênicos de *Blastocystis* sp.

Até o momento maioria das pesquisas sobre *Blastocystis* sp. teve como objetivo identificar o papel do parasita no desenvolvimento da doença. Ainda assim, décadas de pesquisa resultaram em resultados ambíguos e conflitantes[7]. Nossos estudos estão de acordo com estas observações, nos quais muitos aspectos não foram compreendidos. Em primeiro, em relação a urticaria, não foi possível estabelecer uma relação direta com a infecção de *Blastocystis*, seja pela falta de um grupo controle, ou falta dos dados clínicos, porém possibilitou a identificação de grande diversidade intra e inter-subtipos circulantes nesses pacientes, até então não mencionada no Brasil. Em segundo, em relação aos diabéticos, embora este protista tenha sido mais prevalente no grupo de diabéticos não podemos afirmar uma relação entre diabetes e *Blastocystis* sp. No entanto estes resultados agregam conhecimento sobre a distribuição de subtipos e alelos de *Blastocystis* sp. no Brasil. Em terceiro, nossos dados sobre a manutenção *in vitro* de isolados humanos corresponde a possibilidade de entendimento de aspectos biológicos até então pouco explorados, sobretudo em relação a observação de tempos de cultivo e de formas evolutivas presentes nos diferentes subtipos e alelos. E, por fim, não podemos esquecer de que tanto a revisão da literatura sobre a pesquisa de *Blastocystis* sp. no Brasil quanto a avaliação dos dados da sua positividade no complexo HC-FMUSP reforçam a elevada frequência deste organismo em nosso meio e aponta para a necessidade da realização de novos estudos pare entender a sua real significância clínica.

Nos parece claro que a capacidade um organismo muito frequente em amostras fezes causar doença pode estar diretamente relacionada a circunstâncias específicas, como a presença de determinados componentes na microbiota, bem como condições específicas do hospedeiro, além da presença de determinado subtipo e alelo. Assim acreditamos que estudos sobre as interações entre *Blastocystis* sp. e a microbiota intestinal, sobretudo associada a hospedeiros em múltiplas condições clínicas, possa contribuir para entender o impacto de *Blastocystis* sp. nos agravos à saúde.

6. Conclusões

1. Nossos achados representam um panorama das pesquisas de *Blastocystis* sp., no Brasil. Destacam a importância do diagnóstico parasitológico para a detecção desse organismo, bem como, ressaltam a necessidade de novos estudos no contexto da epidemiologia molecular para melhorar o conhecimento sobre a diversidade genética de *Blastocystis* sp.

2. Evidencia a alta positividade para *Blastocystis* sp. em amostras analisadas no HC-FMUSP, e reforça a necessidade do entendimento da importância desse achado no contexto de saúde pública.

3. Reforça a alta positividade de *Blastocystis* sp. em indivíduos com urticaria acompanhados no Ambulatório de Dermatologia do HC/FMUSP. Destaca a presença dos subtipos 1, 2, 3, 4 e 6, e a maior frequência dos alelos a4 (ST1), a34 e a36 (ST3), e a42 (ST4). Nossas análises permitiram uma avaliação inicial da presença de STs/alelos de *Blastocystis* em pacientes com urticária na cidade de São Paulo, Brasil.

4. Demonstra a alta ocorrência de *Blastocystis* sp. em isolados de indivíduos com diabetes mellitus da cidade de Jataí, Goiás. A caracterização molecular demonstrou os subtipos (ST1, ST2, ST3, ST6, ST7 e ST8) entre os isolados. Destaca que não houve associação entre infecção por *Blastocytsis* sp. e diabetes, porém o risco potencial de infecção por este organismo não deve ser excluído.

5. Nossos achados demonstraram o cultivo *in vitro* doe diferentes subtipos de *Blastocystis* provenientes de isolados humanos. Destaca a utilização do cultivo *in vitro* como ferramenta em estudos futuros, para auxiliar no entendimento de aspectos biológicos que ainda permanecem incertos de *Blastocystis* sp.

