



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Marina Araújo da Silva

**PADRONIZAÇÃO DE *NESTED* PCR PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE *Giardia lamblia* E *Blastocystis* sp. A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS DE
CRIANÇAS DA COMUNIDADE DA SERRINHA EM FLORIANÓPOLIS –SC**

Florianópolis

2022

Marina Araújo da Silva

**PADRONIZAÇÃO DE *NESTED* PCR PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE *Giardia lamblia* E *Blastocystis* sp. A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS DE
CRIANÇAS DA COMUNIDADE DA SERRINHA EM FLORIANÓPOLIS –SC**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a conclusão da Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Karin Silva Caumo

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem ele nada seria possível.

À minha base familiar, mãe e vó, que me apoiaram incansavelmente em toda essa trajetória; que participaram dos momentos de aflição com acolhimento e amor; e comemoraram as pequenas conquistas durante o caminho. Serei eternamente grata pela dedicação e abnegação. Espero um dia ser tanto para vocês, como são para mim.

Aos meus tios, que sempre marcaram presença nos momentos cruciais, com conselhos sábios e amorosos, e palavras de incentivo.

À minha melhor amiga e companheira de vida, pelo apoio, amor, e paciência, principalmente em momentos de pequenos surtos. Sem você, o final dessa caminhada não existiria.

Aos meus professores e mestres que ao emanar conhecimento, conseguiram me encantar e me fizeram amar o mundo da ciência.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório, por me acolherem e me deixaram fazer parte da família LADIPE.

Aos meus amigos e familiares que partilharam momentos bons e ruins, com compreensão e carinho, que entenderam a ausência e sem criticar enviavam boas energias e muitas vezes um chocolate.

A todos que fizeram parte, essa conquista não é minha sem antes ser nossa.

RESUMO

Giardia lamblia e *Blastocystis* sp. estão entre os protozoários mais frequentemente encontrados em amostras fecais humanas e estão entre os principais agentes causadores de diarreia em crianças, principalmente as que vivem em situação de vulnerabilidade hídrica e alimentar. Nos últimos anos, a elevada positividade de *Blastocystis* sp. em amostras fecais da rotina laboratorial e inquéritos coproparasitológicos, desperta a necessidade de estudos de caracterização molecular para melhor compreensão epidemiológica. Estudos têm demonstrado a implementação de ferramentas moleculares para a compreensão de aspectos epidemiológicos, como a distribuição de subtipos e assembleias de *Blastocystis* sp. e *G. lamblia*, respectivamente. Esses protozoários são de transmissão fecal-oral através da água e/ou alimentos contaminados e; também apresentam caráter zoonótico. O conhecimento da ocorrência de parasitoses e a compreensão molecular permite caracterizar o perfil epidemiológico que contemple informações importantes para posterior controle e prevenção das mesmas. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo realizar a padronização de *Nested* PCR para identificação e caracterização molecular dos protozoários *G. lamblia* e *Blastocystis* sp. a partir de amostras fecais de crianças da comunidade da Serrinha de Florianópolis – SC. Foram selecionadas as amostras fecais positivas por microscopia para *G. lamblia* e *Blastocystis* sp., para extração de DNA e otimização das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), resultando na observação da amplificação de regiões conservadas para posterior sequenciamento e classificação das subtipos e assembleias. Os protocolos de PCR utilizados foram de *nested* PCR, contemplando dois pares de oligonucleotídeos para cada parasito, sendo: RD3 e RD5 para a primeira PCR de *Blastocystis* sp. e BsRDsF e BhRDr9R para a segunda PCR, de acordo com Scicluna et al., 2006. Já para *G. lamblia*, foi utilizado AL3543 e AL3546 para a primeira PCR e para a segunda reação foi utilizado AL3544 e AL3545, de acordo com Sulaiman et al., (2003). Como resultado, foi possível observar produtos de amplificação com fragmentos de tamanhos correspondentes ao esperado e descrito na literatura, mesmo com a utilização de kits de extração não específicos para amostras fecais. As amostras positivas para *Blastocystis* sp. analisadas por microscopia óptica, obtiveram 84,8% de amplificação por *nested* PCR. Já as amostras positivas para *G. lamblia* por microscopia óptica, obtiveram 80% de amplificação por *nested* PCR. Porém, devido ao tempo reduzido para execução deste trabalho, não foi possível realizar o sequenciamento e caracterização genotípica, deixando para avaliação futura pelo Laboratório

de Investigação Aplicada a Protozoários Emergentes (LADIPE) no HU/UFSC. O presente estudo foi o começo de um estudo molecular, que poderá contribuir para maior compreensão da distribuição de assembleias e subtipos dos protozoários estudados, assim como o entendimento epidemiológico e vigilância para futuro controle de fontes de risco que causam insegurança hídrica e alimentar e afetam diretamente a saúde da população.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular; Protozoários patogênicos; *Blastocystis* sp.; *Giardia lamblia*, *nested* PCR.

ABSTRACT

Giardia lamblia and *Blastocystis* sp. are among the most frequently found protozoa in human fecal samples and are among the main agents that cause diarrhea in children, especially those living in situations of water and food vulnerability. In recent years, the high positivity of *Blastocystis* sp. in routine laboratory fecal samples and coproparasitological surveys, raises the need for molecular characterization studies for a better epidemiological understanding. Studies have demonstrated the implementation of molecular tools to understand epidemiological aspects, such as the distribution of subtypes and assemblages of *Blastocystis* sp. and *G. lamblia*, respectively. These protozoa are transmitted fecal-orally through contaminated water and/or food and; also have a zoonotic character. The knowledge of the incidence of parasitic diseases and the molecular understanding allows characterizing an epidemiological profile of parasites that includes important information for subsequent control and prevention. In this sense, the present work aims to perform the standardization of Nested PCR for identification and molecular characterization of the protozoa *G. lamblia* and *Blastocystis* sp. from fecal samples of children from the community of Serrinha de Florianópolis - SFecal samples positive by microscopy for *G. lamblia* and *Blastocystis* sp. were selected for DNA extraction and optimization of Polymerase Chain Reactions (PCR), resulting in the observation of amplification of conserved regions for subsequent sequencing and classification of subtypes and assemblages. The PCR protocols used were nested PCR, contemplating two pairs of oligonucleotides for each parasite, namely: RD3 and RD5 for the first PCR of *Blastocystis* sp. and BsRDsF and BhRDr9R for the second PCR, according to Scicluna et al., 2006. For *G. lamblia*, AL3543 and AL3546 were used for the first PCR and for the second reaction, AL3544 and AL3545 were used, according to Sulaiman et al., (2003). As a result, it was possible to observe amplification products with fragment sizes corresponding to those expected and described in the literature, even with the use of non-specific extraction kits for fecal samples. Positive samples for *Blastocystis* sp. analyzed by optical microscopy, obtained 84.8% amplification by nested PCR. The positive samples for *G. lamblia* by optical microscopy, obtained 80% amplification by nested PCR. However, due to the reduced time to carry out this work, it was not possible to carry out the sequencing and genotypic characterization, leaving it for future evaluation by the Laboratory of Applied Investigation to Emerging Protozoa (LADIPE) at HU/UFSC. The present study was the beginning of a molecular study, which could contribute to a better understanding of the distribution of protozoan assemblages and subtypes

studied, as well as epidemiological understanding and surveillance for future control of risk sources that cause water and food insecurity and directly affect the health of the population.

Keywords: Molecular epidemiology; Pathogenic protozoa; *Blastocystis* sp.; *Giardia lamblia*, nested PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Segundo ciclo biológico <i>Blastocystis</i> sp. aprovado pelo CDC – 2018.....	23
Figura 2 – Último ciclo evolutivo <i>Blastocystis</i> sp. aprovado pelo CDC em 2019.....	24
Figura 3 – Subtipos relacionados a relatos de hospedeiros e via de transmissão.....	26
Figura 4 - Estudo <i>in vitro</i> de cultura intestinal de Stensvold e colaboradores, 2020.....	28
Figura 5 - Taxas de prevalência dos subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. em humanos em diferentes regiões do mundo, 2021.....	29
Figura 6 - Taxas de prevalência dos subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. relacionados ao aparecimento de sintomas nas diferentes regiões do mundo, 2021.....	30
Figura 7 - Taxas de prevalência dos Subtipos no Brasil, 2020.....	30
Figura 8 - Morfologia diferencial <i>Blastocystis</i> sp. (10 µm)	34
Figura 9 – Morfologia diferencial <i>Giardia</i> spp. (10µm).....	40
Figura 10 – Ciclo evolutivo de <i>Giardia</i> spp. aprovado pelo CDC.....	41
Figura 11 – Espécies relacionados a relatos em hospedeiros.....	42
Figura 12 – Assembleias de <i>Giardia lamblia</i> relacionados a relatos em hospedeiros.....	43
Figura 13 – Assembleias e subassembleia de <i>G. lamblia</i> relacionadas a relatos em hospedeiros.....	44
Figura 14 – Prevalência de Giardiase a partir de estudos de prevalência nos estados Brasileiros, 2017.....	48
Figura 15 – Morfologia diferencial do cisto de <i>G. lamblia</i> (10µm).....	52
Figura 16 – Morfologia diferencial em coloração tricrômica de <i>G. lamblia</i> (10µm).....	52
Figura 17 – Semi-quantificação de <i>Blastocystis</i> sp.....	59
Figura 18 – Resumo do protocolo kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System – Promega, USA.....	61
Figura 19 – Resumo do protocolo kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini - Qiagen, Hilden, Germany.....	61

Figura 20 – Protocolo kit de purificação Mebep Bioscience.....	69
Figura 21 – Localização Casa São José.....	70
Figura 22 – Localização Creche São Francisco de Assis.....	70
Figura 23 – Fluxograma e positividade das amostras.....	71
Figura 24 – Gel de agarose dos produtos de PCR com os iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado sem glicerol realizado com DNA das amostras positivas para <i>Blastocystis</i> sp. a uma temperatura de anelamento de 60°C.....	77
Figura 25 – Gel de agarose dos produtos de PCR com os iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado sem glicerol realizado com DNA das amostras positivas para <i>Blastocystis</i> sp. a uma temperatura de anelamento de 60°C.....	78
Figura 26 – Gel de agarose dos produtos de PCR com os iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol realizado com DNA das amostras positivas para <i>Blastocystis</i> sp. a uma temperatura de anelamento de 60°C.....	79
Figura 27 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol realizado com DNA das amostras positivas para <i>Blastocystis</i> sp. a uma temperatura de anelamento de 60°C.....	80
Figura 28 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol realizado com DNA das amostras positivas para <i>Blastocystis</i> sp. a uma temperatura de anelamento de 62°C.....	80
Figura 29 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol a temperatura de 60°C de anelamento, testando concentrações de 3 µL e 6 µL de DNA das amostras positivas para <i>Blastocystis</i> sp.....	81
Figura 30 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) utilizando os iniciadores BsRDsF e BhRDr9R para amplificação do gene SSU rDNA de 600 pb de <i>Blastocystis</i> sp. utilizando glicerol e temperatura de anelamento 60°C.....	82
Figura 31 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) utilizando os iniciadores BsRDsF e BhRDr9R para amplificação do gene SSU rDNA de 600 pb de <i>Blastocystis</i> sp. utilizando glicerol e temperatura de anelamento 60°C.....	83

- Figura 32 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da primeira PCR com os iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol e temperatura de anelamento de 60°C em amostras de DNA positivas para *Blastocystis* sp.....85
- Figura 33 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) utilizando os iniciadores BsRDsF e BhRDr9R do protocolo otimizado com glicerol e temperatura de 60°C para amplificação do fragmento de 600 pb de *Blastocystis* sp.....86
- Figura 34 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores AL3543 e AL3546 do protocolo otimizado sem glicerol com DNA das amostras positivas para *G. lamblia* a uma temperatura de anelamento de 50°C.....87
- Figura 35 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores AL3543 e AL3546 do protocolo otimizado com glicerol com DNA das amostras positivas para *G. lamblia* a uma temperatura de anelamento de 50°C.....88
- Figura 36 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores AL3543 e AL3546 do protocolo otimizado com glicerol das amostras positivas para *G. lamblia* a uma temperatura de anelamento de 53°C.....89
- Figura 37 – Fotografias do gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores AL3543 e AL3546 do protocolo otimizado com glicerol a temperatura de 53°C de anelamento, testando volumes de 3 µL e 6 µL de DNA das amostras positivas para *G. lamblia*.....90
- Figura 38 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) para amplificação do gene TPI de 530 pb de *G. lamblia* sem glicerol e temperatura de anelamento de 50°C.....91
- Figura 39 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) para amplificação do gene TPI de 530 pb de *G. lamblia* sem glicerol e temperatura de anelamento de 57°C.....91
- Figura 40 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) para amplificação do gene TPI de 530 pb de *G. lamblia* com glicerol e temperatura de anelamento de 55°C.....92

Figura 41 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) para amplificação do gene TPI de 530 pb de *G. lamblia* com glicerol e temperatura de anelamento de 57°C.....93

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Formas evolutivas do <i>Blastocystis</i> sp. e suas características.....	21
Quadro 2 – Formas evolutivas da <i>Giardia</i> spp. e características.....	39
Tabela 1 – Estudos experimentais com ou sem associação aos subtipos de <i>Blastocystis</i> sp.....	27
Tabela 2 – Morfologia diferencial de <i>Blastocystis</i> sp. em espécimes de fezes de humanos.....	33
Tabela 3 –Morfologia diferencial de <i>G. lamblia</i> em espécimes de fezes de humanos.....	51
Tabela 4 – Posologias do Metronidazol.....	55
Tabela 5 – Posologia do Nitazoxanida.....	56
Tabela 6 – Oligonucleotídeos iniciadores de <i>Blastocystis</i> sp.....	62
Tabela 7 – Oligonucleotídeos iniciadores de <i>G. lamblia</i>	63
Tabela 8 - Reagentes utilizados nas reações de PCR para <i>Blastocystis</i> sp.....	64
Tabela 9 - Reagentes utilizados nas reações de PCR para <i>G. lamblia</i>	65
Tabela 10 - Ciclos e temperaturas para a Primeira PCR de <i>Blastocystis</i> sp.....	66
Tabela 11 - Ciclos e temperaturas para a Segunda PCR de <i>Blastocystis</i> sp.....	66
Tabela 12 - Ciclos e temperaturas para a Primeira PCR de <i>G. lamblia</i>	67
Tabela 13 - Ciclos e temperaturas para a Segunda PCR de <i>G. lamblia</i>	67
Tabela 14 - Primeira PCR de <i>Blastocystis</i> sp. e <i>G. lamblia</i>	68
Tabela 15 - Segunda PCR de <i>Blastocystis</i> sp. e <i>G. lamblia</i>	68
Tabela 16 - Resultado da semi-quantificação de <i>Blastocystis</i> sp.....	72
Tabela 17 - Quantificação de DNA de <i>Blastocystis</i> sp. por espectrofotômetro (PROMEGA).....	74
Tabela 18 - Quantificação de DNA de <i>G. lamblia</i> por espectrofotômetro (PROMEGA).....	75
Tabela 19 - Quantificação de DNA de <i>Blastocystis</i> sp. por espectrofotômetro (QIAGEN).....	76
Tabela 20 - Quantificação de DNA de <i>G. lamblia</i> por espectrofotômetro (QIAGEN).....	76

Tabela 21 - Quantificação de DNA de *Blastocystis* sp. por espectrofotômetro após purificação.....95

Tabela 22 - Quantificação de DNA de *Giardia lamblia* por espectrofotômetro após purificação.....95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS Organização Mundial da Saúde

CDC do inglês Centers for Disease Control and Prevention

FDA do inglês *Food and Drug Administration*

WHO do inglês *World Health Organization*

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

DNA do inglês *Desoxiribonucleic Acid*

PCR do inglês *Polymerase Chain Reaction*

RNA do inglês *Ribonucleic Acid*

Pb Pares de base

M Molar

mL Mililitro

mM Milimolar

Ng Nanograma

nM Nanomolar

µl Microlitro

Tm° do inglês Primer Melting Temperature (Temperatura de hibridização do primer)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 <i>Blastocystis</i> sp.	20
3.1.1 PATOGÊNESE E CONTROVÉRSIAS RELACIONADAS	24
3.1.2 EPIDEMIOLOGIA	28
3.1.3 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO.....	32
3.1.3.1 Manifestações clínicas	32
3.1.3.2 Métodos de diagnóstico	33
3.1.3.2.1 Amplificação de ácidos nucleicos	34
3.1.4 TRATAMENTO	36
3.2 <i>Giardia lamblia</i>	37
3.2.1 PATOGÊNESE.....	41
3.2.2 EPIDEMIOLOGIA	45
3.2.3 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO.....	49
3.2.3.1 Manifestações clínicas	49
3.2.3.2 Métodos de diagnóstico	50
3.2.3.2.1 Amplificação de ácidos nucleicos	53
3.2.4 TRATAMENTO	54
3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	56
4 METODOLOGIA	58
4.1 AMOSTRAGEM	58
4.1.1 Microscopia óptica	59
4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA TOTAL	60
4.2.1 Kit de extração PROMEGA	60
4.2.2 Kit de extração QIAGEN.....	61
4.3 SELEÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	62
4.4 <i>NESTED</i> PCR.....	63
4.4.1 Temperaturas de anelamento	65
4.4.2 Avaliação de diferentes quantidades de DNA para otimização da PCR	68

	17
4.5 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	69
5 RESULTADOS	69
5.1 AMOSTRAGEM	70
5.1.1 Microscopia óptica	71
5.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA TOTAL	73
5.2.1 Kit de extração PROMEGA	73
5.2.2 Kit de extração QIAGEN.....	75
5.3 NESTED PCR PARA <i>Blastocystis</i> sp.	76
5.3.1 PCR com DNA extraído pelo kit Promega	76
5.3.1.1 Primeira PCR	76
5.3.1.1.1 Temperaturas de anelamento.....	77
5.3.1.1.2 Avaliação de diferentes quantidades de DNA para otimização da PCR.....	81
5.3.1.2 Nested PCR (nPCR)	82
5.3.2 PCR com DNA extraído pelo kit Qiagen.....	84
5.3.2.1 Primeira PCR	84
5.3.2.2 Nested PCR.....	85
5.4 NESTED PCR PARA <i>Giardia lamblia</i>	86
5.4.1 PCR com DNA extraído pelo kit Promega	86
5.4.1.1 Primeira PCR	86
5.4.1.1.1 Temperaturas de anelamento.....	87
5.4.1.1.2 Avaliação de diferentes quantidades de DNA para otimização da PCR.....	89
5.4.1.2 Nested PCR.....	90
5.4.2 PCR com DNA extraído pelo kit Qiagen.....	93
5.4.2.1 Nested PCR.....	94
5.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	94
6 DISCUSSÃO	96
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
REFERÊNCIAS.....	103
APÊNDICE	120
APÊNDICE A - Kit de extração PROMEGA	120
APÊNDICE B - Kit de extração QIAGEN.....	121
APÊNDICE C – Purificação	122

1 INTRODUÇÃO

Segundo a base de dados World Health Statistics (WHO) de 2022, a diarreia continua no ranking das 10 doenças que mais levam ao óbito, sendo uma das importantes causas de morbimortalidade na infância. Os agentes etiológicos podem ser vírus, bactérias e parasitos intestinais, principalmente os protozoários. As protozooses intestinais em geral, são transmitidas por contato direto oral-fecal ou contaminação através de alimentos e água em ambientes com condições sanitárias inadequadas (MOTTA, *et al.*, 2002; WHO, 2022).

A segurança hídrica, a partir da água potável, saneamento básico e higiene é um direito essencial, fundamental e; universal para gozo pleno da vida e dos demais direitos humanos. (RESOLUÇÃO 64/A/RES/292, DE 28.07.2010; MOTTA & SILVA, 2002). O acesso à água potável segura garante os outros direitos a ela intrínsecos, tais como a subsistência, frequência escolar, dignidade e a criação e apoio de comunidades resilientes e estáveis (WHO, 2020). Por outro lado, a falta de segurança hídrica reduz o bem-estar humano, o desenvolvimento socioeconômico e aumenta as taxas de transmissão de doenças como as parasitárias infecciosas, gerando impactos no crescimento e disseminação de microrganismos resistentes (WHO, 2022).

Dentre os objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) fixados em 2015 pela Organização das Nações Unidas, estão presentes ODS 3 – Saúde e bem-estar e ODS 6 – Água potável e saneamento. Esses objetivos elencam diversos pontos em seus diferentes contextos, entre eles, a importância do monitoramento de determinados protozoários relacionados com manifestações clínicas significativas, visando que os governos em âmbito global tomem medidas de controle focadas na prevenção de contaminação de doenças, entre elas, determinadas parasitoses intestinais para garantir a disponibilidade e gestão sustentável para todos (GDWQ/WHO, 2017).

No Brasil, devido ao elevado crescimento populacional, crescimento desordenado das regiões metropolitanas, associada a displicência governamental, intensa urbanização e desigualdades crescentes socioeconômicas, evidencia-se como reflexo; o comprometimento da disponibilidade de água potável à população. As pessoas mais desprovidas ou carentes e vulneráveis que vivem em moradias irregulares com baixas ou nulas condições de saneamento básico, apresentam-se suscetíveis para adquirir doenças parasitárias, dentre elas, protozooses intestinais (IBGE, 2018).

A giardíase e blastocistose são parasitoses amplamente distribuídas em países em desenvolvimento, relacionados à segurança hídrica e seus aspectos, geralmente insuficientes, precários ou nulos (HOTEZ *et al.*, 2008). Em geral, apresentam sintomatologia variável de leve a grave; assim como casos de diarreia que variam em sua intensidade (AMATO, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010; CELESTINO *et al.*, 2021).

A comunidade da Serrinha encontra-se na região central da cidade de Florianópolis, denominada Maciço do Morro da Cruz, próxima à Universidade Federal de Santa Catarina. Essa comunidade apresenta situação precária quanto ao abastecimento de água, saneamento básico e tratamento de esgoto (EIPPER *et al.*, 2006; CARBONERA, 2019). Ainda, de acordo com os dados coletados no Posto de Saúde da Trindade, a diarreia é uma das doenças mais comuns entre as crianças (CONEXÕES DE SABERES, 2007; ASSUNÇÃO, 2012). Devido a isso, a investigação parasitológica e estudos epidemiológicos moleculares são indicadores importantes de saúde da comunidade, correlacionando-se com o modo de vida do indivíduo e o acesso ao saneamento adequado e a disponibilidade de água potável e segura.