Referências bibliográficas

1. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*--past and future. Clin Microbiol Rev. 1991; 4(1):61-79.
2. Alexeieff, A. Sur la nature des formations dites "Kystes de Trichomonas intestinalis." C R Soc Biol. 1911;71:296-98.
3. Brumpt, E. *Blastocystis hominis* N. sp. et formes voisines. Bull Soc Pathol Exot. 1912;5:725-30.
4. Zierdt CH, Rude WS, Bull BS. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. Am J Clin Pathol. 1967;48(5):495-501.
5. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. Nature. 1996;4:380-98.
6. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H. Phylogenetic position of B*lastocystis hominis* and of Stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(1):42-53.
7. Andersen LOB, Stensvold CR. *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? Journal of clinical microbiology. 2016;54(3):524-528.
8. Stensvold CR. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. Tropic Parasito. 2013;3(1):26-34.
9. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. Advances in parasitology. 2013;82:1-32.
10. Tan KS. New insights on classification, identification and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):639-65.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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
16. Higuera A, Herrera G, Jimenez P, García-Corredor D, Pulido-Medellín M, Bulla-Castañeda DM, et al. Identification of Multiple *Blastocystis* Subtypes in Domestic Animals From Colombia Using Amplicon-Based Next Generation Sequencing. Front. Vet. Sci. 2021;8:732129.
17. Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. Parasites & Vectors. 2019;12(1):1-9.

18. Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, et al. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. Infection, Genetics and Evolution. 2016;41:32-35.

19. Yoshikawa H, Dogruman-Al 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.

20. Yason J.A., Liang Y.R., Png C.W, Zhang Y, Tan KSW. Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: in vitro and in vivo studies. Microbiome. 2019;7**:**30.

21. Ajjampur SS, Tan KS. Pathogenic mechanisms in *Blastocysti*s spp. - Interpreting results from in vitro and in vivo studies. Parasitol Int. 2016;65(6):772-779.

22. 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.

23. Zhang X, Qiao J, Wu X, Da R, Zhao L, Wei Z. In vitro culture of *Blastocytis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. Inter J Infect Dis. 2012. 16(1):e23-8.

24. 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.

25. Zierdt CH, Zierdt WS, Nagy B. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. J. Parasitol. 1995;81:1

26. 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.
27. Dogruman-Al F, Turk S, Adiyaman-Korkmaz G, Hananel A, Levi L, Kopelowits J, et al. A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. Parasitol Res. 2015;114:495-500.
28. 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.
29. 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.
30. 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. 2004;94(6):391-6.
31. 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.
32. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. Protist. 2006;157(1):77-85.
33. 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.

34. Sullivan CB, Diggle MA, Clarke SC. Multilocus sequence typing: Data analysis in clinical microbiology and public health. Mol Biotechnol. 2005 Mar;29(3):245-54.

35. Stensvold CR. Thinking *Blastocystis* out of box. Cell. 2012;28(8):305.

36. Maiden MCJ, Bygraves JÁ, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:3140-3145.

37. 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.

38. Irikov OA, Antokhin AI, Romanov YA. Study of the dynamics of *Blastocystis hominis* reproduction in vitro. Bull Exp Biol Med. 2009;148:99-102.

39. Zerpa L, Huicho L, Naquira C, Espinoza I. A simplified culture method *for Blastocystis hominis*. Rev Mex Patol Clin. 2000;47(1):17-9.

40. Barbosa CV, Barreto MM, Andrade RJ, Sodré F, d'Avila-Levy CM, Peralta JM, et al. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. PLoS One. 2018; 13: e0193860.

41. Oliveira-Arbex AP, David ÉB, Guimarães S. *Blastocystis* genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. Infect Genet Evol. 2018; 57:59-63.

42. Seguí R, Muñoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Koster PC, Lucio A, et al. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology

of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. Parasit Vectors. 2018; 11:490.