Por conseguinte, o presente trabalho visou a realização de ensaios de biologia molecular como ferramenta para compreensão epidemiológica através da identificação molecular dos protozoários *G. lamblia* e *Blastocystis* sp., para que possa servir para avaliar o caráter genético, sintomatologia e a rastreabilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a padronização de *Nested* PCR para identificação e caracterização molecular dos protozoários *G. lamblia* e *Blastocystis* sp. a partir de amostras fecais de crianças da comunidade da Serrinha de Florianópolis – SC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a extração de DNA total de amostras fecais positivas para *G. lamblia* e *Blastocystis* sp. utilizando dois kits comerciais de extrações de marcas diferentes;
- ✓ Testar temperaturas distintas de anelamento para os oligonucleotídeos utilizados para comparação da *nested* PCR;
- ✓ Comparar quantidades diferentes de DNA para otimização da *nested* PCR.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Blastocystis* sp.

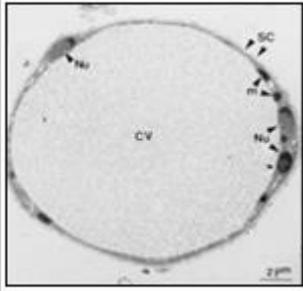
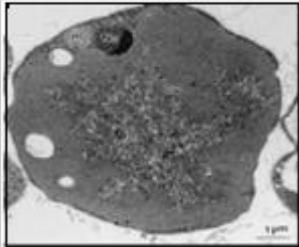
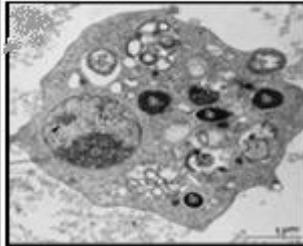
O gênero *Blastocystis* é classificado como um protozoário, anaeróbico restrito e obrigatório, cosmopolita do trato gastrointestinal, pertencente ao grupo protista Stramenopila. Esse parasito é conhecido pela capacidade de infectar o homem e diversos animais, como mamíferos, anfíbios, répteis, aves e insetos (JAVANMARD, E., *et al.*, 2018); comumente detectado em amostras fecais humanas em todo o mundo, com prevalência relatada variando de 2% a 50%, com taxas ainda mais elevadas em países em desenvolvimento e com precárias condições de saneamento (GDWQ/WHO, 2017).

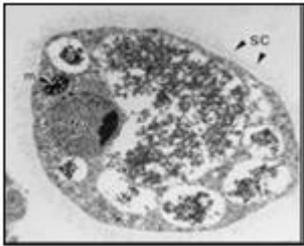
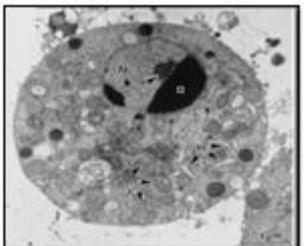
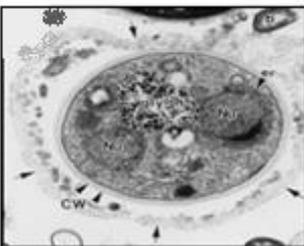
Esse organismo unicelular eucarioto, descrito há quase um século, ainda se encontra em várias controvérsias e indefinições relacionadas à patogenicidade, transmissão e epidemiologia (AMATO, N, V., *et al.*, 2008; JAVANMARD, E., *et al.*, 2018; SANTOS, H, L., *et al.*, 2014; SHAMS, M., *et al.*, 2022). A forma de transmissão pode ser via animal-humano e fecal-oral, principalmente relacionado com a ingestão de formas císticas através da água e/ou alimentos contaminados, elencado como um dos parasitos de grande abrangência global e regional, relacionado também com a condição climática (FAO/WHO, 2014).

A morfologia do *Blastocystis* sp. consiste em seis formas evolutivas, considerado um protozoário altamente pleomórfico. As formas evolutivas são: vacuolar, granular, ameboide, multivacuolar, avacuolar e cística (Quadro 1); e as distinções de papéis entre cada uma delas ainda não foi totalmente elucidado. A forma vacuolar é a mais encontrada em amostras fecais

e a mais utilizada para reconhecimento em diagnóstico, sendo evidenciada também em culturas; as formas granulares são encontradas em culturas e podem estar presentes em amostras clínicas, associadas com produtos degenerativos; as formas amebóides são encontradas em infecções com alta carga parasitária; e as formas multivacuolares e avacuolares não são reconhecidas por todos os autores como formas evolutivas e sim como formas de transição, e são mais encontradas em cultura (DE CARLI, G, A., 2011; CDC, 2019). A forma cística foi visualizada primeiramente em amostras de pacientes positivos para HIV; e é a forma de infecção e de resistência ao meio ambiente (STENSVOLD, C, R., *et al.*, 2020) (Quadro 1).

Quadro 1 – Formas evolutivas do *Blastocystis* sp. e suas características

Formas evolutivas <i>Blastocystis</i> sp.				
Forma	Tamanho	Formato	Núcleos	Características
 <p>Vacuolar</p>	Varia 2-200 µm; média 4-15 µm.	Esférica, oval ou elipsoidal.	Pode ter de 1 a 6; geralmente de 2 a 3.	Vacúolo central que ocupa de 70-90% a célula; citoplasma na periferia com alguns grânulos; divisão binária;
Vacuolar: seta apontando o núcleo (Nu), organela mitocôndria-like (m), camada superficial (SC), vacúolo central (CV); Escala 2 µm.				
 <p>Granular</p>	Varia 3-80 µm.	Esférica.	Em geral 1.	Apresenta grânulos finos no vacúolo central.
Granular: núcleo (Nu), organela mitocôndria-like (m), vacúolo central (cv), grânulos (gr); Escala 1 µm.				
 <p>Amebóide</p>	Varia 2,6 a 7,8 µm.	Aspecto irregular; pseudópodes pequenos.	Núcleo característico.	Vacúolos próximos aos pseudópodes;

Formas evolutivas <i>Blastocystis</i> sp.				
Ameboide: núcleo (Nu), bactérias (b), vacúolo de lipídio (ly); Escala 1 µm.				
 <p>Multivacuolares</p>	Varia 5-8 µm.	Aspecto irregular, oval.	De 1 a 2 núcleos.	Múltiplos vacúolos pequenos de diferentes tamanhos.
Multivacuolar: núcleo (Nu); retículo endoplasmático (er); seta apontando a organela mitocondria-like (m); a camada superficial (SC), vacúolos (v);); Escala 1 µm.				
 <p>Avacuolar</p>	Em torno de 5 µm.	Aspecto oval, esférico.	De 1 a 2 núcleos.	Sem vacúolos grandes característicos.
Avacuolar: seta apontando o núcleo (Nu), três setas apontando a organela mitocôndria-like (m) e retículo endoplasmático (er);); Escala 1 µm.				
 <p>Cística</p>	Em torno de 3-5 µm.	Polimórfica mas em geral circular ou oval.	Pode ter de 1 a 4 núcleos, em geral de 1-2.	Parede císticas de múltiplas camadas que são um envoltório; vacúolos pequenos e inclusões.
Cística: setas mais externas apontando a camada fibrilar, setas mais internas mostrando a parede cística (CW), núcleo (Nu), vacúolo de glicogênio (gly), retículo endoplasmático (er); Escala 1 µm.				

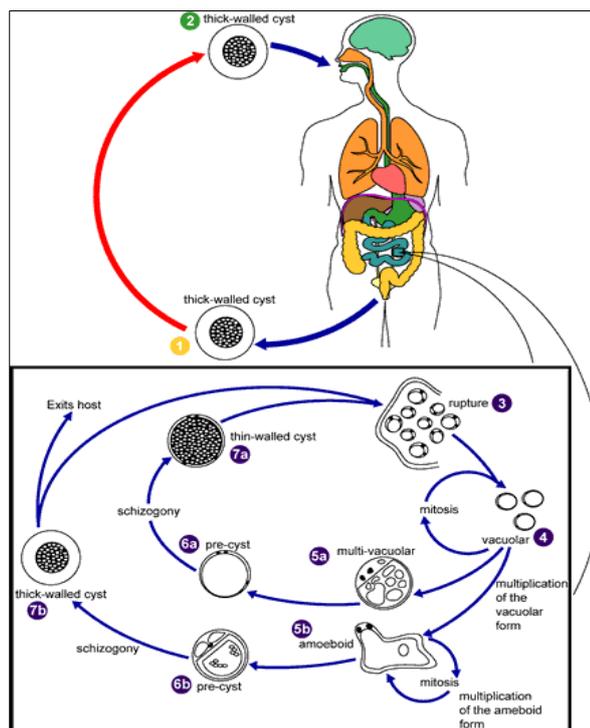
Fonte: Adaptado de Stenzel, *et al*, 1996; Amato, N, V, *et al.*, 2003; Amato, N, V, 2008; CDC, 2019.

Conhecido por ser o agente etiológico da blastocistose, o ciclo biológico do *Blastocystis* sp. não é totalmente esclarecido, assim como o estágio infeccioso em si e o papel de suas diversas formas evolutivas. Porém, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), o ciclo de infecção não começa apenas com a ingestão da forma cística, como antes estipulado (Figura 1); e sim com a ingestão das formas cística e vacuolar (Figura 2); a partir de transmissão fecal-oral de forma direta ou através de água e/ou alimentos contaminados. A replicação

acontece de forma assexuada, sugestivo de divisão binária, onde as formas evolutivas se multiplicam e colonizam o hospedeiro (CDC, 2019).

De acordo com o segundo ciclo biológico (Figura 1) aceito pelo CDC em 2018, as etapas eram as seguintes: A forma cística eliminada pelo hospedeiro entra em contato com o meio ambiente (1); A infecção ocorre através do contato direto ou através de água e/ou alimentos contaminados com a forma cística (2); No intestino a forma cística se rompe e libera a forma vacuolar que se multiplica de forma assexuada (3 e 4); Gerando então as formas multivacuolares (5a) e ameboides (5b) que geram os pré-cistos (6a e 6b); Através da esquizogonia geram a forma cística de parede fina (7a) responsável pela autoinfecção e/ou a forma cística de parede grossa (7b) que será eliminada para o meio ambiente (TAN, 2004; CDC, 2018).

Figura 1 – Segundo ciclo biológico *Blastocystis* sp. aprovado pelo CDC - 2018

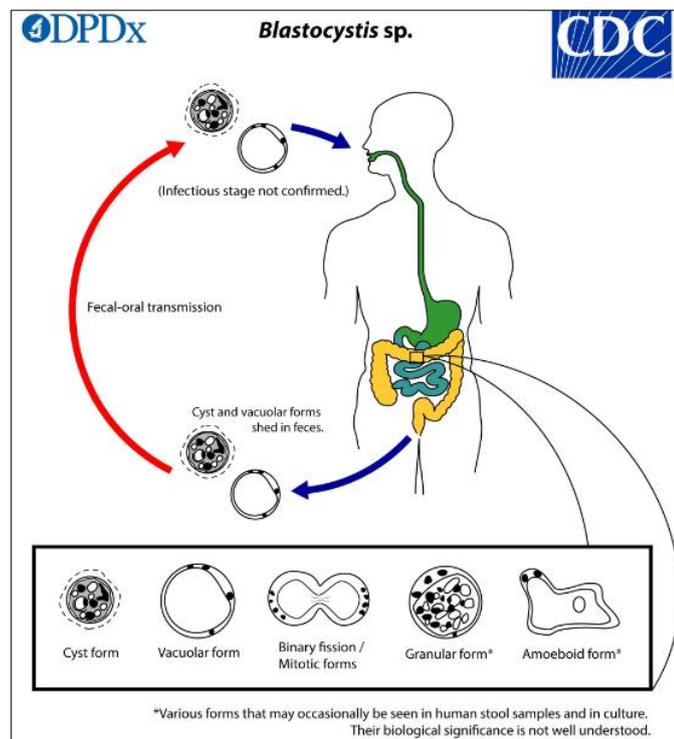


Fonte: CDC, 2018(Adaptado de www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/blastocystis.htm)

O último ciclo biológico aceito e aprovado pela CDC em 2019 (Figura 2), demonstra que as formas infectantes seriam as formas císticas e vacuolares, porém ainda não são confirmadas;

as mesmas formas eliminadas pelo hospedeiro para o meio ambiente e que são encontradas nas fezes. Além disso, pela falta de informações e esclarecimentos, o ciclo evolutivo fica sem etapas estipuladas. Sabe-se que o local em que acontece a multiplicação e evolução do *Blastocystis* sp. é o intestino grosso, mas não especifica a sequência das formas evolutivas ou significância biológica de cada forma (CDC, 2019).

Figura 2 – Último ciclo evolutivo *Blastocystis* sp. aprovado pelo CDC em 2019



Fonte: Ciclo biológico *Blastocystis* sp. CDC, 2019 (www.cdc.gov/parasites/blastocystis/biology.html)

3.1.1 PATOGÊNESE E CONTROVÉRSIAS RELACIONADAS

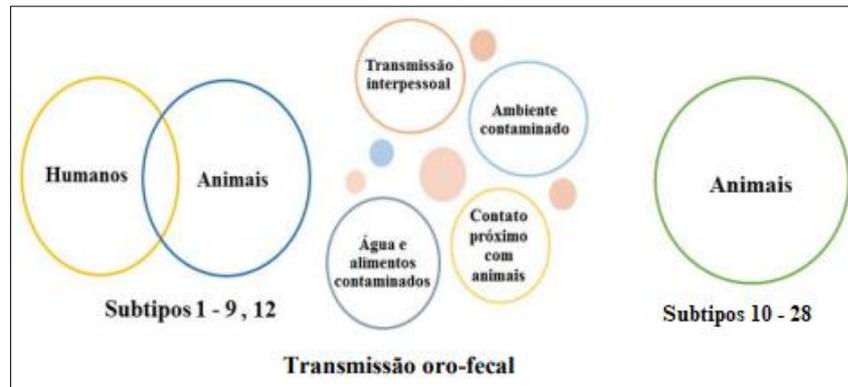
Existem muitos debates e estudos conflitantes sobre *Blastocystis* sp., referentes a definição da posição taxonômica, papel patogênico, diversidade genética, especificidade de hospedeiro e manifestações clínicas (AMATO, *et al.*, 2003; DE CARLLI, 2011; KOSIK-BOGACKA, *et al.*, 2021). Seu histórico de descobrimento data em 1911/1912 com a primeira descrição e posição taxonômica como levedura. Ao passar dos anos as posições taxonômicas alternaram entre

levedura, vegetal, esporozoítio e protozoário. Foi em 1996, que *Blastocystis* sp. foi encaixado, a partir das características morfológicas e genéticas na seguinte classificação: Reino Protista, Filo *Stramenopiles*, classe *Blastocystea*, ordem *Blastocystida*, família *Blastocystidae*, gênero *Blastocystis* (ALEXIEFF, 1911; BRUMPT, 1912; ZIERDT, 1991; SILBERMAN, *et al.*, 1996).

A capacidade de infectar diversos animais com baixa diferenciação morfológica entre si, somado a alta variabilidade genética, leva a um consenso na literatura de utilização do nome *Blastocystis* sp. para referenciar-se as diferentes linhagens genéticas ou subtipos (CLARK, 1997; STENSVOLD *et al.*, 2007; PARIJA & JEREMIAH, 2013). Os subtipos (STs) são designações baseadas em regiões polimórficas das subunidades do RNA ribossomal nas diferenças entre as sequências do gene SSU rRNA; sendo validado 17 subtipos (ST1-ST17); e em processo de validação 11 Subtipos (ST18-ST28). Os subtipos ST18, ST20 e ST22 estão sendo contestados (HUBLIN, J.S.Y, *et al.*, 2020; SHAMS, *et al.*, 2022; VELÁZQUEZ, R, L., *et al.*, 2022).

Entre eles, 10 subtipos (ST1-ST9 e ST12) são os reportados em infecções humanas, mas também estão presentes em infecções de animais (Figura 3); os outros Subtipos (ST10 –ST28, com exceção do ST12) infectam somente animais e não foram relatadas participação em infecções humanas. A rota de transmissão oro-fecal está relacionada a transmissão interpessoal, pelo contato direto; contato próximo com animais contaminados; e transmissão pelo meio ambiente contaminado relacionado com água ou alimentos. Entre os Subtipos relatados nas infecções humanas, o Subtipo ST3 é o mais prevalente, seguido de ST1 e ST2, ST4 e ST5 (POIRIER, *et al.*, 2011; STENSVOLD, *et al.*, 2007; JAVANMARD *et al.*, 2018; VALENÇA-BARBOSA, 2018).

Figura 3 – Subtipos relacionados a relatos de hospedeiros e via de transmissão



Fonte: Adaptado de Valença-Barbosa (2018, p.7).

A falta de especificidade por um hospedeiro pode ser um dos motivos associados à transmissão entre tantos seres, o que somado a variabilidade genética, dificulta a rastreabilidade referente à distribuição dos diferentes subtipos e relação com a sintomatologia (POIRIER, *et al.*, 2011; STENSVOLD, *et al.*, 2007; JAVANMARD *et al.*, 2018).

Em relação a patogenicidade, mostra-se controversa devido aos sintomas inespecíficos e frequência de infecções assintomáticas; sendo uma das questões mais debatidas na literatura. A ação patogênica está relacionada a fatores do protozoário, tais como a presença de cepas virulentas, potencial patológico dos subtipos e alta carga parasitária; e relacionada a fatores do hospedeiro, como a condição imunológica e população da microbiota (SANTOS, H, L., *et al.*, 2014; SCANLAN, P, D., *et al.*, 2015; JIMÉNEZ, P, A., *et al.*, 2019). Alguns estudos sobre a microbiota que incluem *Blastocystis* sp., relatam que o mesmo pode ser um constituinte da microbiota intestinal de um ser humano saudável; em contrapartida, outros estudos sugerem que a sua presença diminui a quantidade de bactérias intestinais pertencentes a microbiota, levando a um desequilíbrio (BEGHINI, F., *et al.*, 2017; YASON, J, A., *et al.*, 2019).

Uma vez no intestino grosso, o parasito pode interferir no epitélio intestinal, microbiota, ou ainda, o sistema imunológico do indivíduo. Os componentes específicos que garantem potencial patogênico ao *Blastocystis* sp., são muito debatidos na literatura, sendo que nos últimos anos os estudos experimentais se tornaram cada vez mais presentes (Tabela 1).

Tabela 1 – Estudos experimentais com ou sem associação aos subtipos de *Blastocystis* sp.

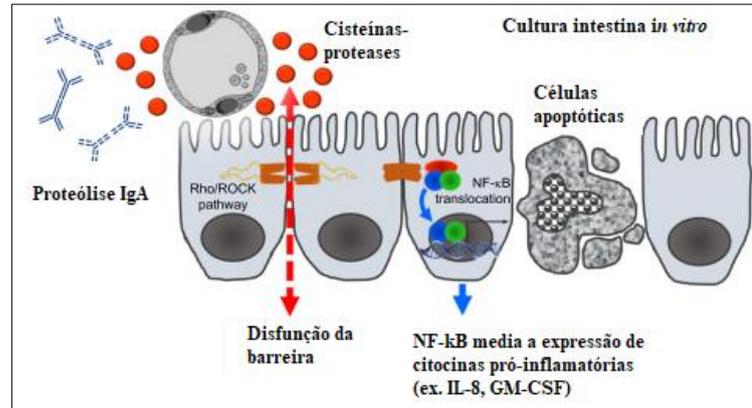
Subtipo	Via	Estudo	Autor
-	Indução/modulação da resposta imune.	Interações <i>in vitro</i> com células epiteliais HT-29 e T-84.	Long <i>et al.</i> , 2001
ST1	Relacionado a maior patogenicidade.	Indivíduos assintomáticos e sintomáticos.	Yan <i>et al.</i> , 2006
ST4	Aumento de permeabilidade levando a apoptose.	Células epiteliais intestinais de ratos.	Puthia <i>et al.</i> , 2008
ST4	Cisteíno-peptídeos evidenciando o efeito citopático mas sem apoptose.	ST4 de ratos em células humanas Caco-2.	Wu <i>et al.</i> , 2014b
ST1, ST2, ST3	Pacientes com SII	Aumento de citocinas IL-6 e TNF- α .	Azizian, <i>et al.</i> , 2016
ST4	Aumento da produção de ácidos graxos e IL-10.	Camundongo com ST4	Deng and Tan, 2022

Fonte: Adaptado de Deng and Tan, 2022. Elaborado pela autora, 2022.

A imunoglobulina responsável pela proteção e conservação da homeostase no intestino é a IgA, que tem o papel de limitar a reprodução dos parasitos e fornecer proteção contra reinfecções (GUTZEIT, *et al.*, 2014). Uma das vias debatidas na literatura é que ao aderir o intestino, o *Blastocystis* sp. produz e secreta cisteíno-proteases que contribuem para a degradação da IgA secretora, diminuindo a resposta do sistema imunológico (PUTHIA, *et al.*, 2005; STENSVOLD, *et al.*, 2020). Ao liberar essas enzimas proteases que afetam principalmente a integridade do tecido epitelial, promove também a colonização por outros organismos intestinais mudando a composição da microbiota intestinal (ALZATE *et al.*, 2020).

Alguns estudos *in vitro*, demonstram também, o comprometimento da junção mediada por Rho/ROCK, gerando uma disfunção da barreira epitelial e colaborando para a liberação de citocinas pró-inflamatórias e células apoptóticas, mediado por NF- κ B (Figura 4), o que condiz com outros estudos que demonstram níveis elevados de citocinas como IL-8, TNF- α , IL-10 e ácidos graxos. Outros estudos descrevem também, o aumento da permeabilidade das células intestinais, sendo mais um fator em cooperação para indução da apoptose (CLARK, C, G., *et al.*, 2013; STENSVOLD, C, R., *et al.*, 2007; STENSVOLD, C, R., *et al.*, 2020; DENG and TAN, 2022).

Figura 4 – Estudo *in vitro* de cultura intestinal de Stensvold e colaboradores, 2020.



Fonte: Adaptado de Stensvold, C, R., *et al*, 2020.

Entretanto, ainda existem muitos resultados divergentes entre os autores, principalmente relacionado a aparição ou não de sintomas específicos e inespecíficos, o que somado a falta de um modelo padrão de comparação experimental, ajudam a manter esse protozoário com diversas lacunas a serem preenchidas.

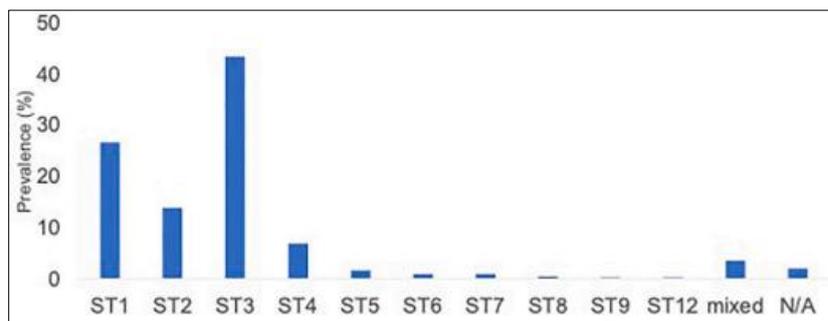
3.1.2 EPIDEMIOLOGIA

De acordo com Popruk e colaboradores (2021) a prevalência da infecção variou de 0,5 a 100% em todo o mundo, sendo que os maiores índices foram reportados em comunidades com péssimas condições higiênico-sanitárias.

O índice de prevalência média foi de 52% na Austrália e Oceania; 43,84% nas Américas; 41% na África e em países da Europa de 22 a 56% (POPRUK, *et al*, 2021; KOSIK-BOGACKA, *et al* 2021). Em países da Ásia, foram avaliados relatos de 2010 até 2021 demonstrando prevalência de até 83,7% (RAUFF-ADEDOTUN, A. *et al.*, 2021). Em alguns países industrializados foram relatados uma variação entre 6% na Hungria a 24% na Holanda (BART *et al.*, 2013; SCANLAN *ets al.*, 2015). No Brasil a prevalência varia de 2,2% a 40% (BRANCO *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2017).

No geral, os subtipos também possuem diferentes taxas de prevalência, os mais encontrados em infecções humanas são ST3 com maiores números de relatos (43,78%), seguido de ST1 (28%), ST2 (13,5%), ST4 (9%) e ST5 (2%) em diferentes regiões do mundo (Figura 5), os outros subtipos são encontrados em infecções em outros animais (POPRUK, *et al*, 2021).

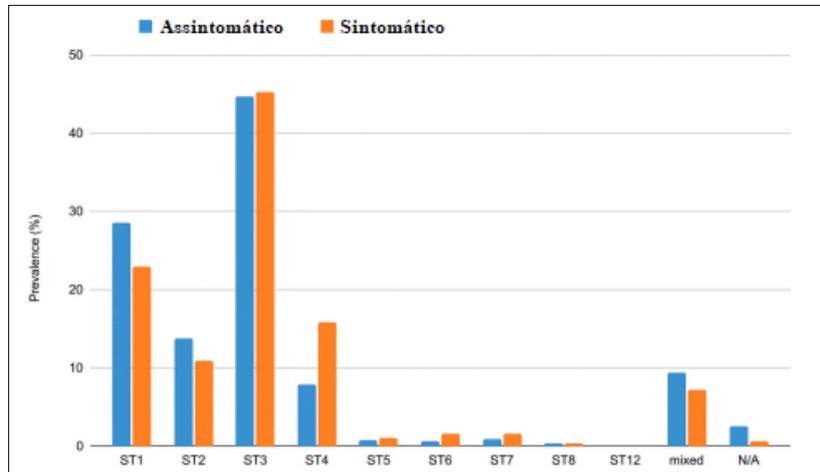
Figura 5 – Taxas de prevalência dos subtipos de *Blastocystis* sp. em humanos em diferentes regiões do mundo, 2021.



Fonte: Adaptado de Popruk, *et al*, 2021, p. 8, fig 1.

De acordo com diversos estudos, tanto em infecções sintomáticas como assintomáticas, os mesmos subtipos são observados como prevalentes, com pequenas variações de taxas. Em infecções assintomáticas encontra-se variações aproximadas de ST3: 43,8%; ST1: 28%; ST2: 14%; ST4: 9% e mistura de subtipos com 9,5%. Em infecções sintomáticas observa-se variações aproximadas de ST3: 44%; ST1: 23%; ST2: 10,5%; ST4: 16% e mistura de subtipos com 7% (Figura 6) (POPRUK, *et al*, 2021).

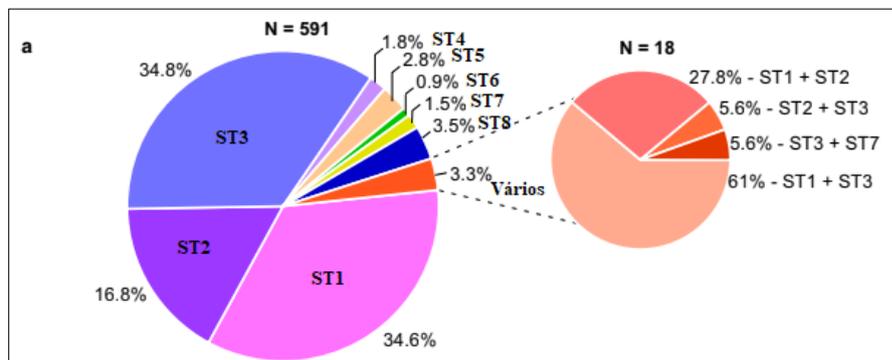
Figura 6 – Taxas de prevalência dos subtipos de *Blastocystis* sp. relacionados ao aparecimento de sintomas nas diferentes regiões do mundo, 2021.



Fonte: Adaptado de Popruk, *et al*, 2021, p. 9, fig 2.

A distribuição geográfica dos diferentes subtipos e suas respectivas prevalências no Brasil, foram evidenciados em uma revisão sistemática realizada por Zanetti e colaboradores em 2020, que demonstrou uma taxa de prevalência de 34,8% de ST3, 34,6% de ST1, 16,8% de ST2, confirmando o cenário mundial (Figura 7). Referente aos outros subtipos: 3,5% de ST8; 2,8% de ST5; 1,8% de ST4; 1,5% de ST7; 0,9% de ST6. A taxa de prevalência de múltiplos subtipos foi de 3,3%; com associação de ST1 e ST3 em 61%, associação de ST1 e ST2 com 27,8%, associação de ST2 e ST3 com 5,6%, e associação de ST3 e ST7 com 5,6% (Figura 8).

Figura 7 – Taxas de prevalência dos Subtipos no Brasil, 2020.



Fonte: Adaptado de Zanetti, *et al*, 2020, p. 11, fig 4.

Relatos apontam a presença desse parasito no esgoto, em embalagens de alimentos e em surtos correlacionados com a contaminação através da água e alimentos contaminados. Em um estudo entre os manipuladores de alimentos no Irã, entre os parasitos intestinais mais prevalentes estão *G. lamblia*, *E. coli*, e *Blastocystis* sp (TEIMOURI, *et al*, 2021). Na Polônia foi reportado um estudo de um ano de monitoramento de águas e a prevalência dos subtipos ST1 e ST3 de *Blastocystis* sp. foi de 13,9%, com maiores números observados no inverno e verão (ADAMSKA, 2020). Em um estudo na Malásia, foi demonstrado a presença do agente em transmissão via animal-humano, caráter zoonótico importante, com maior risco de infecção entre trabalhadores rurais (SURESH K. *et al.*, 2005; CARADONNA T *et al.*, 2017; NIMIRI LF, 1993).

A infecção por *Blastocystis* sp. foi muito relacionada, na literatura, como uma infecção adquirida por viajantes que ao retornarem de uma viagem por algum país tropical, apresentavam sintomas gastrointestinais e diarreia (JELINEK *et al.*, 1997). Um estudo longitudinal prospectivo estudou analisou de 479 amostras de fezes de viajantes holandeses saudáveis, antes e depois de viagens ao continente Asiático e Africano; foi evidenciado que 36% já continha algum subtipo de *Blastocystis* sp. e somente 5% adquiriram no retorno (VAN HATTEM *et al*, 2019); um valor que também repete em um estudo na Alemanha com 795 amostras analisadas e 11% adquiriram durante a viagem (RUDZINSKA *et al.*, 2019). Em relação aos pacientes imunocomprometidos foi relatado uma média global de prevalência de 10%, sendo relatado taxas de 72% na Indonésia, Etiópia 61%, Alemanha 37%, Austrália 21% e Brasil 24% (KHORSHIDVAND, *et al.*, 2021).

Entre os grupos de risco, as crianças, possuem altas prevalências de *Blastocystis* sp., com taxas variando de 8,4% na Suíça; 5,6% na Dinamarca; e Holanda com até 20%. As taxas são mais elevadas em países em desenvolvimento, chegando a 50% (LÉGERET *et al*, 2020). No Brasil, estudos apontam alta positividade entre crianças com taxas a partir de 40% (RAMÍREZ *et al*, 2016; OLIVEIRA-ARBEX *et al*, 2018). Em um estudo no Panamá, onde 33% de crianças foram positivas para algum tipo de parasitose, *Blastocystis* sp. representou 63.3% dessas positivities (PEREA *et al*, 2020). No Rio de Janeiro a positividade para o parasito foi de 44% entre crianças até 12 anos de idade (LEITE, 2014). Em Minas Gerais foi encontrado uma taxa de 57,15% entre crianças de 12 a 16 anos de idade (DA CRUZ, 2014).

3.1.3 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO

3.1.3.1 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas são inespecíficas, assim como parte das doenças enteroparasitárias, apresentando pacientes assintomáticos e sintomáticos. Em quadros sintomáticos, as manifestações podem ser diarreia de intensidade variável, sem a presença de sangue ou células de defesa; dor abdominal, desnutrição, prurido anal, náuseas e vômito, Síndrome do Intestino Irritável (SII), constipação, flatulência e ainda, estudos demonstram a presença do protozoário em ulcerações (GARCIA, 2007; JIMÉNEZ *et al*, 2019). Em pacientes imunocomprometidos é comum a alta taxa de prevalência, sendo a terceira causa de maior morbimortalidade; e as principais manifestações clínicas são a desnutrição, diarreia e sintomas dermatológicos a depender do subtipo responsável (GARCIA, 2007).

A SII é considerada um distúrbio funcional e crônico que afeta a qualidade de vida do indivíduo, o diagnóstico é realizado a partir de diversos critérios (KHAN *et al*, 2010). Essa doença tem uma prevalência mundial média de 11,2%. De acordo com estudos epidemiológicos, a blastocistose ocorre 2.34 vezes mais frequentemente em pacientes com SII do que em indivíduos sem, compreendendo uma faixa de 5,8 – 73%, mais ampla do que em indivíduos controle (CIFRE, *et al.*, 2018).

Além disso, muitos relatos evidenciam o envolvimento desse parasito de forma extra intestinal, com a presença detectada no apêndice, cisto esplênico, casos de artrite e urticárias cutâneas (FREALLE *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2014). Em uma recente revisão sistemática e meta-análise foi reportado a taxa de infecção dos pacientes com urticária de 22,5%; 22,2% pacientes com neoplasias; e 16,15% pacientes com gastroenterite; sendo que a frequência dos subtipos foram ST1: 33,3%; ST2: 16,7% ST3: 23,8% (BAHRAMI, *et al*, 2019).

Os sintomas inespecíficos, a alta taxa de prevalência de infecção assintomática e o papel do parasito em associações com outras infecções ainda são uma incógnita, muito condizente com a falta de esclarecimentos referente a sua patogenicidade.

3.1.3.2 Métodos de diagnóstico

Em um laboratório de rotina o diagnóstico é realizado pelo exame parasitológico de fezes (EPF), com análise de amostras fecais com ou sem solução conservante. As técnicas utilizadas podem ser as de concentração ou exame direto, baseando-se na identificação morfológica do parasito pela identificação das principais formas evolutivas. A forma vacuolar é a forma mais típica e comumente encontrada no EPF (Tabela 2) (AMATO NETO, *et al*, 2003; DE CARLI, 2011).

Tabela 2 – Morfologia diferencial de *Blastocystis* sp. em espécimes de fezes de humanos

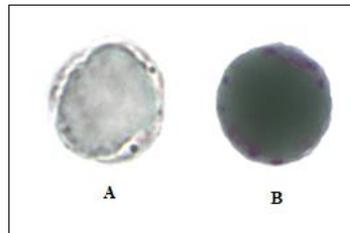
Morfologia diferencial de protozoários encontrados em espécimes de fezes de humanos						
Espécie	Estágio	Tamanho	Formato	Motilidade	Número de núcleos	Outras características
<i>Blastocystis</i> sp.	Forma vacuolizada.	5-30 µm; faixa usual 8-10 µm.	Esférico, oval ou elipsoidal.	Imóvel.	Em geral 1 ou 2-4; na borda do citoplasma. Em binucleados: núcleos podem estar em polos opostos. Em quadrinucleados são espaçados uniformemente na periferia celular.	A célula contém um grande corpo central ou vacúolo; faixa fina/borda de citoplasma na periferia. Ocasionalmente um anel de grânulos pode ser visto no citoplasma e a célula parece ter uma borda de contos.
Tamanhos baseados em informações de Rommel e Heydorn (1972) e Heydorn <i>et al.</i> (1975).						
Descrição baseada em informações de Zierdt, 1973 e McClure <i>et al.</i> (1980).						

Fonte: Adaptado de CDC - Diagnostic Procedures Morphcomp., 2016.

Cada método apresenta especificidade e sensibilidade variável, e deve ser avaliado antes de ser escolhido. Em relação aos corantes podem ser utilizados o Lugol ou a coloração permanente, como: tricrômico, giemsa e hematoxilina férrica (Figura 8). O exame direto muito se relaciona com a carga parasitária, sendo recomendado a análise de múltiplas amostras fecais; a sedimentação espontânea pode ser utilizada também com as amostras conservadas (DE CARLI, 2011; CDC, 2016). A diluição da amostra pode ser realizada com água destilada ou corrente, embora tenha sido evidenciado a ruptura da parede do organismo, e por isso a solução salina

seria o recomendado; ainda, o uso da solução conservante (SAF) garante a integridade das formas do parasito (NEVES, *et al*, 2011).

Figura 8 – Morfologia diferencial *Blastocystis* sp. (10 μ m)



Fonte: Adaptado de CDC - Diagnostic Procedures Morphcomp., 2016. Legenda: (A) – Cisto visualizado em microscopia de campo claro. (B) – Cisto visualizado em microscopia com coloração tricrômica.

Por ser um parasito polimórfico, o diagnóstico por microscopia possui baixa sensibilidade pela falta de padronização quanto a análise das formas e alguns resultados conflitantes (FREALLE *et al.*, 2015; STENSVOLD, *et al*, 2016). As análises mais sensíveis são a cultura de fezes que é o padrão ouro de diagnóstico, com o cultivo em diferentes meios, como culturas xênicas em meio LE, Robinson, e TYSGM-9; ou culturas axênicas em meio LE, e IMDM (CLARK, *et al*, 2002); e ainda em meio Pavlova; seguido da análise molecular por PCR. Essas análises são mais trabalhosas e demoradas e por isso são mais utilizadas em estudos clínicos e epidemiológicos, não utilizados comumente em rotinas laboratoriais (SANTOS *et al.*, 2014; CDC, 2016). Quanto ao diagnóstico sorológico, ainda não foi estabelecido, visto que faltam estudos referente ao assunto e ainda pouco se sabe quanto aos subtipos detectados (STENSVOLD, *et al*, 2016).

3.1.3.2.1 Amplificação de ácidos nucleicos

Estudos referentes à biologia do protozoário são essenciais para análise genética e epidemiológica, considerando-se a grande variabilidade de genes conservados. As técnicas moleculares como a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) possuem maior sensibilidade de

diagnóstico em comparação com a microscopia, entretanto, esses métodos não são utilizados na rotina laboratorial pela alta demanda de custo e tempo agregado. Devido a extensa variabilidade genética, existem diversos alvos moleculares estudados na literatura; entretanto, existem dois métodos que são amplamente utilizados: o uso do STS e a análise da variação de SSU rDNA (STENSVOLD, *et al.*, 2007).

Apesar de ser amplamente utilizada em estudos, a detecção de *Blastocystis* sp. através de amostras fecais, possui interferentes que podem prejudicar a amplificação do DNA. Esses interferentes podem inibir a ação da DNA polimerase, e conseqüentemente inibir a amplificação; entre eles estão os componentes metabólicos, grupamento heme e ácidos biliares (JAVANMARD *et al.*, 2018).

A detecção molecular com análise do gene da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU-rDNA) é a mais observada; variando-se as regiões do gene como marcadores. Esse método, conhecido como código de barras (*barcoding*), desenvolvido por Scicluna e colaboradores em 2006, permite a detecção de diferentes subtipos, com o uso dos oligonucleotídeos RD5 e BhRDr que amplificam 600 pares de base (pb) na extremidade 5' do gene (SSU-rRNA) (SCICLUNA *et al.*, 2006; STENSVOLD, *et al.*, 2007; YOSHIKAWA *et al.* 2000). Por possuir alta conservação a nível de espécie é muito utilizado em estudos moleculares e filogenéticos; até o momento 35 alelos SSU-rDNA dentro de ST3 foram identificados, os outros subtipos seguem limitados quanto as identificações (STENSVOLD, *et al.*, 2016).

A detecção de subtipos usando um local marcado com sequência, ou seja, utilizando um par de iniciadores “subtipo específico” (STS), também foi utilizada em alguns estudos, e envolve sete reações de PCR, uma para cada um dos subtipos ST1 – ST7, sem precisar sequenciar. Porém, essa técnica identifica apenas esses subtipos, o que pode levar a um resultado falso negativo (STENSVOLD, *et al.*, 2016). Outro marcador citado na literatura são os espaçadores internos transcritos (ITS1-2) que codificam o RNA 5.8S e RNAr 28S, amplificando cerca de 30% do SSU-RNAr, fazendo parte do *barcoding*; porém possuem baixa especificidade, entretanto muito utilizados em estudos filogenéticos (SCICLUNA *et al.*, 2006).

O gene do fator alfa de alongação 1-alfa (EF-1a), também é uma opção para estudos filogenéticos por ser altamente conservado; um gene que é necessário para o alongamento da síntese proteica (TAN *et al.*, 2002). Ainda existe relato do uso do gene que codifica a SSU-

rRNA da organela semelhante a mitocôndria (MLO-rDNA), mas que obteve resultados conflitantes (POIRIER, *et al.*, 2011; POIRIER, *et al.*, 2014).

3.1.4 TRATAMENTO

O tratamento da infecção depende da aparição ou não de sintomas, identificação do parasito no exame coprológico e nível da carga parasitária. A primeira linha de tratamento são os Nitroimidazólicos, antimicrobianos com excelente atividade contra bactérias anaeróbicas estritas e protozoários.; e atividade limitada contra aeróbios. Seu mecanismo de ação consiste no recebimento de elétrons pelo seu grupamento nitro, liberando compostos químicos e radicais livres que inativam o DNA, impedindo a síntese enzimática dos microrganismos. Deve ser evitado durante a gravidez por possuir a capacidade de atravessar a placenta e atingir as mesmas concentrações no feto, sendo ainda excretado no leite materno. O principal utilizado é o Metronidazol, disponível na rede básica de saúde; porém pela falta de eficácia em alguns casos, a atividade biológica ainda necessita de estudos (BATISTA, *et al.*, 2017), podendo estar relacionado com falta de concentração no sítio de ação ou possível resistência de alguns subtipos (ANVISA, 2007; STENSVOLD, *et al.*, 2010). Sua regulamentação não possui recomendações para uso específico contra *Blastocystis* sp. (DRUGS-METRONIDAZOLE, 2021).

A segunda opção de tratamento seria o antibiótico Trimetropim-Sulfametazol, que contém dois componentes ativos que agem de forma sinérgica, bloqueando o sequencial de duas enzimas que catalisam estágios sucessivos da biossíntese do ácido folínico no microrganismo, inibindo o metabolismo do ácido fólico. Disponível em várias formas farmacêuticas como suspensão oral, solução injetável e comprimido; sendo disponibilizado no acesso básico de saúde (RENAME, 2022). Esse antibiótico é um excelente bacteriostático e pela associação é potente frente a mecanismos de resistência, entretanto, não existe recomendação específica de posologia para *Blastocystis* sp., e estudos possuem diferentes conclusões quanto à eficácia (ANDSSEL *et al.*, 1999; TAN *et al.*, 2010; DRUGS – SULFAMETHOXAZOLE/TRIMETHOPRIM, 2021).

Outro antibiótico utilizado é um inibidor da síntese proteica, da classe dos Aminoglicosídeos, Paromomicina; seu mecanismo de ação é o bloqueio da síntese da iniciação da síntese de proteína, ocorrendo o bloqueio da posterior tradução e estimulação da terminação prematura, incorporando aminoácidos de forma incorreta. Entretanto, além de possíveis resistências, existem diversas reações adversas importantes, como a nefrotoxicidade que ocorre de 8% a 26%, além de não possuir recomendação específica para *Blastocystis* sp. (DRUGS-PAROMOMYCIN, 2022).

O antiprotozoário Nitazoxanida também é uma opção, embora também não possua recomendação de uso específico para *Blastocystis* sp., e apresente efeito de curta duração (DRUGS-NITAZOXANIDE, 2022). Outros fármacos que possuem atividades contra o parasito são Tinidazol, Ornidazol, Cetoconazol, Quinina, etc. Diversos estudos referentes à atividade biológica e sítio de ação dos medicamentos utilizados e compostos fitoterápicos ainda merecem um maior foco para esclarecimentos (TAN *et al.*, 2010).

3.2 *Giardia lamblia*

O gênero *Giardia* trata-se de um protozoário flagelado binucleado pertencente à família *Hexamitidae*, ordem *Diplomonadida*, classe *Zoomastigophora*, filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*; ainda classificados como parte do supergrupo Excavata. Responsável por ser uma das causas mais comuns de diarreia por protozoários entéricos e de grande prevalência mundial com variações a partir de 33% em países em desenvolvimento (LALLE e HANEVIK, 2018; DUNN e JUERGENS, 2020).