43. 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.
44. Suresh K, Venilla GD, Tan TC, Rohela M. In vivo encystation of Blastocystis hominis. Parasitol Res. 2009;104(6):1373-80.
45. Deng L, Wojciech L, Gascoigne NR, Peng G, Tan KS. New insights into the interactions between Blastocystis, the gut microbiota, and host immunity. PLoS pathogens. 2021;17(2):e1009253.
46. Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, Kimata I. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. Parasitol Int. 2007;56(2):107-12.
47. Scanlan PD. *Blastocystis:* past pitfalls and future perspectives. Trends Parasitol. 2012;28(8):327-34.
48. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. Gut Pathogens. 2014;6:17.
49. 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.
50. Popruk S, Udonsom R, Koompapong 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.
51. Lepczyńska M, Chen WC, Dzika E. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? Int J Dermatol. 2016;55(3):259-66.

52. Zaglool DA, Khodari YA, Farooq MU. *Blastocystis hominis* and allergic skin disease; a single centre experience. J Health Sci. 2012;2(1), 66-9.

53. Hameed DM, Hassanin OM, Zuel-fakkar NM. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. Parasitol Res. 2011;108:553-60.

54. 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.

55. 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.

56. Lynch NR, Hagel IA, Palenque ME, Di Prisco MC, Escudero JE, Corao LA et al. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. J Allergy Clin Immunol. 1998; 101:217-21.

57. Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li Xiaobo, et al. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. Parasitol Res. 2006;99:597-601.

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

59. 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.

60. Silva MDRA, Melo GB, Malta FM, Abdala E, Costa SF, Pierrotti LC, et al. Subtypes of *Blastocystis* sp. isolated in fecal samples from transplant candidates in São Paulo, Brazil. Parasite Epidemiol Control. 2019;27:8:e00128.

61. Zhang W, Ren G, Zhao W, Yang Z, Shen Y, Sun Y, et al. Genotyping of Enterocytozoon bieneusi and Subtyping of *Blastocystis* in Cancer Patients: Relationship to Diarrhea and Assessment of Zoonotic Transmission. Front. Microbiol. 2017;8:1835.
62. Rasti S, Hassanzadeh M, Hooshyar H, Momen-Heravi M, Mousavi SGA, Abdoli A. Intestinal parasitic infections in different groups of immunocompromised patients in Kashan and Qom cities, central Iran. Scand J Gastroenterol. 2017 Jun-Jul;52(6-7):738-741.
63. Kulik RA, Falavigna DL, Nishi L, Araujo SM. *Blastocystis* sp. and other intestinal parasites in hemodialysis patients. Braz J Infect Dis. 2008 Aug;12(4):338-41.
64. Solomayer EF, Feuerer M, Bai L, Umansky V, Beckhove P, Meyberg GC, et al. Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer. Clin. Cancer. Res. 2003;9:174–180
65. Akinbo FO, Olujobi SO, Omoregie R, Egbe E. Intestinal parasitic infections among diabetes mellitus patients. Biomark Genomic Med. 2013;5:44–47.
66. Bafghi AF, Afkhami-Ardekani M, Tafti AD. Frequency distribution of intestinal parasitic infections in diabetic patients: Yazd 2013. Iran J Diabetes Obes. 2015;7:33–37.
67. Machado ER, Matos NO, Rezende SM, Carlos D, Silva TC, Rodrigues L, et al. Host-parasite interactions in individuals with Type 1 and 2 diabetes result in higher frequency of Ascaris lumbricoides and Giardia lamblia in Type 2 diabetic individuals. Diabetes Res. 2018;6:4238435.

68. Guimarães S, Sogayar MI. *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(3):427-9.

69. 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:e3.

70. 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.

71. David ÉB, 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.

72. Gil FF, Barros MJ, Macedo NA, Júnior CG, Redoan R, Busatti H, et al. Prevalence of intestinal parasitism and associated symptomatology among hemodialysis patients. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55(2):69-74.

73. 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):1050-3.

74. Borges JD, Alarcón RS, Neto VA, Gakiya E. [Intestinal parasitosis in Indians of the Mapuera community (Oriximiná, State of Pará, Brazil): high prevalence

of *Blastocystis hominis* and finding of *Cryptosporidium* sp and *Cyclospora cayetanensis.* Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(3):348-50.