Esse organismo unicelular eucarioto é capaz de infectar o intestino delgado do homem, animais domésticos (como cães e gatos) e animais silvestres. A principal via de transmissão é fecal-oral, através de água e/ou alimentos contaminados e pelo contato com pessoas/animais infectados, reconhecido como zoonose pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1979; elencado como um dos parasitos de abrangência global relacionado com a condição climática, e ampla distribuição em países em desenvolvimento com precárias condições sanitárias. Ainda, por atuar como parasito de veiculação hídrica, encontra-se relacionado com epidemias e surtos

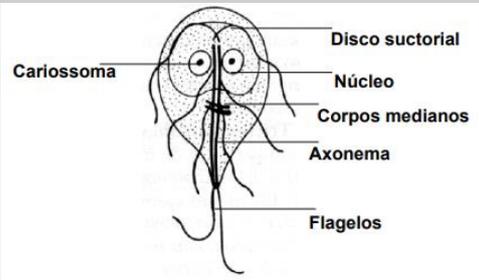
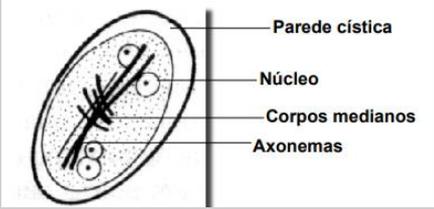
tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento (PAHO, 2003; FAO/WHO, 2014).

Sua primeira observação foi datada em 1681 por Leeuwenhoek, em suas próprias fezes (“animalúnculos móveis”); sendo descrito e nomeado *Cercomonas intestinalis* por Lambl em fezes diarreicas de crianças em 1859 (PAHO, 2003). Somente a partir da década de 1980 que o nome do gênero foi estabelecido, por Kunstler, ao identificar uma espécie do flagelado em um intestino de girino (KUNSTLER, 1882). Em 1915 foi renomeado *G. lamblia* por Stiles; e ao passar dos anos, os nomes foram adotados de acordo com o hospedeiro da infecção. Anos depois, Filice consolidou que deveriam ser reconhecidas apenas três espécies, de acordo com diferenças morfológicas e hospedeiro infectado: *Giardia duodenalis*, *Giardia muris*, e *Giardia agilis*; aceitos como *Giardia* spp. em 1971. A partir disso, várias espécies foram identificadas e na literatura existe um consenso sobre a nomenclatura, sendo os nomes *G. lamblia*, *G. duodenalis* e *Giardia intestinalis* sinônimos referentes a uma mesma espécie, a espécie responsável pela infecção em humanos (FILICE, 1952; PAHO, 2003; NCEZID, 2021). *G. lamblia* é um protozoário que possui capacidade de infectar vários tipos de espécies, e ainda desenvolve seu ciclo biológico completo em apenas um hospedeiro (monoxeno ou direto); apresentando duas formas evolutivas, o cisto como forma de resistência ao meio ambiente; e o trofozoíto a forma vegetativa e proliferativa que habita o intestino dos animais (MONIS *et al*, 2003).

Os trofozoítos apresentam forma piriforme, com dimensões de 12 a 15 µm de comprimento por 6 a 8 µm de largura; apresentando simetria bilateral, dois núcleos, dois axonemas (fibrilas), disco adesivo ou disco suctorial (face convexa dorsalmente e côncava ventralmente, com uma concavidade ovoide), corpos medianos/parabasais (na parte ventral uma ou duas formações paralelas, em forma de vírgula) e quatro pares de flagelos (sendo quatro flagelos laterais, dois centrais e dois caudais). A organização intracelular é simples e não possui mitocôndrias e peroxissomos, possuindo um sistema secretor vesicular remoto (THOMPSON, 2004). Os corpos medianos, constituídos por microtúbulos, e o disco adesivo ou disco suctorial são estruturas peculiares pertencentes ao gênero. No disco adesivo existem proteínas responsáveis pela contração como actinina, miosina e etc; assim como a presença de um conjunto de microtúbulos (ADAM, 2011).

Os trofozoítos são encontrados no trato intestinal do hospedeiro na forma vegetativa, e podem ser eliminados nas fezes (principalmente as diarreicas) do hospedeiro infectado, entretanto, não possuem resistência ao meio ambiente. Quando corados, podem ser observados os núcleos com cariossoma grande redondo, sem cromatina periférica e os flagelos são visíveis nos trofozoítos vivos ou por colorações específicas (BURET, 2008) (Quadro 2).

Quadro 2 – Formas evolutivas da *Giardia* spp. e características

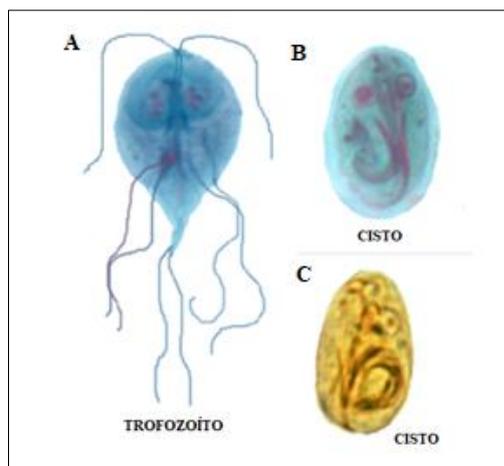
Formas evolutivas <i>Giardia</i> spp.				
Forma	Tamanho	Formato	Núcleos	Características
 <p>Trofozoíto</p>	12 a 15 µm comprimento por 6 a 8 µm de largura.	Piriforme, formato de pera.	2	Motilidade; estruturas celulares duplas: 8 flagelos, disco suctorial ocupando 1/2-3/4 da superfície, corpos medianos horizontal ou oblíquos na parte inferior.
 <p>Cisto</p>	8 a 14 µm comprimento por 7 a 10 µm de largura.	Elipsóide ou ovóides.	2 – 4; não disinto em não corado.	Axonemas ou flagelos nos cistos não corados; fibras ou fibrilas em coloração profunda; membrana cística; citoplasma retraído em uma porção da parede celular; dois pares de corpos medianos.

Fonte: Adaptado de Thompson (2014); CDC (2016), CDC (2021).

Os cistos são elipsóides ou ovóides, raramente redondos, com dimensões de 8 a 14 µm de comprimento e 7 a 10 µm de largura. Possuem uma parede cística de aproximadamente 0,3 µm de espessura, composta por uma rede de filamentos externa e uma membrana interna constituída de duas membranas; estando presente proteínas de 29, 75, 88 e 102 kDa de tamanho, com predominância da galactosamina (N-acetilgalactosamina). Suas estruturas internas são duplicadas em relação ao trofozoíto: contendo de dois a quatro núcleos, dois pares de corpos medianos/parabasais em forma de meia-lua do lado oposto ao núcleo, e um número variável de

fibrilas (axonemas) (Quadro 2) (Figura 9). São eliminados nas fezes formadas, pastosas e diarreicas, encontrados tanto em amostras fecais dos hospedeiros infectados como no meio ambiente; são as formas de resistência e podem resistir aos processos comuns de tratamento da água potável de consumo; responsável pela disseminação da infecção (THOMPSON, 2004; CDC, 2016).

Figura 9 – Morfologia diferencial *Giardia* spp. (10 µm)

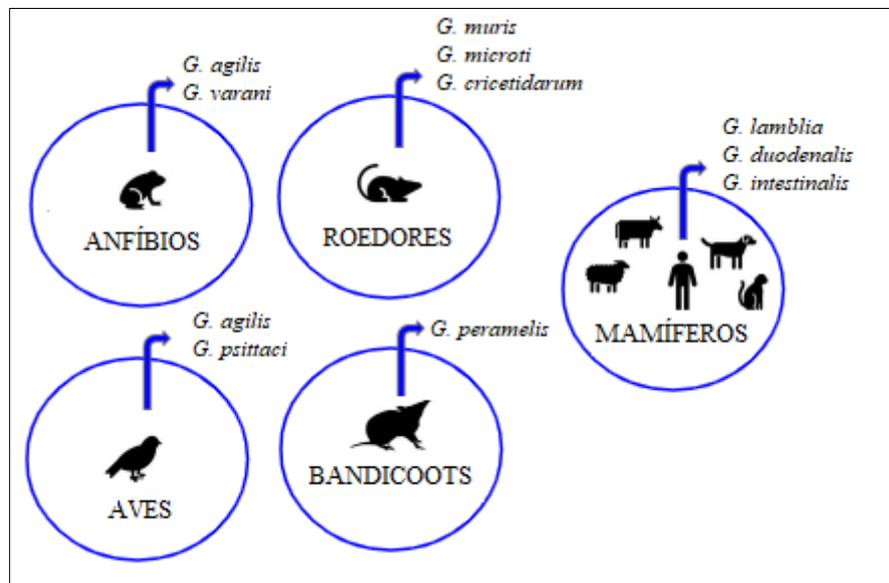


Fonte: Adaptado de CDC Diagnostic Procedures Morphcomp., 2016. Legenda: (A) – Trofozoíto visualizado em microscopia com mancha tricrômica. (B) – Cisto visualizado em microscopia com mancha tricrômica. (C) - Em microscopia de campo claro, corado com solução de iodo podem apresentar tonalidade pardacenta ou castanho-amarelada e os corpos medianos ficam corados em negro.

No seu ciclo de vida (Figura 10), as formas de diagnóstico são os cistos e trofozoítos, e segue a seguinte sequência: 1- A forma de resistência (cistos) é responsável pela disseminação e podem sobreviver vários meses em água fria; A infecção tem início com a transmissão do cisto de forma direta, pelo contato pessoa-pessoa, ou indireta pela via fecal-oral (mãos ou fômites), principalmente através de alimentos ou água contaminados. Os cistos passam pelo ambiente ácido do estômago, para desencistamento no intestino delgado. 2 – No intestino delgado, a excitação libera trofozoítos (cada cisto produz dois trofozoítos). 3 – Os trofozoítos se multiplicam por fissão binária longitudinal, permanecendo no lúmen do intestino delgado proximal onde podem estar livres ou aderidos à mucosa por um disco de sucção ventral, alimentando-se por pinocitose. 4 - O encistamento ocorre à medida que os parasitos transitam

A caracterização e taxonomia de *G. lamblia* são complicadas, principalmente pelo limite de diferenciação morfológica entre as espécies, sendo que atualmente oito espécies são validadas; cada espécie possui uma especificidade pelo hospedeiro, entretanto, algumas infectam diversos animais (Figura 11). Os nomes *G. duodenalis*, *G. intestinalis* e *G. lamblia* são sinônimos que identificam uma mesma espécie, a que infecta humanos e outros mamíferos, responsável por ser o agente etiológico da giardíase (HEYWORTH, 2016; XIAO e FENG, 2017; RYAN *et al.*, 2019).

Figura 11 – Espécies relacionadas a relatos em hospedeiros

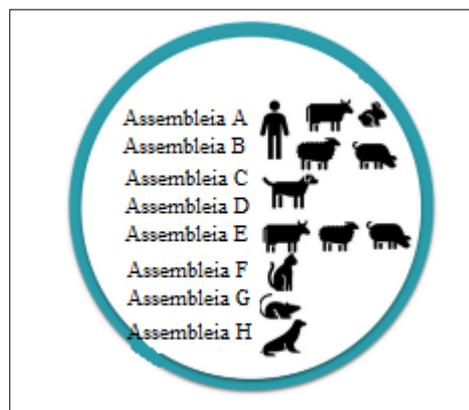


Fonte: Adaptado de Heyworth (2016); Xiao e Feng (2017) e Ryan *et al* (2019).

Somente a *G. lamblia* infecta humanos, sendo considerada um complexo de espécies; primeiramente evidenciado na década de 1980 através de uma comparação de isoenzimas de isolados de diferentes hospedeiros que observou grande heterogenicidade, confirmado posteriormente pela análise de antígenos de superfície e polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) de DNA (ANDREWS *et al.*, 1989; NASH, 1985). Essa espécie é subdividida em oito grupos genéticos ou assembleias (*assemblage*) que evidencia cada grupo maior contendo parasitos isolados não limitados a nenhuma localidade geográfica particular; de acordo com alguns autores, a distância genética entre algumas assembleias pode ultrapassar

a utilizada na descrição de protozoários, entretanto, não existem marcadores que possam diferenciá-los (THOMPSON e MONIS, 2004). Ainda, cada assembleia (A-H) possui suas particularidades e variações genéticas (Figura 12); as assembleias A e B são as mais prevalentes em infecções humanas e outros mamíferos, consideradas potencialmente zoonóticas; as assembleias C e D são mais evidenciadas em cães e coiotes; assembleia E é muito presente em bovinos, porcos e cabras (denominado *livestock*); assembleia F apresenta maior especificidade por gatos domésticos; assembleia G encontrada em ratos domésticos; e a última assembleia H é encontrado em animais marinhos, como a foca. Entretanto, algumas assembleias que possuem especificidades por determinados animais, já foram relatados em humanos (THOMPSON e MONIS, 2004 FENG e XIAO, 2011; CACCIO e RYAN, 2008; RYAN *et al*, 2021).

Figura 12 – Assembleias de *Giardia lamblia* relacionados a relatos em hospedeiros

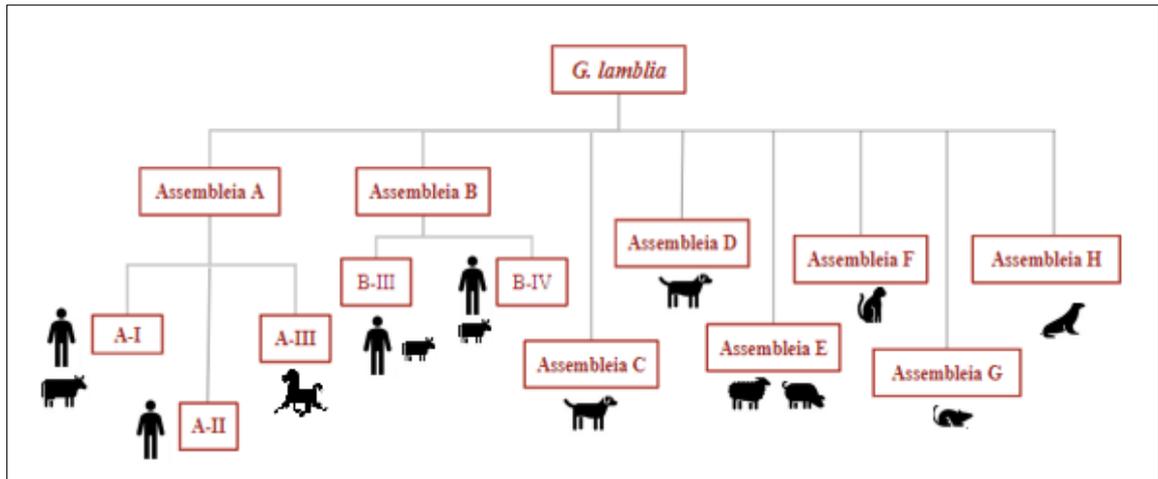


Fonte: Adaptado de Ryan *et al* (2021); fig. 2, p.1107.

As assembleias por sua vez, são subdivididas em subassembleias ou agrupamentos (*clusters*), as quais possuem certas especificidades: assembleia A: A-I presente em humanos e animais, A-II somente em isolados de origem humana e A-III em animais (XIAO e FENG, 2017); assembleia B: B-III e B-IV com relatos de ambas em infecções humanas, relacionadas a surtos em contaminação por manipuladores de alimentos (ANKARKLEV *et al.*, 2018; RYAN *et al.*, 2019) (Figura 13). Os níveis de diversidade genética da assembleia B são maiores que a assembleia A, sendo que muitos grupos genéticos diferentes consistem somente de isolados

únicos; o que sugere que a assembleia B contenha linhagens genéticas mais antigas do que a assembleia A (THOMPSON *et al.*, 2000).

Figura 13 – Assembleias e subassembleia de *Giardia lamblia* relacionadas a relatos em hospedeiros



Fonte: Adaptado de Xiao e Feng (2017); e Ankarklev., *et al* (2018).

A patogênese varia de acordo com aspectos do hospedeiro, como idade, estado imunológico e nutricional (estudos observaram pacientes com hipogamaglobulinemia, principalmente relacionado com IgA e IgE, como sendo mais adeptos a infecção); como também aspectos do protozoário, como a carga parasitária e características genéticas das linhagens presentes. *G. lamblia* é um parasito extracelular, conhecido por permanecer no lúmen do intestino delgado e colonizar o mesmo; os mecanismos não são totalmente elucidados, faltando ainda informações; entretanto, sabe-se que está relacionado com a alteração na morfologia da mucosa, o encurtamento e atrofia das vilosidades, alteração da atividade enzimática, apoptose de enterócitos, disfunção da barreira intestinal, produção de toxinas, e alteração da absorção de substâncias (BURET, 2008; HALLIEZ *et al*, 2013; BARTELT, *et al*, 2015).

Alguns aspectos estruturais do parasito proporcionam vantagens quanto ao processo de aderência e colonização ao intestino como, o citoesqueleto complexo de microtúbulos (MT) ou filamentos de actina que possui um papel importante na adesão, sendo influenciado por proteínas associadas como a cinesina; que possui diversos papéis em parte na motilidade, e em

outra pela segregação cromossômica do fuso. As funções celulares relacionadas com a actina ainda não são claras e estão começando a ser estudadas (ELMENDORF *et al*, 2003; NOSALA *et al*, 2015). Os flagelos garantem a motilidade do parasito, sendo fundamental para evitar o fluxo peristáltico e encontrar locais de fixação; além de ser importante na transição de uma forma morfológica a outra (DAWSON *et al*, 2010). O disco ventral é uma grande estrutura cheia de microtúbulos que facilita a aderência e fixação em microvilosidades e outras superfícies, provavelmente associada a mudanças em sua conformação durante o processo de aderência ao epitélio (DAWNSON *et al*, 2007).

A patogenia associada ao parasito resulta em um ataque anatomopatológico que o altera, após a adesão das formas proliferativas às microvilosidades dos enterócitos intestinais. Entre os principais mecanismos estão a ativação de sinalizações específicas, como as caspases que induzem a apoptose celular; o encurtamento ou atrofia das vilosidades, a perda de junção intercelular, o rearranjo do citoesqueleto das células, e a disfunção da barreira intestinal (ALI *et al*, 2003; NOSALA *et al*, 2015). Ao colonizar a mucosa duodenal, em grande quantidade, os trofozoítos aderidos formam uma barreira mecânica ou “atapetamento”, que somado a produção de toxinas, levam a diminuição da absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), vitamina B12, ácido fólico, ferro, gorduras, xilose e lactose; além de culminar em acúmulo de gordura na luz intestinal, hipersecreção de cloreto e consequente acúmulo de líquido no intestino (BARTELT, *et al*, 2015; BURET, 2008). Tudo isso resulta em uma redução da área de absorção da mucosa intestinal; e ainda em mecanismos fisiopatológicos como infiltrado leucocitário, presença de elementos inflamatórios, secreção de muco, e liberação de eletrólitos; resultando em uma má absorção de nutrientes e diarreia (CETARD *et al*, 2017).

3.2.2 EPIDEMIOLOGIA

A *G. lamblia* é um dos parasitos mais encontrados em amostras fecais humanas ao redor do mundo, especialmente em lugares com péssimas ou nulas condições sanitárias e higiênicas. As taxas variam de 20% a 33% em países em desenvolvimento e cerca de 3 a 7% em países desenvolvidos (CACCIO *et al*, 2008; HALLIEZ *et al*, 2013). Uma doença com ampla distribuição, causando em torno de 8×10^8 casos por ano; sendo na Ásia, África e América Latina

cerca de 200 milhões de casos sintomáticos, com cerca de 500.000 novos casos notificados a cada ano (LAL *et al.*, 2013).

Em 2004, a WHO declarou a infecção por *G. lamblia* como doença negligenciada, tendo em vista os dados dos anos 2000 demonstrando mais de 280 bilhões de pessoas no mundo infectadas. Até os dias atuais, essa alta prevalência continua intacta, estudos demonstram os níveis de prevalência: no Brasil, Cuba e México, as taxas variam de 45,2 – 100%, 80 – 92%, e 85,1% respectivamente. As taxas na Colômbia variam de 61 – 87%; Equador com 20% e Venezuela com 33,8% (GUZMÁN *et al.*, 2022). Na Líbia as taxas variam de 0,9% a 13% (GHENGHESH *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos as estimativas são de 1,2 milhões de pessoas infectadas por ano, causando em torno de 3 mil hospitalizações por ano (BEER *et al.*, 2017), entretanto, sabe-se que esses números totais de infecção ainda são subestimados, dado ao grande número de infecções assintomáticas e por consequência, subdiagnosticadas (CAMA *et al.*, 2015). Em relação a frequência das assembleias em humanos, foi relatado que a assembleia A ocorre em 37% das infecções e a B corresponde a 58% ao redor do mundo (ANKARKLEV *et al.*, 2018).

Também, é frequentemente encontrado em animais domésticos, como gato, cães e gados, e por se caracterizar como uma zoonose, diferentes animais podem contribuir para a propagação da forma cística e consequente contaminação (THOMPSON, 2004; FENG & XIAO, 2011). No gado de corte e leiteiro, as taxas de prevalência chegam a 100%, acometendo de forma mais significativa os bezerros; embora os estudos demonstrem uma taxa mais elevada da presença da assembleia E, específica de bovinos, existem relatos de presença da assembleia A, que é a mais comum em infecções humanas (THOMPSON, 2004). No Brasil estudos apontam uma taxa de até 45% de prevalência em cães, sendo encontrado assembleias C, D, AI, AII, BIII e BIV; e taxas de até 13,7% em gatos; ainda, taxas médias de prevalência de 18% em animais selvagens, e 23% em animais de fazenda (COELHO *et al.*, 2017).

Essa parasitose intestinal acomete cerca de mais de 280 milhões de pessoas a cada ano no mundo, principalmente crianças de até cinco anos de idade (EINARSSON *et al.*, 2016). Além da diarreia, a giardíase foi associada com artrite e síndrome do intestino irritável, um distúrbio crônico que acomete cerca de 7% de pessoas ao redor do mundo (NAKAO *et al.*, 2017). Em relação aos sintomas clínicos da doença, aproximadamente 50% dos indivíduos expostos acabam passando pela infecção de forma assintomática, sendo de 5% a 15% com eliminação

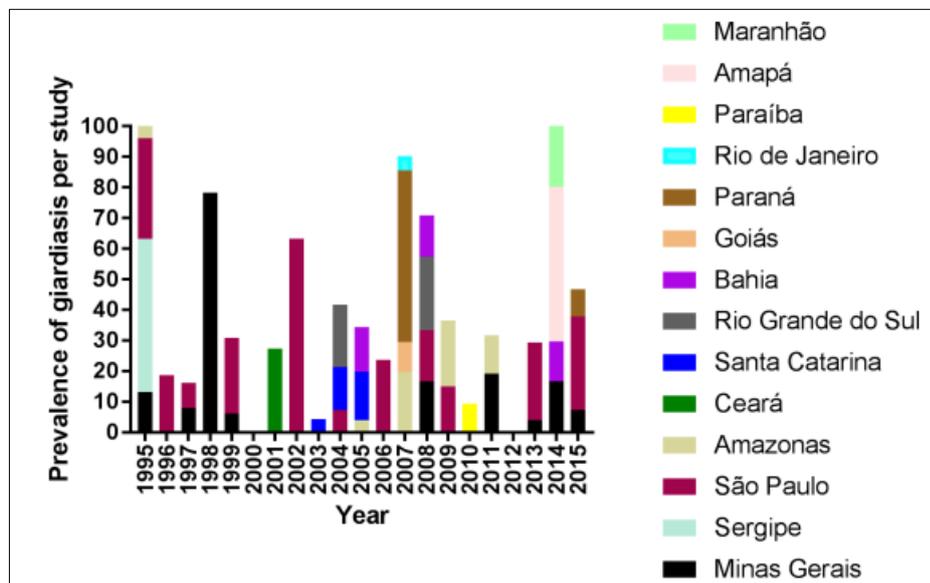
de cistos; entretanto, de 35% a 45% dos indivíduos infectados tem manifestações clínicas (CAEIRO, *et al.*, 1999).

A principal forma de transmissão é através da ingestão de cistos via fecal-oral através de água ou alimentos contaminados e de forma direta de pessoa para pessoa, principalmente entre as crianças (ANKARKLEV *et al.*, 2018; EINARSSON *et al.*, 2016). Por ser uma parasitose de veiculação hídrica, possui uma importância na saúde pública, sendo tanto de interesse das empresas de captação e fornecimento de água, como de interesse de órgãos públicos que a fiscalizam (THOMPSON, 2004). Surtos envolvendo a contaminação através de água e alimentos contaminados são importantes e estudos observam relatos com pelo menos 132 casos bem documentados desde 1954, mais comuns em países com melhores sistemas de vigilância, o que significa que a subnotificação se faz presente ao redor do mundo (FENG & XIAO, 2011). Relatos começaram a realmente aparecer meados de 1960, continuando com uma taxa de frequência de 1 a 2 vezes por ano até 2005; aumentando a taxa de forma significativa até os dias atuais. Uma revisão recente demonstra 142 surtos reportados, principalmente nos Estados Unidos e Nova Zelândia; relacionados com o aparecimento em comunidades sem sistema de saneamento básico ou em águas de recreação contaminadas (EFSTRATIOU *et al.*, 2017). Um dos maiores surtos de transmissão através de água contaminada foi em Portland nos Estados Unidos em 1955 com mais de 50.000 pessoas infectadas (RYAN *et al.*, 2021).

Ainda, são relevantes os surtos relacionados à contaminação direta por manipuladores de alimentos. Por sua alta transmissão e resistência aos ambientes, a *G. lamblia* é contemplada em diversas diretrizes de controle (WHO, 2017; GDWQ/WHO, 2017). Em 2010 a Organização Mundial da Saúde relatou 28,2 milhões de casos de transmissão através de alimentos contaminados e 26.270 vidas ajustadas por incapacidade (WHO, 2015). Comparado aos surtos através de água contaminada, surtos de alimentos contaminados são pouco relatados; tendo aproximadamente 38 surtos reportados, todos nos Estados Unidos, e totalmente subestimado ao redor do mundo (RYAN *et al.*, 2021). A transmissão de pessoa para pessoa pode ocorrer através de mãos contaminadas, principalmente relacionadas a lugares com aglomerações, como creches, orfanatos e etc.; pode também ser considerada uma doença sexualmente transmissível, pois as superfícies corporais contaminadas podem ser envolvidas (WOLFE, 1992; ESCOBEDO, 2014).

Em uma revisão sistemática recente realizada por Coelho e Colaboradores em 2017, a taxa de prevalência entre alguns estados do Brasil foram: 78,3% em Minas Gerais; 69,6% em São Paulo; Maranhão, Amapá, Sergipe e Paraná com taxas maiores de 30% (Figura 14); entretanto uma comparação absoluta não foi possível pelo alto número de estudos na região sudeste em relação à região nordeste, e heterogenicidade dos métodos de avaliação (COELHO *et al.*, 2017).

Figura 14 – Prevalência de Giardíase a partir de estudos de prevalência nos estados Brasileiros, 2017.



Fonte: COELHO *et al.*, 2017 – p.9. Legenda: dados gerados para demonstração da prevalência da giardíase em humanos para cada estudo realizado em alguns estados brasileiros ao longo de 20 anos analisados.

Além disso, diversos estudos sobre a epidemiologia mostram a alta frequência com taxas muitas vezes observadas acima de 60% da infecção em crianças (FANTINATTI *et al.*, 2020). Como é evidenciado em uma recente revisão sistemática de prevalência de parasitos em crianças africanas, com taxa de até 82,6% de positividade para *G. lamblia* (HAJISSA *et al.*, 2022); no Nepal observou-se uma taxa de 46,8%, sendo o parasita mais predominante em amostras fecais de crianças (GUPTA *et al.*, 2020); taxas menores aparecem em Bangladesh com 6,01% e Tailândia com 4,9% (HOSSAIN *et al.*, 2019; PATTANAWONG *et al.*, 2021). Em Israel as taxas de prevalência entre crianças, de até 4 anos é de 14,8% (MUHSEN *et al.*, 2013). Em

um estudo na Malásia, crianças menores que 10 anos obtiveram taxas de prevalência de 24,5%, sendo que crianças a partir de 10 anos possuíam taxas de prevalência menores de 17,8% (AL-MEKHLAFI *et al*, 2013). Em um último estudo na Espanha, observou-se taxa de 8,4% de positividade para *Giardia* spp. sendo que os sintomas gastrointestinais eram mais presentes em crianças menores de 2 anos (64%) (ARA-MONTOJO *et al*, 2021).

No Reino Unido foi relatado uma taxa de 1,3% de positividade para *G. lamblia* em crianças assintomáticas; ainda em um estudo investigativo de prevalência do parasita em domicílios, realizado em 2017, concluiu-se alta prevalência, cerca de 30% de infecção assintomática por *G. lamblia* nos domicílios, o que está relacionado com a transmissão na comunidade (WALDRAM *et al*, 2017). Na Venezuela, a taxa é de 32,1% em crianças de 1 a 14 anos de idade (LAUGART *et al*, 2012). Na Colômbia, as crianças entre 7 e 12 anos demonstraram uma taxa de 34% de positividade (CARRERO, 2013). Em um estudo de análise observacional de dados longitudinais de gastroenterite infantil causada por patógenos não virais na Nova Zelândia, as taxas de notificação ajustadas por idade para *G. lamblia* foram 50.9 por 100.000 (JEFFS *et al*, 2019).

3.2.3 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO

3.2.3.1 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas são proporcionais à carga parasitária e patogenicidade da linhagem genética presente, assim como depende do estado nutricional e imunológico do hospedeiro; portanto, os sintomas variam muito, com presença de pacientes assintomáticos e sintomáticos (GARCIA, 2007; REY L, 2008; FANTINATTI *et al.*, 2020). Pacientes assintomáticos continuam liberando formas císticas infectantes, atuando na disseminação do parasito (CACCIÒ e RYAN., 2008).

Os principais sintomas podem variar entre diarreia, mal-estar, dor epigástrica, enterite, cólicas abdominais, flatulência, perda de peso, irritação, inapetência, vômito e má absorção; podendo levar a uma síndrome da má absorção intestinal. A doença pode apresentar duas

formas, o estágio agudo e o crônico; em casos sintomáticos, o período de incubação varia de uma a três semanas, podendo chegar a seis semanas (COELHO, *et al.*, 2017; GARCIA, 2007). A diarreia pode aparecer de forma aguda, intermitente ou crônica e autolimitada ou persistente; sendo em geral gordurosas, fétidas e com a consistência variando de pastosa a líquida. A fase aguda da doença dura apenas alguns dias, sendo autolimitada, e comumente confundida com outras disenterias como as bacterianas, virais ou intoxicações alimentares (REY L, 2008; SOARES, 2016).

Além da diarreia, a giardíase foi associada com artrite e síndrome do intestino irritável, um distúrbio crônico caracterizado por dor abdominal a alterações intestinais com a periodicidade de 3 dias da semana com presença por pelo menos 3 meses (NAKAO *et al.*, 2017). Efeitos da doença relacionados a desnutrição e ao crescimento são observados em diversos estudos, principalmente em crianças. A síndrome da má absorção leva a desnutrição e ainda se associa com a diarreia crônica da giardíase; essa má absorção de nutrientes é relatada em média por 50% dos estudos dos pacientes sintomáticos (FENG & XIAO, 2011).

3.2.3.2 Métodos de diagnóstico

O principal método de diagnóstico utilizado na rotina laboratorial é a microscopia, através da identificação de cistos e trofozoítos nas amostras fecais. Os cistos podem ser encontrados tanto em infecções sintomáticas, como as assintomáticas; já os trofozoítos geralmente são encontrados em casos sintomáticos (JONHSTON *et al.*, 2003). O aspecto e consistência das fezes são um indicativo quanto ao tipo de forma presente, conseqüentemente informa o método a ser utilizado. Em fezes formadas são encontrados os cistos, fezes diarreicas ou líquidas os trofozoítos, e em fezes pastosas podem ser encontradas as duas formas (COELHO *et al.*, 2017).

A pesquisa de cistos pode ser realizada pelos métodos direto; métodos de concentração como, Faust e cols, Richie, MIF-C ou Lutz; utilizando Lugol para coloração. Para a pesquisa de trofozoítos é indicado a análise imediata da amostra ou adição de solução conservante (SAF, Formol a 10%, MIF) na amostra para evitar a degradação das formas; utiliza-se para investigação o método direto a fresco ou coloração com Lugol, ou permanente (hematoxilina

férrica ou tricômico) (Tabela 3) (Figura 15) (Figura 16). Entretanto, a sensibilidade é baixa, principalmente pela falta de padronização, experiência e especializações pelos analistas (KOEHLER *et al*, 2014; SCHUURMAN *et al*, 2007).

Tabela 3 –Morfologia diferencial de *G. lamblia* em espécimes de fezes de humanos

Morfologia diferencial de protozoários encontrados em espécimes de fezes de humanos							
Espécie	Estágio	Tamanho	Formato	Motilidade	Número de núcleos	Número de flagelos	Observação
<i>G. lamblia</i>	Trofozoíto	Pode ser 10-20 µm; faixa usual 12-15 µm.	Forma de pera, piriforme .	“Folha caindo”	Dois núcleos, não visíveis em métodos de microscopia de campo claro.	4 laterais; 2 ventrais; 2 caudais.	Disco de sucção ocupando 1/2-3/4 da superfície ventral. Corpos medianos deitados horizontalmente ou de forma oblíqua na parte inferior do corpo.
<i>G. lamblia</i>	Cisto	Pode ser 8-19 µm; faixa usual 11-12 µm.	Forma oval ou elipsoide.	Nula.	Em geral 4; não distinto em não corado. Geralmente localizado na extremidade.	Nulo.	Fibrilas/flagelos longitudinalmente e em cistos não corados; em coloração profunda podem estar lateralmente; o citoplasma se retrai de uma porção da parede celular.
Tamanhos baseados em informações de Rommel e Heydorn (1972) e Heydorn <i>et al</i> . (1975).							
Descrição baseada em informações de Zierdt, 1973 e McClure <i>et al</i> . (1980).							

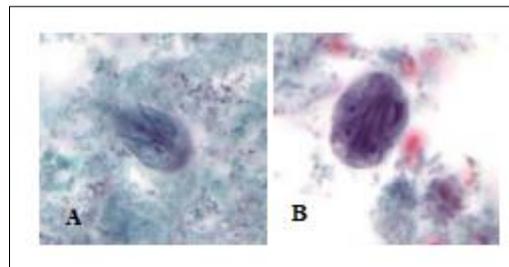
Fonte: Adaptado de CDC Diagnostic Procedures Morphcomp., 2016.

Figura 15 – Morfologia diferencial do cisto de *G. lamblia* (10 µm)



Fonte: Adaptado de CDC Diagnostic Procedures Morphcomp., 2016. Legenda: (A) – Cisto visualizado em microscopia de campo claro. (B) – Cisto visualizado em microscopia corados com iodo.

Figura 16 – Morfologia diferencial em coloração tricrômica de *G. lamblia* (10 µm)



Fonte: Adaptado de CDC Diagnostic Procedures Morphcomp., 2016. Legenda: (A) – Trofozoíto em coloração tricrômica. (B) – Cisto em coloração tricrômica.

Outros métodos de diagnóstico utilizados são os imunológicos, como o Ensaio de Anticorpo Fluorescente Direto (DFA): possui maior sensibilidade e especificidade, considerado padrão ouro por muitos laboratórios, recomenda-se usar uma amostra concentrada para aumentar a probabilidade de detecção, entretanto é necessário microscópio de fluorescência e kits comerciais, o que acaba encarecendo a técnica. Já o Imunoensaio Enzimático (IEE) não depende de microscopia, sendo útil inclusive para rastrear um grande número de amostras, que não precisam ser concentradas e são detectados os antígenos; entretanto pode existir resultados questionáveis que devem ser confirmados por outro método de diagnóstico, além disso existe a necessidade de equipamentos especiais como o leitor de microplacas. Ainda, existe o método do Ensaio rápido de cartuchos imunocromatográficos que são mais versáteis, podendo ser utilizado com amostras com ou sem solução conservante, sendo fáceis de utilização e garante um resultado rápido; como são detectados os antígenos, as amostras não devem ser

concentradas antes; entretanto, os testes com resultados questionáveis, devem ser confirmados por outro método de diagnóstico (SCHUURMAN *et al*, 2007; DPDx, 2022). Os métodos moleculares são mais utilizados para a diferenciação de espécies e classificação genotípica de *G. lamblia*, pouco utilizados na rotina laboratorial, pela demora e valores agregados (KOEHLER *et al*, 2014).

3.2.3.2.1 Amplificação de ácidos nucleicos

Estudos de diferentes autores comparando métodos de diagnóstico, demonstram a alta sensibilidade dos métodos moleculares em relação aos demais métodos empregados na rotina laboratorial; evidenciando o quão importante é o uso do método molecular como complemento da microscopia. Entretanto, esses métodos possuem alto custo relacionado aos materiais, equipe e protocolo, além de necessitar de um tempo maior para execução (SOARES *et al*, 2016).

Os métodos moleculares são muito utilizados para a caracterização das assembleias de *G. lamblia*, extraíndo, amplificando e sequenciando fragmentos genéticos específicos. O primeiro alvo descrito data de 1992, sendo utilizado a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com um fragmento de 183 pb no gene 18Ss rRNA; seguido de outro alvo desenvolvido em 1997, do mesmo gene com um fragmento de 292 pb (SSU- rRNA). Diversos estudos utilizaram esses alvos, entretanto, é mais utilizado para diferenciação de espécie e não subtipagem. Um alvo pouco utilizado é o ITS1-5.8S-ITS2, esse gene múltiplo gera informações sobre as espécies com boas ampliações, entretanto, poucas informações sub-genotípicas (THOMPSON *et al.*, 2015). Um gene também relatado em estudos, é o Efl- α , que informa tanto a espécie como informações subgenotípicas (FENG and XIAO, 2011; HEYWORTH, 2016; THOMPSON *et al.*, 2015).

Estudos da epidemiologia molecular demonstram que a resolução para a tipagem do parasito difere entre os lócus genéticos, e atualmente existem três principais marcadores moleculares que são comumente utilizados, principalmente pela capacidade de informação de espécie, subgenotipagem, sucesso de amplificação variável e amplo espectro de aplicação: TPI (triosefosfato isomerase), GDH (glutamato desidrogenase), e BG (beta-giardina); existindo concordância entre os pesquisadores sobre os resultados genéticos, subtipagem de assembleias

e geração de árvores filogenéticas convergente entre os três alvos (FENG and XIAO, 2011; BRYNILDSRUD *et al.*, 2018). A partir da análise das sequências de TPI, GDH e BG, os genomas das assembleias estão sendo identificados; constituindo em cromossomos com 10,7 – 13,0 Mb de tamanho e codificando em torno de 4.474 – 6.288 genes. Estudos recentes demonstram que a investigação utilizando genes múltiplos demonstra a complexidade da variação genética intraespecífica (RYAN *et al.*, 2021).

Diversos estudos demonstram a utilização de apenas um marcador molecular, observando-se diferentes taxas de detecção relatadas em amostras humanas: cerca de 70% utilizando o gene TPI, cerca de 33% utilizando o BG e 45% o GDH (HUEY *et al.*, 2013; THOMPSON *et al.*, 2016); sendo o TPI o mais frequentemente relatado para subtipagem (FENG and XIAO, 2011). Entretanto estudos mais recentes, demonstram a importância da utilização de pelo menos dois marcadores para comparação entre os grupos e conjunto genético, devido a resultados de genotipagem inconsistentes que podem ser gerados entre os diferentes alvos moleculares; e devido a ocorrência significativa de infecções com associação entre assembleias (FENG and XIAO, 2011). O uso de oligonucleotídeos específicos baseados no gene TPI foram úteis para avaliação dessas infecções mistas; e essa identificação da variação intraespecífica ajuda a compreender o processo da transmissão e fonte de contaminação (DURIGAN *et al.*, 2016; THOMPSON *et al.*, 2015).

3.2.4 TRATAMENTO

Entre os antimicrobianos utilizados, os Nitroimidazólicos possuem atividade contra *Giardia* spp. O tratamento de primeira escolha para giardíase são os Nitroimidazólicos, Metronidazol, Secnidazol, Tinidazol; sendo que Secnidazol e Tinidazol são semelhantes ao Metronidazol, possuindo diferenças farmacocinéticas com melhores posologias (ANVISA, 2007). O Metronidazol possui ampla atividade em infecções anaeróbicas e a posologia varia de acordo com o diagnóstico. Os comprimidos com as concentrações de 250 mg e 400 mg estão disponíveis no componente básico de saúde e a posologia recomendada está na Tabela 4. A suspensão oral de 40 mg/mL também é disponível para uso infantil (RENAME, 2022; DRUGS-METRONIDAZOLE, 2021).

Tabela 4 – Posologias do Metronidazol

Parasito	Dose	Como usar
Giardíase	Adultos: 250mg – VO; Crianças: 5mg/kg/dia – VO; dose máxima de 250mg.	A cada 8 horas por 5-7 dias; 3 vezes no dia por 5-7 dias.

Fonte: Adaptado de Drugs Metronidazole, 2021.

Pela presença no leite materno e a capacidade de atravessar a placenta, deve ser evitado durante o período de amamentação e gravidez. Dentre os principais efeitos adversos frequentes estão a diarreia, constipação, náuseas, vômitos, boca seca, alteração do paladar (gosto metálico), língua saburrosa, fraqueza, alteração de humor e do sono (RENAME, 2022; DRUGS-METRONIDAZOLE, 2021; ANVISA, 2007). Já o Secnidazol tem a posologia diferente, sendo que para adultos é administrado 2 g em dose única, e para crianças pode ser utilizado 30 mg/kg em dose única; ainda existe a suspensão oral de 450 mg/15mL e 900 mg/30mL; nenhuma forma farmacêutica encontra-se disponível no componente básico (DRUGS-SECNIDASOLE, 2022). O Tinidazol pode ser usado em adultos e crianças a partir de 3 anos de idade; a posologia para adultos é de 2 g em dose única; e para crianças 50 mg/kg em dose única (DRUGS-TINIDAZOLE, 2021).

Alguns estudos demonstraram resistência do parasito frente ao Metronidazol, alguns mecanismos de resistência seriam, o comprometimento da capacidade de remover o oxigênio do meio, em meios ricos em oxigênio, ocorre a redução do oxigênio ao invés do Metronidazol e promove a reoxidação dos compostos ativos. Outro mecanismo de resistência seria a inativação enzimática do fármaco; ou diminuição da atividade do complexo piruvato ferredoxina-oxirredutase, com menor ativação do fármaco (RANG *et al*, 2012).

Os fármacos anti-helmínticos também podem ser utilizados, possuindo amplo espectro de ação e podendo agir por dois mecanismos de ação. Os Benzamidazois são anti-helmínticos que não atuam em canais iônicos, como o Albendazol, que inibe a polimerização de tubulina por ligar-se a beta-tubulina, impedindo a polimerização, baixando a captação de glicose, por ser microtubulo-dependente; impedindo a multiplicação de diversos microrganismos, de amplo espectro e são mais seletivos e possuem menos efeitos adversos. Deve ser evitado o uso em casos de gravidez e período de amamentação. Possui efetividade similar ao Metronidazol e menores efeitos adversos, podendo ser utilizado como alternativa, embora não seja específico

para *Giardia* spp (DRUGS-ALBENDAZOLE, 2022). Disponível tanto no componente básico de saúde, como no especializado, apresentando-se também em suspensão oral com 40 mg/mL (DRUGS-ALBENDAZOLE, 2022; RENAME, 2022). Ainda dentro dos Benzamidazois, o Mebendazol pode ser uma alternativa para uso caso os fármacos de primeira escolha não tenham efeito (DRUGS-MEBENDAZOLE, 2022).

Um fármaco mais novo no mercado que pode ser utilizado é a Nitazoxanida, um antiparasitário de amplo espectro e com alta taxa de eficácia, apresentando-se na forma farmacêutica de comprimido e pó para suspensão oral de 20 mg/mL; as posologias estão apresentadas na Tabela 5. Um dos mecanismos de ação é atividade inibitória direta da enzima piruvato ferredoxina-oxirredutase, bloqueando a transferência de elétrons; e ainda atua na inibição da polimerização da tubulina do parasito; entretanto possui outros mecanismos de ação que não foram completamente esclarecidos. Entre os principais efeitos colaterais frequentes, estão o mal-estar, dor abdominal e cólicas. Entretanto, possui alto custo e não está disponível no componente básico de saúde (DRUGS-NITAZOXANIDE, 2022).

Tabela 5 – Posologias Nitazoxanida

Parasito	Dose	Como usar
Giardiase	Adultos: 500mg – VO. Crianças 1-3 anos: 100mg – VO; 4-11 anos: 200mg – VO; maiores de 12 anos: 500mg – VO.	A cada 12 horas por 3 dias.

Fonte: Adaptado de Drugs Nitazoxanide, 2022.