75. 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.
76. Kurt O, Al FD, Tanyuksel M. Eradication of *Blastocystis* in humans: really necessary for all? Parasitol Int. 2016;65(6):797-801.
77. 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.
78. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzen 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.
79. Gupta R, Parsi K. Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis.* Australas J Dermato. 2006;47(2):117-9.
80. Valsecchi R, Leghissa P, Greco V. Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection. Acta Derm Venereol. 2004;84(4):322-3.
81. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 9th ed. Brussels: IDF; 2019. [cited 2021 Mar 15]. Available from: www.idf.org/diabetesatlas» www.idf.org/diabetesatlas
82. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract. 2010;87:4-14.
83. Costa AF, Flor LS, Campos MR, Oliveira AF, Costa MF, Silva RS, et al. Burden of type 2 diabetes mellitus in Brazil. Cad Saude Publica. 2017;33:e00197915.

84. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis:* A personal view. Parasitol Int. 2016;65(6):763-771.

85. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. *Blastocystis:* To treat or not to treat. Clin Infect Dise. 2012;54(1):105-10.

86. Melo GB, Bosqui LR, Costa IND, Paula FM, Gryschek RCB. Current status of research regarding *Blastocystis* sp., an enigmatic protist, in Brazil. Clinics (Sao Paulo). 2021;5(76):e2489.

87. Santos BM, Soares FA, Rosa SL, Gomes DCF, Suzuki CTN, Nagata WB, et al. A study of intestinal parasites in children of an urban region with excellent sanitary condition reveals high occurrence of *Blastocystis* spp. Rev Patol Trop. 2017;46(4):321-30.

88. Amato Neto V, Rodríguez Alarcon RS, Gakiya E, Ferreira CS, Bezerra RC, dos Santos AG. Elevada porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo, SP [Blastocystosis: a high proportion of cases found in school children of São Paulo, State of São Paulo, Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37(4):354-6.

89. 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(8):771-8.

90. Melo GB, Malta FM, Maruta CW, Criado PR, Castilho VLP, Goncalves EMDN, et al. Characterization of subtypes of *Blastocystis* sp. isolated from patients with urticaria, São Paulo, Brazil. Parasite Epidemiol Control. 2019;7:e00124.

91. Domínguez-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(4):949-55.

92. Azami M, Sharifi M, Hejazi SH, Tazhibi M. Intestinal parasitic infections in renal transplant recipients. Braz. J. Infect. Dis. 2010;14:15–18.
93. Rao K, Sekar U, Iraivan KT, Abraham G, Soundararajan P. *Blastocystis hominis* - an emerging cause of diarrhea in renal transplant recipients. J. Assoc. Physicians India. 2003;51:719–721.
94. Naeini AE, Sharifi M, Shahidi S, Taheri S, Seirafian S, Taheri D, et al. Intestinal fungal and parasitic infections in kidney transplant recipients: a multi-center study. Saudi J. Kidney Dis. Transpl. 2012;23:677–683.
95. Melo GB, Mazzaro MC, Gomes-Gouvêa MS, Santos EA, Souza LV, Elias-Oliveira J, et al. *Blastocystis* subtypes in patients with diabetes mellitus from the Midwest region of Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2021;63:e32.
96. Alemu G, Jemal A, Zerdo Z. Intestinal parasitoses and associated factors among diabetic patients attending Arba Minch Hospital, Southern Ethiopia. BMC Res Notes. 2018;11:689.
97. Melo GB, Roldan W, Malta FM, Lescano SAZ, Castilho VL, Gonçalves EMN, et al. Culture isolatioon and molecular identification of *Blastocystis* sp. in Brazilian human isolates: preliminary results. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2020;62:e51.

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE BLASTOCYSTIS spp. EM PACIENTES COM URTICÁRIA CRÔNICA
Pesquisador: RONALDO CESAR BORGES GRYSCHEK
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 20886213.2.0000.0068
Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.325.341

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 patognéticos da urticária crônica.

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 14 de Maio de 2019

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

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 Gryschek **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 Gryschek
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 patognéticos da urticária crônica.

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Texto adequado.

Recomendações: Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências. Os pesquisadores enviaram novo texto de TCLE.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)**apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 11 de Dezembro de 2013

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pequisa - CAPPesq

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