3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma metodologia que amplifica múltiplos fragmentos de DNA a partir de uma sequência específica de DNA ou RNA, de forma exponencial, fazendo parte das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos. Seu histórico data de 1983, quando foi inventada pelo químico Kary Mullis, recebendo o Prêmio Nobel de Química, 10 anos mais tarde (FERREIRA *et al*, 2012). O diagnóstico por PCR possui alta sensibilidade, pela capacidade de detecção da menor quantidade possível de DNA; e

especificidade, pelo menor número de resultados falsos-positivos ou falsos-negativos. Entretanto, por não possuírem um padrão comum e tantos resultados variantes entre laboratórios, é necessário a padronização e adequação do método, para garantir a eficácia e sensibilidade (MACKAY, 2007).

A estrutura do DNA consiste em uma dupla hélice, composta por fosfato, desoxirribose, quatro bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina e guanina), e ligações específicas entre os grupamentos; o DNA de fita dupla tem a sua orientação antiparalela composta por duas fitas que ficam em direções opostas (AMBRUS *et al.*, 2006). Para que a reação da PCR ocorra, é necessário primeiro a obtenção do DNA, que em geral é obtida pela extração do mesmo. O DNA possui carga negativa, proteases, magnésio e enrolamentos; para que a extração do DNA ocorra, primeiro precisa existir um rompimento celular; seguido do isolamento do DNA dos outros componentes celulares. Existem vários kits comerciais e protocolos para cada tipo de amostra a ser extraída, que resultam em uma amostra de DNA com alto grau de pureza (ELKINS, 2013).

O método de extração inclui a solução de lise que rompe a membrana celular, precipita os ácidos nucleicos e remove o restante; em uma segunda etapa ocorre a remoção do que foi precipitado e não é ácido nucleico, restando a precipitação do DNA para lavagem e por fim a eluição, obtendo-se amostras com elevado grau de pureza. Os ácidos nucleicos absorvem luz UV na faixa de 260 nm; a pureza é observada através da análise pelo espectrofotômetro em uma faixa de absorção de 200-1100 nm, em relação a proteína que absorve a 280 nm; então, para avaliação da pureza é necessário analisar a razão de absorbância a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}), que indica o nível de contaminação, sendo o ideal a variação de 1,7 a 1,9 para DNA; amostras com resultados inferiores a 1,7 sugere contaminação com proteínas. Outra medida de pureza é a análise da razão entre as absorbâncias 260 nm e 230 nm (A_{260}/A_{230}), que indica qualidade da amostra; o ideal é obtenção de valores em uma faixa de 1,8 e 2,2 e, um resultado inferior também pode indicar contaminação por outros compostos, como EDTA, fenol e carboidratos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Após a obtenção do DNA, é necessário ainda outros reagentes para a reação da PCR, como um par de iniciadores ou oligonucleotídeos (complementares ao DNA molde); desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), nucleotídeos (ATP, TTP, CTP, GTP); a enzima TaqDNA polimerase termoestável, que age como catalisadora da extensão; $MgCl_2$, que atua

como cofator da enzima; e tampão para garantir um estado ótimo para a enzima efetuar sua função; ainda, um termociclador que será responsável pelas alterações de temperaturas necessárias. Em suma, o DNA vai sofrer uma amplificação exponencial, através de vários ciclos, catalisada por uma DNA polimerase (OLIVEIRA *et al*, 2007).

O método possui três etapas, que também são conhecidas como fases exponencial, fase de crescimento e fase estacionária. A primeira etapa é a desnaturação da dupla hélice de DNA pelo calor (faixa de 94°- 96°), gerando no final duas fitas. A segunda etapa é a hibridização das sequências iniciadoras/oligonucleotídeos iniciadores (primers), com mudança de temperatura (faixa de 55°- 65°) durante um tempo específico que vai depender do alvo, ocorrendo o pareamento. A terceira etapa é a extensão, onde a enzima Taq DNA Polimerase vai agir em alta temperatura (faixa de 68° - 72°), por um tempo, extendendo a cadeia de DNA. Essas etapas se repetem através de uma ciclagem térmica, que ao final de cada ciclo, geram duas novas cadeias de cada fita dupla; levando a um crescimento exponencial e resultando em um DNA amplificado chamado de *amplicons* (Van VERKUIL *et al*, 2008). A visualização é evidenciada através do gel de agarose ou poliacrilamida que após coloração com brometo de etídio, pode ser visto através de transiluminador com ultra-violeta (SINGH *et al*, 2016).

Existem muitas variedades de PCR como a PCR multiplex ou múltipla (MPCR) que utiliza mais de um par de iniciadores na mesma reação (TURGHI *et al.*, 2004); PCR nested (N-PCR) que reduz a contaminação dos produtos (LAGOA *et al.*, 2008); PCR em tempo real (qPCR/RTQ-PCR) que garante a visualização da amplificação a medida que a mesma acontece (SCHULZ *et al.*, 2006); entre outras, cada uma com seus protocolos e especificidades.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado a partir de amostras fecais positivas para *G. lamblia* e *Blastocystis* sp. obtidas a partir da execução do projeto “Diagnóstico laboratorial de parasitoses intestinais: perfil epidemiológico das enteroparasitoses em escolares residentes de comunidade da cidade

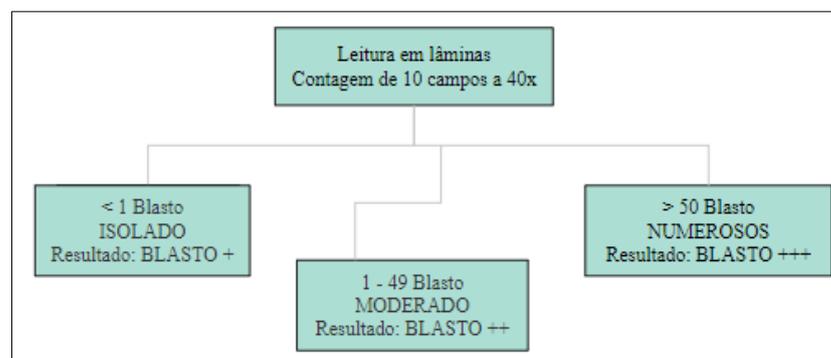
de Florianópolis-SC”, apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) CAAE 59641322.1.0000.0121. As análises das amostras fecais pelo Exame Parasitológico de Fezes foram realizadas em dois períodos: o primeiro entre os meses de abril de 2022 até julho de 2022, que contou com a participação de 96 crianças; e o segundo foi entre os meses de novembro de 2022 até dezembro de 2022, uma coleta que contou com a participação de 16 crianças; totalizando 112 amostras.

O exame foi realizado no Laboratório Didático de Parasitologia Clínica, do Departamento de Análises Clínicas/UFSC, e foram coletadas amostras com solução conservante para o processamento do Exame Parasitológico de Fezes (EPF) e sem conservantes para as análises por biologia molecular. Para o presente estudo, foram selecionadas as amostras com positividade para pelo menos um dos protozoários em estudo, *Blastocystis* sp. e *G. lamblia*.

4.1.1 Microscopia óptica

As técnicas empregadas para a detecção dos parasitos e visualização por microscopia, foram: Método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) - técnicas de sedimentação espontânea; Método de Faust - concentração através da centrífugo-flutuação; e Método Direto. Para a semi-quantificação de *Blastocystis* sp. foi realizado uma contagem a partir do Método direto com uma gota de Lugol (Figura 17) (TAN *et al.*, 2008).

Figura 17 – Semi-quantificação de *Blastocystis* sp.



Fonte: Adaptado de TAN *et al.*, 2008.

4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA TOTAL

As amostras fecais com positividade em microscopia para *Blastocystis* sp. e *G. lamblia* foram selecionadas e mantidas em refrigeração a -20 °C, sem conservantes. As amostras foram acondicionadas de duas formas: a primeira em um tubo tipo Falcon com capacidade de 50mL, acrescido de cerca de 1mL de tampão fosfato salino (PBS 1X) e uma alçada da amostra fecal; a segunda foi adicionado álcool absoluto, seguindo o mesmo procedimento. A homogeneização foi realizada por vórtex com agitação variando de 5 a 10 segundos, dependendo da consistência da amostra.

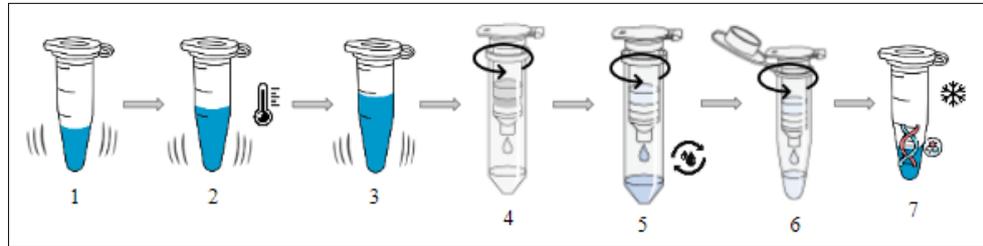
As suspensões obtidas foram submetidas a dois protocolos de extração: o protocolo de extração de DNA (Protocolo para cultura de células) do kit comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, USA) (Apêndice 1), disponível no laboratório; e o protocolo de extração de DNA (Protocolo para fungos) do kit comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini (Qiagen, Hilden, Germany); ambos utilizados conforme instruções do fabricante (Apêndice 2).

A quantificação do DNA extraído foi realizada utilizando o equipamento Espectrofotômetro NanoVue PLUS (GE Healthcare, EUA), e as amostras foram armazenadas a -80 °C até análise por PCR

4.2.1 Kit de extração PROMEGA

Por estar disponível no laboratório, o kit foi escolhido, e as amostras processadas de acordo com as instruções do fabricante (Figura 18) (Apêndice 1). As amostras acondicionadas foram utilizadas para realização do kit de extração.

Figura 18 – Resumo do protocolo kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System – Promega, USA



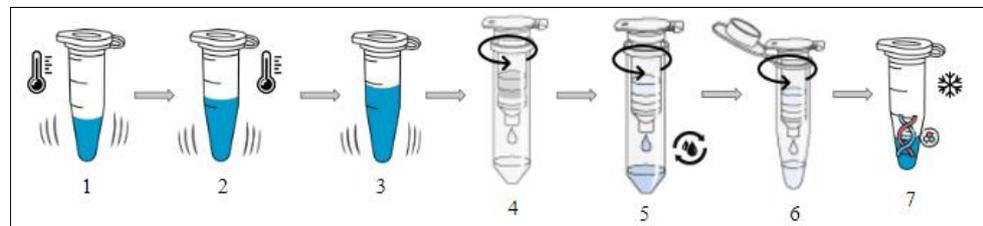
Legenda: 1) Adição de amostra e PK, vortex; 2) Adição de CLD, vortex, aquecimento 56°C por 10 minutos; 3) Adição de BBA, vortex; 4) Passagem para a coluna e centrifugação; 5) Lavagens com CWD e centrifugação (mín 3x); 6) Eluição com NFW com centrifugação; 7) Descarte de coluna e armazenamento.

Fonte: ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System –Promega, USA. Elaborado pela autora, 2022.

4.2.2 Kit de extração QIAGEN

Esse kit já foi amplamente utilizado no laboratório e por estar disponível posteriormente ao prazo do começo do estudo, foi utilizado apenas em amostras que obtiveram falha na amplificação. As amostras utilizadas encontravam-se nas mesmas condições da extração anterior e foi seguido o protocolo do fabricante (Figura 19) (Apêndice 2).

Figura 19 – Resumo do protocolo kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini - Qiagen, Hilden, Germany



Legenda: 1) Adição de amostra, ATL e PK, vortex e aquecimento a 56°C por 3 horas; 2) Adição de AL, vortex, aquecimento 70°C por 10 minutos; 3) Adição de Etanol, vortex; 4) Passagem para a coluna e centrifugação; 5) Lavagens com AW1/AW2 e centrifugação; 6) Eluição com AE com centrifugação; 7) Descarte de coluna e armazenamento. Fonte: QIAamp DNA Mini and Blood Mini - Qiagen, Hilden, Germany. Elaborado pela autora, 2022.

4.3 SELEÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

Primeiramente foi realizada uma busca na literatura quanto aos genes mais conservados de cada espécie, para aumentar a seletividade frente a pesquisa; e foram escolhidos aqueles para utilização em *nested* PCR. Foi utilizado também o Genbank para certificação e alinhamento dos iniciadores.

Para caracterização dos subtipos de *Blastocystis* sp. foi utilizado dois pares de iniciadores para englobar as posições polimórficas existentes da região do gene, como descrito por Scicluna *et al.*, 2006, o alvo escolhido é utilizado em diversos estudos. O primeiro par de iniciadores foi RD3 e RD5; o segundo par foi o BsRDsF e BhRDr9R. Segundo Scicluna *et al.*, 2006, foi demonstrado que uma pequena subunidade de genes de RNA ribossômico (SSU-rDNA), uma região específica do 18S do SSU rDNA, amplifica um fragmento de 600 pb; sendo uma região bem conservada em todos os subtipos, o *barcoding* é o suficiente para obtenção de informações para diferenciação dos subtipos; além de demonstrar alta seletividade por não apresentar presença em outros parasitos humanos (CLARK, 1977; CLARCK, 1992; SCICLUNA, *et al.*, 2006; MELO, 2019; BOGACKA, 2021; JINATHAM, 2021) (Tabela 6).

Tabela 6 – Oligonucleotídeos iniciadores de *Blastocystis* sp.

Nome	Sequência	Fragmento	Tm° Fabricante	Referência
RD3	5'- GGGATCCTGATCCTTCCGCAGGT TCACCTAC-3'	600 pb.	68	Clark, 1977; Clark, 1992; Scicluna <i>et al.</i> , 2006
RD5	5'- GGAAGCTTATCTGGTTGATCCTG CCAGTA-3'	600 pb.	62	Clark, 1977; Clark, 1992; Scicluna <i>et al.</i> , 2006
BsRDsF	5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	600 pb.	60	Clark, 1977; Clark, 1992; Scicluna <i>et al.</i> , 2006
BhRDr9R	5'- GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3'	600 pb.	62	Clark, 1977; Clark, 1992; Scicluna <i>et al.</i> , 2006

Fonte: SCICLUNA *et al.*, 2006; CLARCK, 1977; CLARCK, 1992; EXXTEND, 2022.

Para a caracterização genotípica das assembleias de *G. lamblia* foi utilizado dois pares de iniciadores bem descritos na literatura por Sulaiman *et al.*, (2003); alvos amplamente utilizados pela capacidade de identificação de espécie e assembleias, amplificando fragmentos do gene triosefosfato isomerase (TPI), um dos principais marcadores moleculares. Para a primeira PCR foi utilizado AL3543 e AL3546 com um fragmento final de 605 pb. Para a segunda PCR foi utilizado AL3544 e AL3545 obtendo-se um fragmento de 530 pb (SULAIMAN *et al.*, 2003; GEURDEN *et al.*, 2009) (Tabela 7).

Tabela 7 – Oligonucleotídeos iniciadores de *G. lamblia*

Nome	Sequência	Fragmento	Tm° Fabricante	Referência
AL3543	5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3'	605 pb.	54	Sulaiman <i>et al.</i> , 2003; Geurden <i>et al.</i> , 2009.
AL3546	5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3'	605 pb.	54	Sulaiman <i>et al.</i> , 2003; Geurden <i>et al.</i> , 2009.
AL3544	5'-CCCTTCATCGGICCTAACTT-3'	530 – 532 pb.	58	Sulaiman <i>et al.</i> , 2003; Geurden <i>et al.</i> , 2009.
AL3545	5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3'	530 – 532 pb.	68	Sulaiman <i>et al.</i> , 2003; Geurden <i>et al.</i> , 2009.

Fonte: Adaptado de SULAIMAN *et al.*, 2003; GEURDEN *et al.*, 2009; EXXTEND, 2022.

4.4 NESTED PCR

Os produtos da extração de DNA das amostras, armazenadas a -80°C, foram submetidos a reação em cadeia da polimerase convencional, seguida de uma segunda PCR a partir do produto da primeira PCR, esse princípio é chamado de *nested* PCR.

Para *Blastocystis* sp. foi utilizado um mesmo protocolo para cada reação de PCR, diferenciando-se os oligonucleotídeos (Tabela 8), adaptado de Bogacka *et al.*, 2021; Jinatham *et al.*, 2021; e Scicluna *et al.*, 2006. A partir do protocolo, foi realizado o teste com e sem Glicerol. As condições de ciclagem para o protocolo foram a desnaturação inicial a 94°C por 3 min., seguido por 35 ciclos com 94°C por 1 min. (desnaturação), 60°C por 1 min (pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores), 72°C por 2 min. (extensão) e 72°C por 7 min. (extensão

final); o termociclador utilizado foi o Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, EUA). A PCR foi realizada utilizando-se o kit de Taq Polimerase GoTaq® (Invitrogen).

Tabela 8 – Reagentes utilizados nas reações de PCR para *Blastocystis* sp.

Reagentes	Concentração	Volume
H2O qsp.	-	16,4 µL
Tampão	10% do volume da PCR	2,5 µL
MgCl2	(3mM)	1,5 µL
DNTPs	(100nM)	1 µL
RD3 / BsRDsF	(100nM)	1 µL
RD5 / BhRDr9R	(100nM)	1 µL
Taq DNA Polimerase	1U	0,2 µL
Glicerol	0,1 mg/mL	0,4 µL
DNA	-	1 µL
Volume total	-	25 µL

Fonte: Adaptado de BOGACKA *et al.*, 2021; JINATHAM *et al.*, 2021; SCICLUNA *et al.*, 2006.

Para *G. lamblia* foi utilizado como base o protocolo da *nested* PCR descrito por Sulaiman *et al.*, (2003), e de Geurden *et al.*, (2009); obtendo um protocolo para as reações com mudanças apenas entre os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 9). As condições de ciclagem para a primeira reação de PCR foram a desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguido por 35 ciclos com 94°C por 45 seg. (desnaturação), 53°C por 45 seg. (pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores), 72°C por 1 min. (extensão) e 72°C por 10 min. (extensão final). Já para a segunda reação de PCR as condições de ciclagem foram a desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguido por 35 ciclos com 94°C por 45 seg. (desnaturação), 55°C por 45 seg. (pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores), 72°C por 1 min. (extensão) e 72°C por 10 min. (extensão final). O termociclador utilizado foi o Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, EUA) e ambas as reações de PCR foram realizadas com a utilização do kit de Taq Polimerase GoTaq® (Invitrogen).

Tabela 9 – Reagentes utilizados nas reações de PCR para *G. lamblia*

Reagentes	Concentração	Volume
H2O	-	16,8 µL
Tampão	10% do volume da PCR	2,5 µL
MgCl ₂	(3mM)	1,5 µL
DNTPs	(100nM)	1 µL
AL3543 / AL3544	(100nM)	1 µL
AL3546 / AL3545	(100nM)	1 µL
Taq DNA Polimerase	1U	0,2 µL
Glicerol	0,1 mg/mL	0,4 µL
DNA	-	1 µL
Volume total	-	25 µL

Fonte: Adaptado de GEURDEN *et al.*, 2009; SULAIMAN *et al.*, 2003.

Os produtos de amplificação das reações para *Blastocystis* sp. e *G. lamblia* foram revelados por eletroforese em gel de agarose (1,5% + 0,5µg/mL de Brometo de etídio) no tampão de corrida Tris-Ácido Bórico-EDT (TBE) 1X, em corrida a 100V por cerca de 40min. A visualização da revelação do gel foi feita sob luz UV e fotografados no ImageQuant™ LAS 500 (General Electrics, EUA). Os produtos amplificados (*amplicons*) tiveram o seu tamanho comparado com o padrão de tamanho molecular (Ladder 50pb e 100pb).

4.4.1 Temperaturas de anelamento

A síntese dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizada pela empresa Exxtend (BRA), em escala de 100 nmol. Os primers foram ressuspensos em água RNase/DNase/Pirogênio free em concentração de 200 pmol/µL na solução estoque e armazenados em alíquotas de concentração de 20 pmol/µL. A temperatura *melting* (T_m°) ou temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi calculada a partir do seu estado bruto. Sendo assim, foram testadas as temperaturas tanto de protocolos, quanto as calculadas.

Para a primeira reação de PCR de *Blastocystis* sp. foi testado duas temperaturas de anelamento ou pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores: 60°C e 62°C (tabela 10); e para a segunda reação de PCR foi testada apenas uma temperatura: 60°C pelo resultado apresentado (Tabela 11).

Tabela 10 – Ciclos e temperaturas para a primeira PCR de *Blastocystis* sp.

Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	3 min.
35x	94°C	1 min.
	60°C	1 min.
	72°C	2 min.
1x	72°C	7 min.
Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	3 min.
35x	94°C	1 min.
	62°C	1 min.
	72°C	2 min.
1x	72°C	7 min.

Fonte: Adaptado de BOGACKA *et al.*, 2021; JINATHAM *et al.*, 2021; SCICLUNA *et al.*, 2006.

Tabela 11 – Ciclos e temperaturas para a segunda PCR de *Blastocystis* sp.

Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	3 min.
35x	94°C	1 min.
	60°C	1 min.
	72°C	2 min.
1x	72°C	7 min.

Fonte: Adaptado de BOGACKA *et al.*, 2021; JINATHAM *et al.*, 2021; SCICLUNA *et al.*, 2006.

Para a primeira reação de PCR de *G. lamblia* foi testado duas temperaturas de anelamento ou pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores: 50°C e 53°C (tabela 12); para a segunda reação de PCR foram testadas as temperaturas: 50°C, 55°C e 57°C (Tabela 13).

Tabela 12 – Ciclos e temperaturas para a primeira PCR de *G. lamblia*

Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	5 min.
35x	94°C	45 seg.
	50°C	45 seg.
	72°C	1 min.
1x	72°C	10 min.
Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	5 min.
35x	94°C	45 seg.
	53°C	45 seg.
	72°C	1 min.
1x	72°C	10 min.

Fonte: Adaptado de SULAIMAN *et al.*, 2003; GEURDEN *et al.*, 2009.

Tabela 13 – Ciclos e temperaturas para a segunda PCR de *G. lamblia*

Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	5 min.
35x	94°C	45 seg.
	50°C	45 seg.
	72°C	1 min.
1x	72°C	10 min.
Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	5 min.
35x	94°C	45 seg.
	55°C	45 seg.
	72°C	1 min.
1x	72°C	10 min.
Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	5 min.
35x	94°C	45 seg.
	57°C	45 seg.
	72°C	1 min.
1x	72°C	10 min.

Fonte: Adaptado de SULAIMAN *et al.*, 2003; GEURDEN *et al.*, 2009.

4.4.2 Avaliação de diferentes quantidades de DNA para otimização da PCR

As quantidades de DNA testadas foram 1, 3 e 6 μL para as primeiras reações de PCR de *Blastocystis* sp. e *G. lamblia* (Tabela 14).

Tabela 14 – Primeira PCR de *Blastocystis* sp. e *G. lamblia*

Reagentes	DNA 3 μL	DNA 6 μL
	Volume	Volume
H ₂ O	14,4 μL	11,4 μL
Tampão	2,5 μL	2,5 μL
MgCl ₂	1,5 μL	1,5 μL
DNTPs	1 μL	1 μL
Primer F1	1 μL	1 μL
Primer R1	1 μL	1 μL
Taq DNA Polimerase	0,2 μL	0,2 μL
Glicerol	0,4 μL	0,4 μL
DNA	3 μL	6 μL
Volume total	25 μL	25 μL

Fonte: Adaptado de SCICLUNA *et al.*, 2006; SULAIMAN *et al.*, 2003.

Para a segunda reação de PCR, a quantidade de DNA testada para *Blastocystis* sp. e *G. lamblia* foi de 1 μL (Tabela 15).

Tabela 15 – Segunda PCR de *Blastocystis* sp. e *G. lamblia*

Reagentes	DNA 1 μL
	Volume
H ₂ O	16,4 μL
Tampão	2,5 μL
MgCl ₂	1,5 μL
DNTPs	1 μL

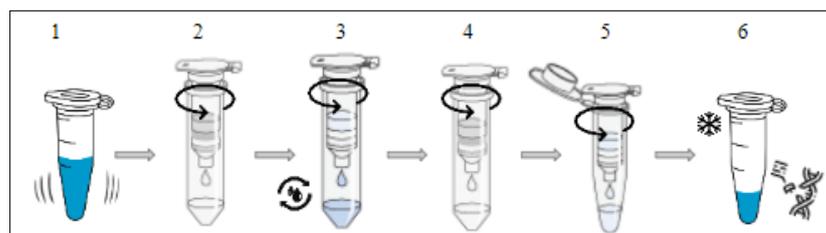
		DNA 1 μ L
Reagentes		Volume
Primer F2		1 μ L
Primer R2		1 μ L
Taq	DNA	0,2 μ L
Polimerase		
Glicerol		0,4 μ L
DNA		1 μ L
Volume total		25 μ L

Fonte: Adaptado de SCICLUNA *et al.*, 2006; SULAIMAN *et al.*, 2003.

4.5 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR de *G. lamblia* e *Blastocystis* sp. foram purificados através do kit comercial PCR Products Purification Kit da empresa Mebep Bioscience, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante (Apêndice 3) (Figura 20); após esse processo, as amostras foram acondicionadas a -20°C até o envio para sequenciamento.

Figura 20 – Protocolo kit de purificação Mebep Bioscience



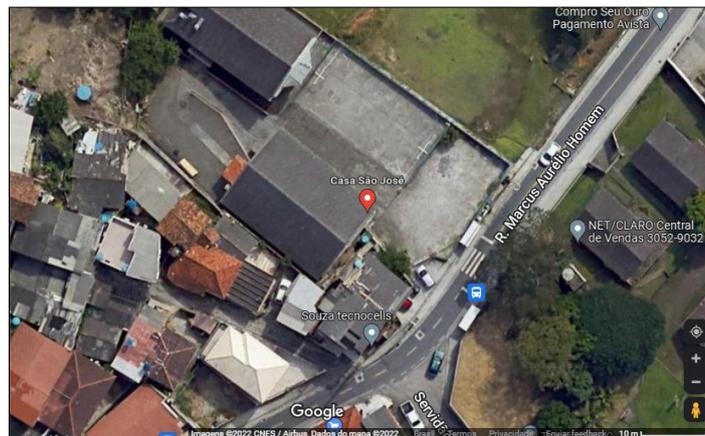
Legenda: 1) Adição de BB, amostra e vortex; 2) Preenchimento da coluna e centrifugação; 3) Lavagens com WB (2x); 4) Centrifugação da coluna vazia; 5) Eluição com tampão e centrifugação. Adaptado de kit de purificação Mebep Bioscience. Elaborado pela autora, 2022.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAGEM

As instituições participantes foram a Casa São José (Figura 21) e Creche São Francisco de Assis (Figura 22), situadas no bairro da Trindade, na comunidade da Serrinha, a qual faz parte do complexo Maciço do Morro da Cruz.

Figura 21 – Localização Casa São José



Fonte: Adaptado de Google Maps, 2022.

Figura 22 – Localização Creche São Francisco de Assis

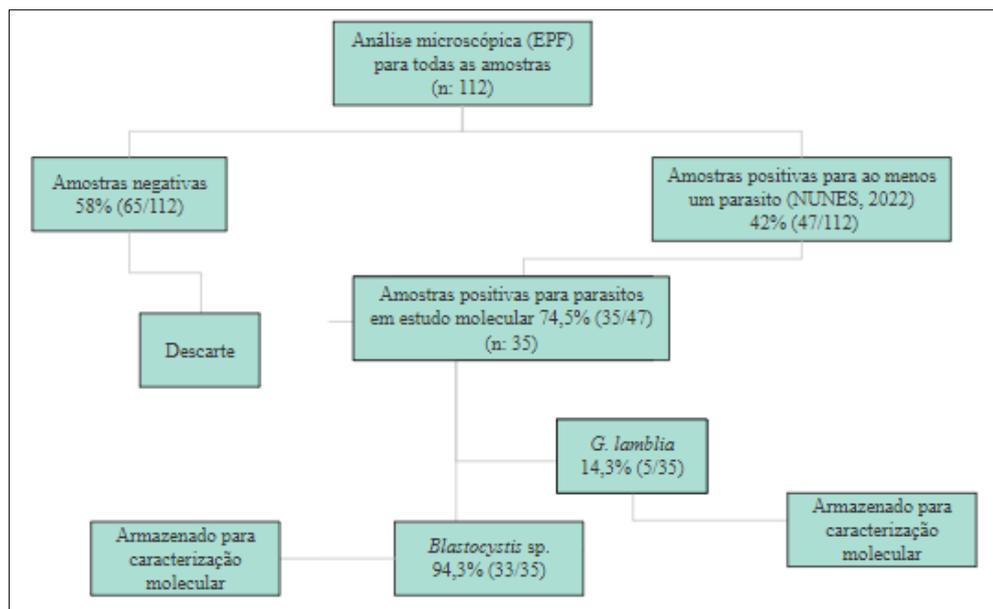


Fonte: Adaptado de Google Maps, 2022

A primeira coleta contou com a participação de 96 crianças, sendo 39,58% (38) pertencentes à CSJ e 60,42% (58) à CSFA. A recoleta contou com a participação de 16 crianças, 50% (8) pertencentes à CSFA e 50% (8) pertencentes à CSJ, sendo que apenas duas crianças/adolescentes não haviam participado da primeira coleta. A análise das amostras fecais totais pelo EPF obteve o total de 42% (47/112) de positividade para ao menos um tipo de parasito (NUNES, 2022). Dentre as amostras positivas para ao menos um tipo de parasito, as amostras selecionadas para este estudo, foram aquelas positivadas para ao menos um dos protozoários especificados (*Blastocystis* sp. e *G. lamblia*) com um total de 74,5% (35/47) de positividade.

Das 35 amostras positivas selecionadas, 94,3% (33) foram positivas para *Blastocystis* sp., e 14,3% (5) positivas para *G. lamblia* (Figura 23).

Figura 23 – Fluxograma e positividade das amostras



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

5.1.1 Microscopia óptica

Para a identificação de *G. lamblia*, foi evidenciado as formas características e em seguida separados para caracterização molecular, conforme descrito anteriormente. Para a semi-quantificação de *Blastocystis* sp., as amostras foram contabilizadas (Tabela 16) e categorizadas em cruces, as amostras que não obtiveram as quantificações não receberam as categorias (-) (TAN *et al.*, 2008). Ao total, foi obtido a semi-quantificação de 63,63% (21/33) amostras.

Tabela 16 – Resultado da semi-quantificação de *Blastocystis* sp.

Número	Resultado
1	BLASTO +
4	-
6	BLASTO ++
15	-
18	BLASTO +
19	BLASTO +
27	BLASTO ++
28	BLASTO +
31	BLASTO ++
32	-
35	-
37	-
39	BLASTO +
51	BLASTO ++
60	BLASTO +
63	-
66	BLASTO +
78	BLASTO +
79	BLASTO +
81	BLASTO +
84	-
89	BLASTO ++
91	BLASTO +
92	-
95	-
96	BLASTO ++

Número	Resultado
AM1	BLASTO +
AM5	-
AM9	BLASTO +++
AM10	BLASTO +
AM11	-
AM14	-
AM16	BLASTO ++

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

5.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA TOTAL

O kit comercial utilizado na grande parte das amostras foi o ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, USA). Para as amostras que não resultaram em amplificação para o primeiro kit de extração, foi executado o segundo kit de extração QIAamp DNA Mini and Blood Mini (Qiagen, Hilden, Germany), sendo realizada a comparação dos resultados.

5.2.1 Kit de extração PROMEGA

Para a extração do DNA das amostras positivas para *Blastocystis* sp. foram utilizadas as soluções obtidas da amostra acondicionada com Álcool absoluto, obtendo-se uma quantificação de DNA que variou de 77,5 – 4,2 ng/uL (Tabela 17). Para a extração do DNA das amostras positivas para *G. lamblia* foram utilizadas as soluções obtidas das amostras acondicionadas com PBS, obtendo-se uma quantificação de DNA que variou entre 200,0 – 22,0 ng/uL (Tabela 18).

A avaliação da pureza foi realizada ao observar a razão de absorbância a 260 nm e 280 nm (A260/A280), sendo que o padrão ouro estipulado foi o valor ideal de variação de 1,7 a 1,9 para DNA. Entre as amostras positivas para *Blastocystis* sp., 66,7% (22) obtiveram resultados menores ou maiores do que o valor ideal de variação; assim como 40% (2) das amostras positivas para *G. lamblia* se encontraram fora do valor ideal. Entretanto o valor abaixo de 1,7 foram evidenciados em 33,33% (11) amostras no total das amostras positivadas para *Blastocystis* sp. e 20% (1) de *G. lamblia*.

Outra medida de pureza avaliada foi a razão entre as absorvâncias 260 nm e 230 nm (A260/A230), onde o padrão ouro é a obtenção de valores em uma faixa de 1,8 e 2,2 para DNA. Entre as amostras positivas para *Blastocystis* sp., apenas 6,06% (2) obtiveram resultados dentro do padrão; já para as amostras de *G. lamblia*, todas obtiveram resultados fora do padrão.

Tabela 17 – Quantificação de DNA de *Blastocystis* sp. por espectrofotômetro (PROMEGA)

Kit comercial	Amostra	Concentração	A260/280	A260/A230
Promega, USA	1	68 ng/UI	2,194	2,030
Promega, USA	4	29 ng/UI	1,822	1,602
Promega, USA	6	4,2 ng/UI	1,982	1,000
Promega, USA	15	28 ng/UI	2,456	1,143
Promega, USA	18	6,5 ng/UI	2,278	1,125
Promega, USA	19	6,6 ng/UI	2,410	1,000
Promega, USA	27	5,1 ng/UI	2,238	1,306
Promega, USA	28	4,7 ng/UI	1,775	1,972
Promega, USA	31	14 ng/UI	1,973	1,423
Promega, USA	32	77 ng/UI	2,056	1,104
Promega, USA	35	25 ng/UI	1,907	1,040
Promega, USA	37	32 ng/UI	2,182	1,312
Promega, USA	39	21 ng/UI	1,720	0,942
Promega, USA	51	8,3 ng/UI	1,760	1,385
Promega, USA	60	24 ng/UI	1,911	1,689
Promega, USA	63	6,4 ng/UI	1,643	0,704
Promega, USA	66	25,7 ng/UI	1,664	0,662
Promega, USA	78	35,5 ng/UI	1,404	0,525
Promega, USA	79	11,5 ng/UI	1,737	0,314
Promega, USA	81	15,1 ng/UI	1,716	0,780
Promega, USA	84	11,2 ng/UI	2,753	1,689
Promega, USA	89	6,7 ng/UI	1,646	1,013
Promega, USA	91	12,2 ng/UI	1,659	1,186
Promega, USA	92	15 ng/UI	2,500	2,913
Promega, USA	95	15,9 ng/UI	1,401	0,624
Promega, USA	96	4,5 ng/UI	1,037	0,433
Promega, USA	AM1	57,5 ng/UI	1,825	0,498

Kit comercial	Amostra	Concentração	A260/280	A260/A230
Promega, USA	AM5	4,5 ng/UI	1,477	0,894
Promega, USA	AM9	7,3 ng/UI	1,235	1,609
Promega, USA	AM10	5,5 ng/UI	2,046	2,697
Promega, USA	AM11	6,2 ng/UI	1,302	0,622
Promega, USA	AM14	5,9 ng/UI	0,942	0,693
Promega, USA	AM16	10 ng/UI	2,609	1,590

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 18 – Quantificação de DNA de *G. lamblia* por espectrofotômetro (PROMEGA)

Kit comercial	Amostra	Concentração	A260/280	A260/A230
Promega, USA	6	22 ng/UI	1,982	0,698
Promega, USA	52	132,5 ng/UI	2,038	1,743
Promega, USA	53	68 ng/UI	1,619	0,805
Promega, USA	60	43 ng/UI	1,911	1,689
Promega, USA	92	200 ng/UI	1,818	0,993

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

5.2.2 Kit de extração QIAGEN

As amostras positivas para *Blastocystis* sp. obtiveram um rendimento de DNA variando de 78 – 8,2 ng/uL (Tabela 19); já para as amostras positivas para *G. lamblia*, a quantificação variou de 74,5 – 9,5 ng/uL (Tabela 20).

A avaliação da pureza também foi realizada (A260/A280), comparando com a faixa de 1,7 a 1,9. Para as amostras de *Blastocystis* sp., 66,7% (4) obtiveram resultados fora da faixa; já para as amostras de *G. lamblia*, 60% (3) se encontraram fora do valor ideal, entretanto o valor abaixo de 1,7 não foram evidenciados tanto para as amostras de *Blastocystis* sp., quanto para as de *G. lamblia*.

Foi avaliada uma segunda medida de pureza (A260/A230), com a comparação dos resultados na faixa de 1,8 e 2,2. Para amostras de *Blastocystis* sp., e *G. lamblia*, todas obtiveram resultados fora da faixa esperada.

Tabela 19 – Quantificação de DNA de *Blastocystis* sp. por espectrofotômetro (QIAGEN)

Kit comercial	Amostra	Concentração	A260/280	A260/A230
Qiagen, GER	06	74,5 ng/UI	1,733	0,500
Qiagen, GER	60	9,5 ng/UI	2,676	0,229
Qiagen, GER	78	8,2 ng/UI	2,303	0,688
Qiagen, GER	95	78 ng/UI	1,720	0,800
Qiagen, GER	96	5,8 ng/UI	2,377	0,285
Qiagen, GER	AM16	8,5 ng/UI	2,167	0,580

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 20 – Quantificação de DNA de *G. lamblia* por espectrofotômetro (QIAGEN)

Kit comercial	Amostra	Concentração	A260/280	A260/A230
Qiagen, GER	6	74,5 ng/UI	1,733	0,500
Qiagen, GER	52	60,5 ng/UI	2,123	1,000
Qiagen, GER	53	35,5 ng/UI	1,919	0,550
Qiagen, GER	60	9,5 ng/UI	2,676	0,229
Qiagen, GER	AM10	23,5 ng/UI	2,293	0,653

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

5.3 NESTED PCR PARA *Blastocystis* sp.

Após a extração, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20°C até o momento da realização dos protocolos da reação da PCR.

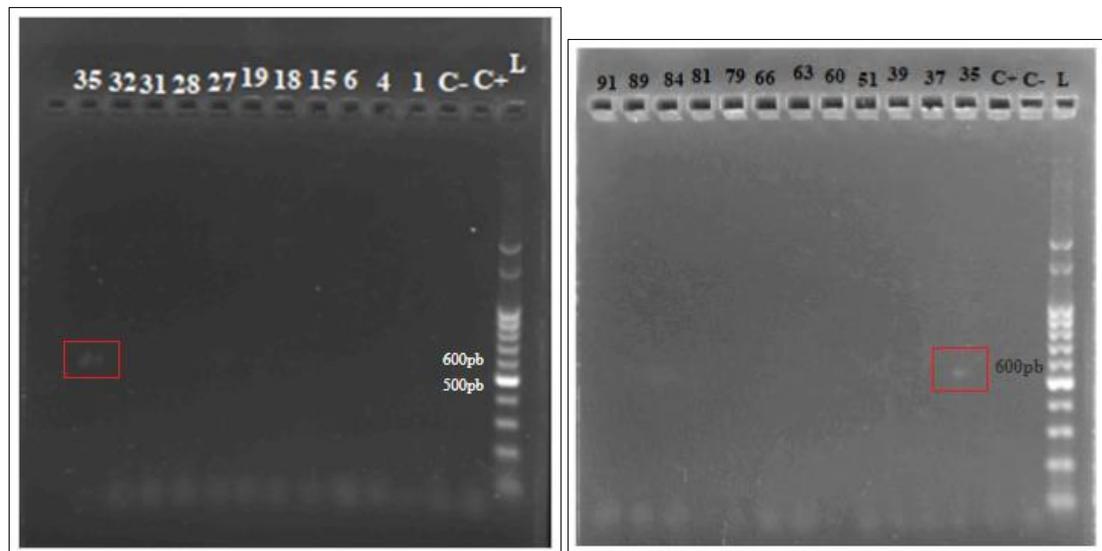
5.3.1 PCR com DNA extraído pelo kit Promega

5.3.1.1 Primeira PCR

5.3.1.1.1 Temperaturas de anelamento

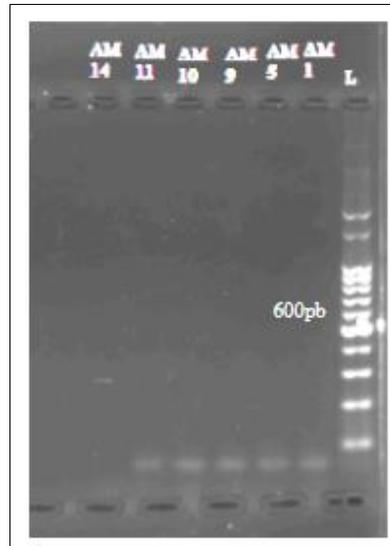
O primeiro protocolo testado foi adaptado de Bogacka *et al*, 2021; Jinatham *et al.*, 2021; e Scicluna *et al*, 2006; sem adição de glicerol. As temperaturas de ciclagem foram aquelas descritas anteriormente na Tabela 10. A Figura 24 e 25 mostra o gel de agarose com os produtos de amplificação, que embora não apresentaram fragmentos inespecíficos, também não apresentaram fragmentos de tamanho esperado, com exceção da amostra 35 que demonstrou o fragmento esperado de 600pb.

Figura 24 – Gel de agarose dos produtos de PCR com os iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado sem glicerol realizado com DNA das amostras positivas para *Blastocystis* sp. a uma temperatura de anelamento de 60°C



Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 100 pb; C- = Controle negativo a água ultrapura; C+ = Amostra com 3 cruces positivas para o parasito; 1 = Amostra 01; 4 = Amostra 04; 6 = Amostra 06; 15 = Amostra 15; 18 = Amostra 18; 19 = Amostra 19; 27 = Amostra 27; 28 = Amostra 28; 31 = Amostra 31; 32 = Amostra 32; 35 = Amostra 35; 37 = Amostra 37; 39 = Amostra 39; 51 = Amostra 51; 60 = Amostra 60; 63 = Amostra; 66 = Amostra 66; 79 = Amostra 79; 81 = Amostra 81; 84 = Amostra 84; 89 = Amostra; 91 = Amostra 91. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Figura 25 – Gel de agarose dos produtos de PCR com os iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado sem glicerol realizado com DNA das amostras positivas para *Blastocystis* sp. a uma temperatura de anelamento de 60°C

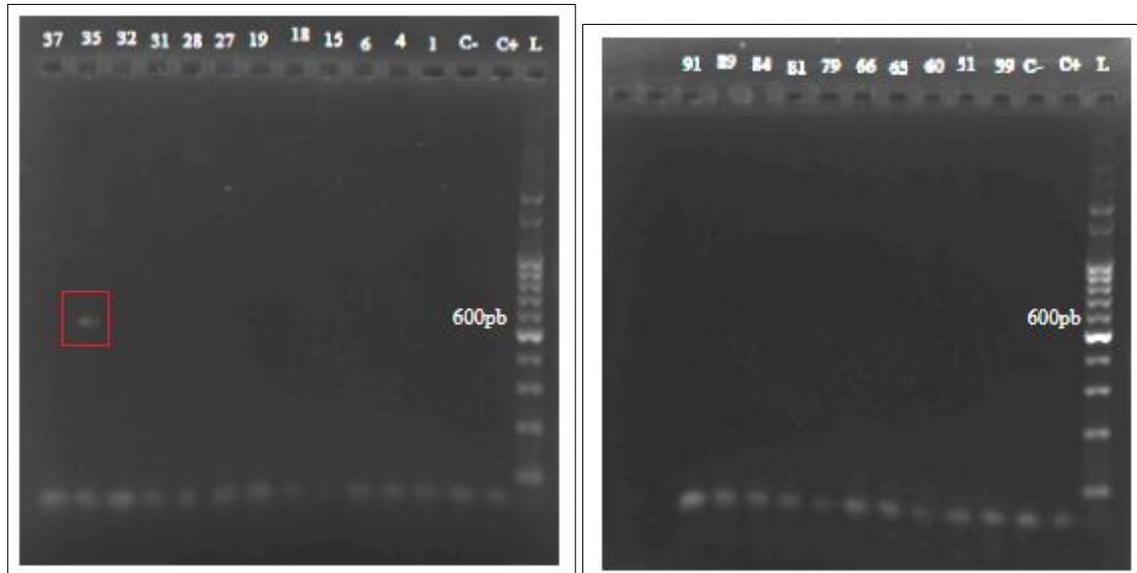


Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 100 pb; AM1 = Amostra recoleta; AM5 = Amostra recoleta; AM9 = Amostra recoleta; AM11 = Amostra recoleta; AM14 = Amostra recoleta. Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

O segundo protocolo testado foi com a adição de glicerol, de acordo com o protocolo descrito na Tabela 8. As temperaturas de ciclagem foram aquelas descritas na Tabela 10.

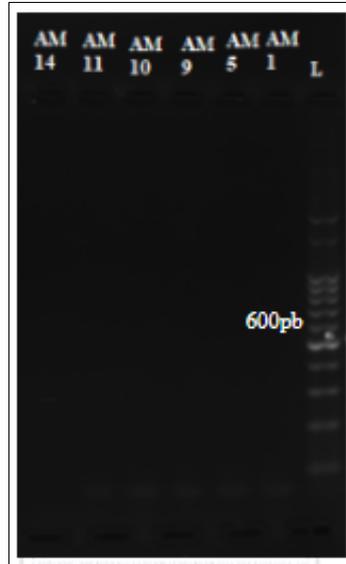
A Figura 26 e 27 ilustra o gel de eletroforese com os produtos de amplificação obtidos com a temperatura de anelamento de 60°C, que permitiu observar fragmento de 600 pb apenas a amostra 35. Já na Figura 28 demonstra o gel de agarose com os produtos de amplificação obtidos a partir da temperatura de anelamento de 62°C avaliada, o qual não apresentou produto de amplificação.

Figura 26 – Gel de agarose dos produtos de PCR com os iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol realizado com DNA das amostras positivas para *Blastocystis* sp. a uma temperatura de anelamento de 60°C



Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 100 pb; C- = Controle negativo água ultrapura; C+ = Amostra com 3 cruzes positivas para o parasito; 1 = Amostra 01; 4 = Amostra; 6 = Amostra 06; 15 = Amostra 15; 18 = Amostra 18; 19 = Amostra 19; 27 = Amostra 27; 28 = Amostra 28; 31 = Amostra 31; 32 = Amostra 32; 35 = Amostra 35; 37 = Amostra 37; 39 = Amostra 39; 51 = Amostra 51; 60 = Amostra 60; 63 = Amostra; 66 = Amostra 66; 79 = Amostra 79; 81 = Amostra 81; 84 = Amostra 84; 89 = Amostra; 91 = Amostra 91; Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 27 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol realizado com DNA das amostras positivas para *Blastocystis* sp. a uma temperatura de anelamento de 60°C



Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 100 pb; AM1 = Amostra recoleta; AM5 = Amostra recoleta; AM9 = Amostra recoleta; AM11 = Amostra recoleta; AM14 = Amostra recoleta. Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 28 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol realizado com DNA das amostras positivas para *Blastocystis* sp. a uma temperatura de anelamento de 62°C



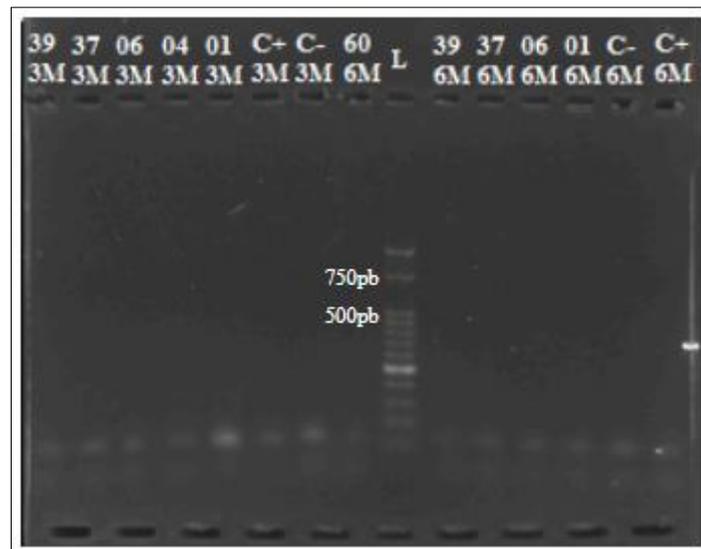
Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C- = Controle negativo água ultrapura; C+ = Amostra com 3 cruzes positivas para o parasito; 4 = Amostra 04; 6 = Amostra 06; 15 = Amostra 15; 18 = Amostra 18; 19 =

Amostra 19; 27 = Amostra 27; 28 = Amostra 28; 31 = Amostra 31; 32 = Amostra 32; 37 = Amostra 37; 39 = Amostra 39; 51 = Amostra 51; Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

5.3.1.1.2 Avaliação de diferentes quantidades de DNA para otimização da PCR

As concentrações de DNA testadas foram as descritas anteriormente (Tabela 14) com a temperatura de anelamento escolhida de 60°C (Tabela 10). Na figura 29 é possível observar que não houve amplificação nas duas condições testadas.

Figura 29 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol a temperatura de 60°C de anelamento, testando concentrações de 3 µL e 6 µL de DNA das amostras positivas para *Blastocystis* sp.

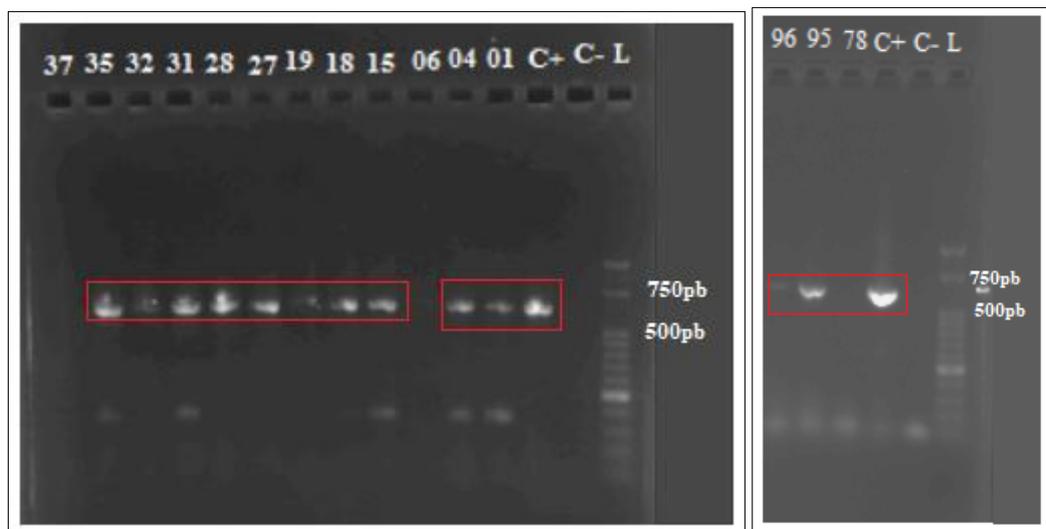


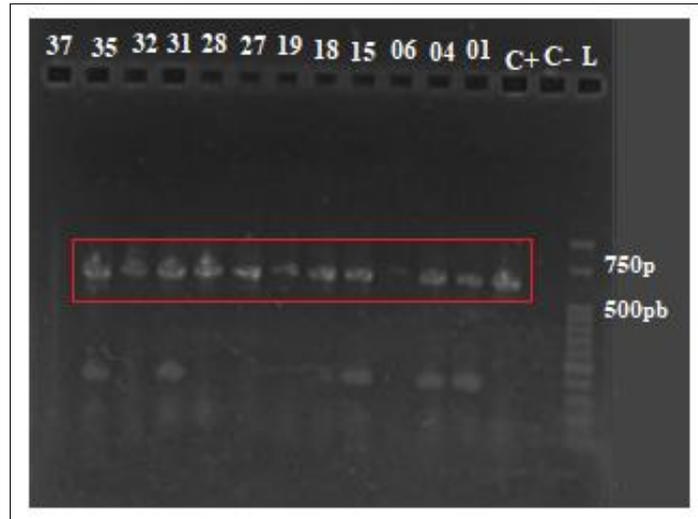
Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C- 6M = Controle negativo 6µL; C+ 6M = Amostra 6µL; 01 6M = Amostra 6µL; 06 6M = Amostra 6µL; 37 6M = Amostra 6µL; 39 6M = Amostra 6µL; 60 6M = Amostra 6µL; C- 3M = Controle negativo 3µL; C+ 3M = Amostra 3µL; 01 3M = Amostra 3µL; 04 3M = Amostra 3µL; 06 3M = Amostra 3µL; 37 3M = Amostra 3µL; 39 3M = Amostra 3µL.

5.3.1.2 *Nested* PCR (nPCR)

O protocolo testado foi aquele descrito na seção 4.4, com o segundo par de oligonucleotídeos como descrito na Tabela 8; com a temperatura de anelamento de 60°C (Tabela 10). Como observado na Figura 30 e 31, a temperatura de anelamento escolhida quase não gerou fragmentos inespecíficos e foi possível visualizar fragmentos com o tamanho de 600pb esperados. É possível observar a amplificação do fragmento esperado para 28 amostras; obtendo-se 84,84% de amplificação do total (28/33) das amostras positivas para *Blastocystis* sp.

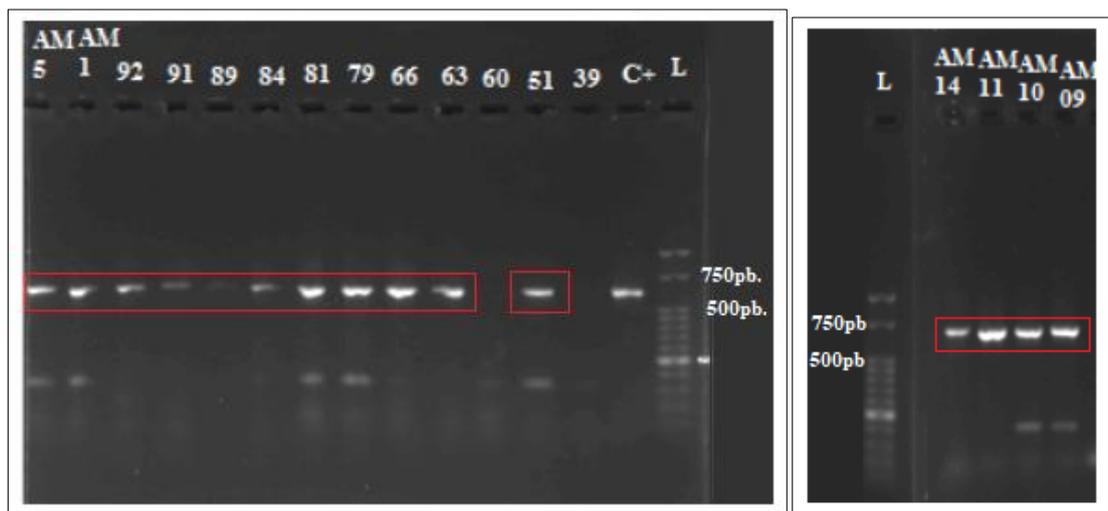
Figura 30 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) utilizando os iniciadores BsRDsF e BhrDR9R para amplificação do gene SSU rDNA de 600 pb de *Blastocystis* sp. utilizando glicerol e temperatura de anelamento 60°C

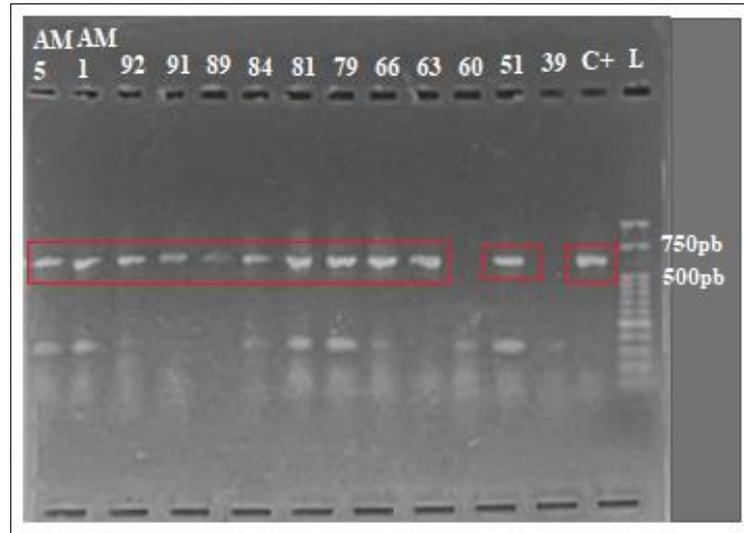




Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C+ = Amostra com 3 cruces de positividade para o parasito; C- = água ultrapura; 01 = Amostra 01; 04 = Amostra 04; 06 = Amostra 06; 15 = Amostra 15; 18 = Amostra 18; 19 = Amostra 19; 27 = Amostra 27; 28 = Amostra 28; 31 = Amostra 31; 32 = Amostra 32; 35 = Amostra 35; 37 = Amostra 37; 78 = Amostra 78; 95 = Amostra 95; 96 = Amostra 96. Elaborado pela autora, 2022.

Figura 31 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) utilizando os iniciadores BsRDsF e BhRDr9R para amplificação do gene SSU rDNA de 600 pb de *Blastocystis* sp. utilizando glicerol e temperatura de anelamento 60°C





Legenda: LAD = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C+ = Amostra três cruzes de positividade; 39 = Amostra 39; 51 = Amostra 51; 60 = Amostra 60; 63 = Amostra 63; 66 = Amostra 66; 79 = Amostra 79; 81 = Amostra 81; 84 = Amostra 84; 89 = Amostra 89; 91 = Amostra 91; 92 = Amostra 92; AM1 = Amostra recoleta; AM5 = Amostra recoleta; AM9 = Amostra recoleta; AM10 = Amostra recoleta; AM11 = Amostra recoleta; AM14 = Amostra recoleta. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

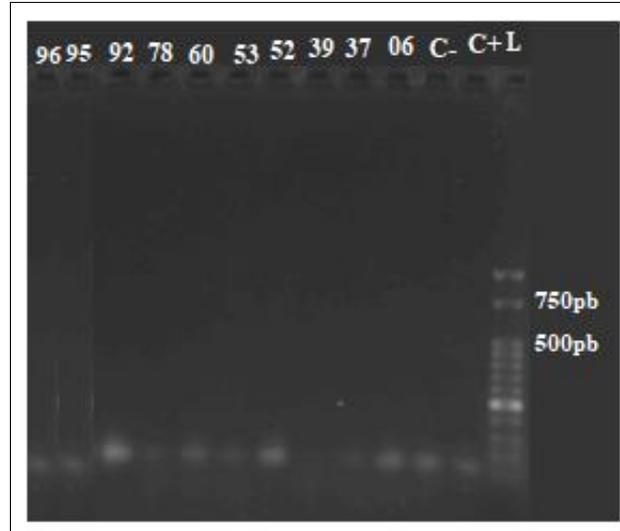
5.3.2 PCR com DNA extraído pelo kit Qiagen

Seguiu-se os mesmos passos das reações de PCR descritos anteriormente para comparação de resultados.

5.3.2.1 Primeira PCR

O protocolo utilizado foi o da Tabela 8 e condições térmicas de ciclagem foram os mesmos descritos na Tabela 10. Como pode ser observado na Figura 32, não houve amplificação do fragmento de tamanho esperado, assim como aconteceu na primeira PCR do kit Promega, o que demonstra que a especificação e aparecimento de banda ocorre mais na segunda reação de PCR (nPCR).

Figura 32 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da primeira PCR com os iniciadores RD3 e RD5 do protocolo otimizado com glicerol e temperatura de anelamento de 60°C em amostras de DNA positivas para *Blastocystis* sp.



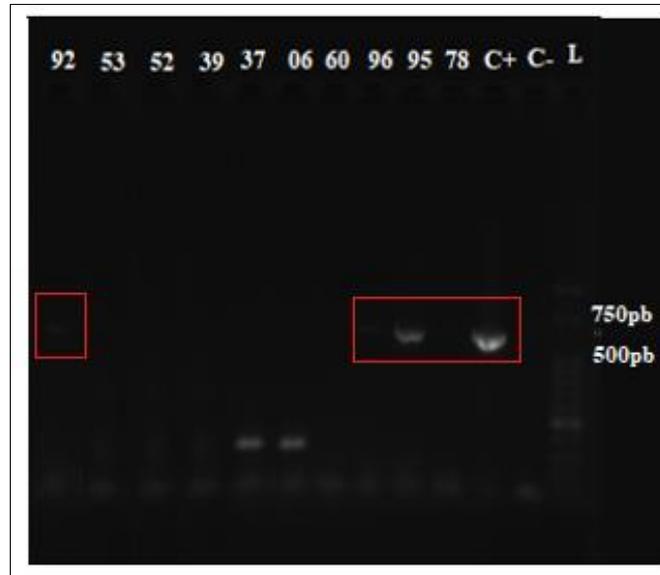
Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C+ = Amostra três cruces de positividade; C- = água ultrapura; 06 = Amostra 06; 37 = Amostra 37; 39 = Amostra 39; 52 = Amostra 52; 53 = Amostra 53; 60 = Amostra 60; 78 = Amostra 78; 92 = Amostra 92; 95 = Amostra 95; 96 = Amostra 96. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

5.3.2.2 Nested PCR

As condições da PCR foram as mesmas da Tabela 8, seguindo as mesmas condições térmicas de ciclagem descritos na Tabela 11. Entretanto, os resultados para as amostras negativas foram os mesmos obtidos com a extração anterior.

Além disso, é interessante analisar que as amostras 92, 95 e 96 também obtiveram bandas com o tamanho de aproximadamente 600 pb como esperado, mesmo estando um pouco mais fracas, se comparadas com o kit Promega; entretanto, confirma o resultado do kit de extração anterior (Figura 33).

Figura 33 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) utilizando os iniciadores BsRDsF e BhRDr9R do protocolo otimizado com glicerol e temperatura de 60°C para amplificação do fragmento de 600 pb de *Blastocystis* sp.



Legenda: L = Ladder/padrão molecular 50 pb; C- = água ultrapura; C+ = Amostra com três cruzes de positividade; 78 = Amostra 78; 95 = Amostra 95; 96 = Amostra 96; 60 = Amostra 60; 06 = Amostra 06; 37 = Amostra 37; 39 = Amostra 39; 52 = Amostra 52; 53 = Amostra 53; 92 = Amostra 92. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

5.4 NESTED PCR PARA *Giardia lamblia*

Após a extração, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20°C até a realização da reação da PCR. Foi utilizado o mesmo protocolo de reação para ambas as reações de PCR, mudando apenas o par de oligonucleotídeos.

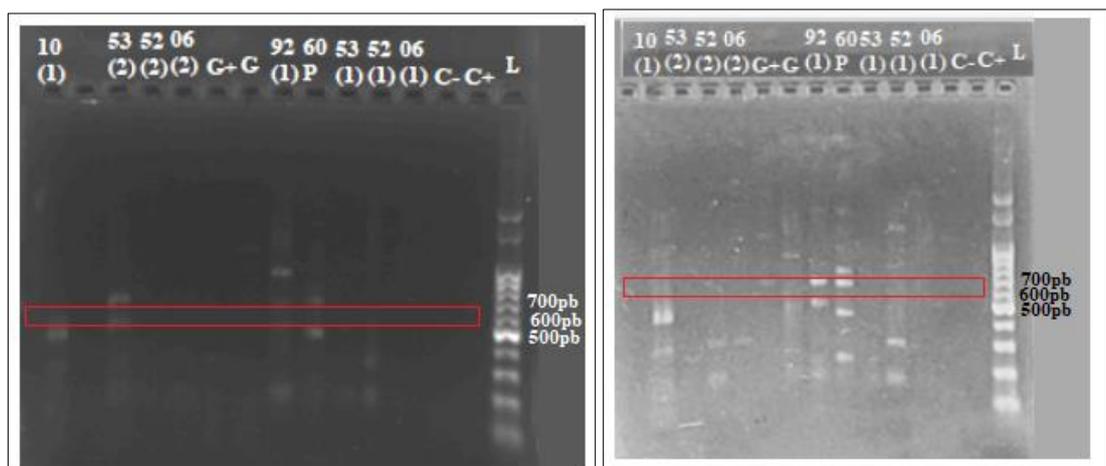
5.4.1 PCR com DNA extraído pelo kit Promega

5.4.1.1 Primeira PCR

5.4.1.1.1 Temperaturas de anelamento

O protocolo utilizado foi adaptado da *nested* PCR descrita por Sulaiman *et al.*, (2003), e de Geurden *et al.*, (2009), sem a adição de glicerol. As temperaturas de ciclagem foram descritas na Tabela 12. A Figura 34 mostra a foto do gel de agarose com os produtos de amplificação (*amplicons*) que apresentaram fragmentos inespecíficos e pouco marcados no tamanho de 605 pb esperado.

Figura 34 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores AL3543 e AL3546 do protocolo otimizado sem glicerol com DNA das amostras positivas para *G. lamblia* a uma temperatura de anelamento de 50°C

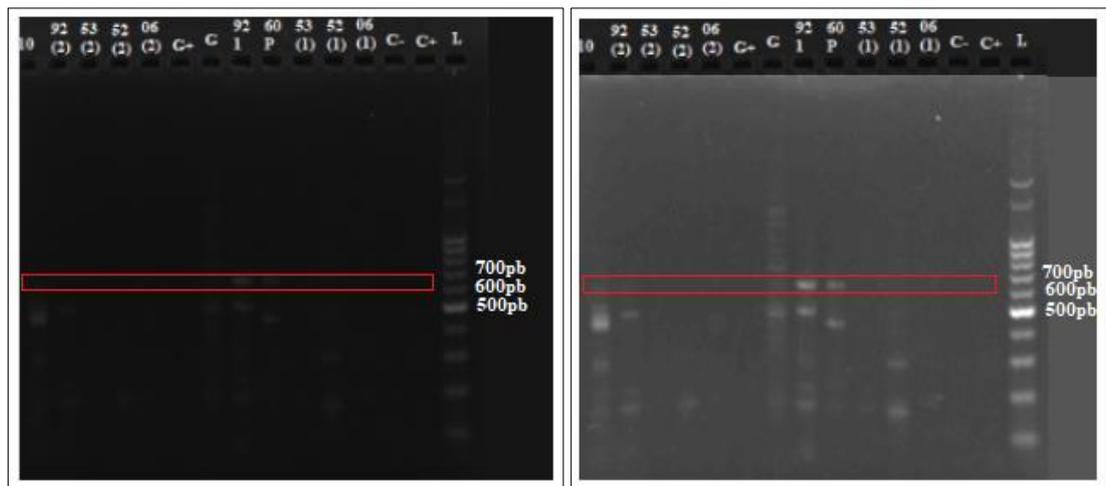


Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 100 pb; C+ = Amostra positivada HU; C- = água ultrapura; 06(1) = Amostra 06; 52(1) = Amostra 52; 53(1) = Amostra 53; 60P = Amostra 60; 92(1) = Amostra 92; G = Amostra positiva do Laboratório de Parasitologia Clínica; G+ = Amostra positiva do Laboratório de Parasitologia Clínica; 06(2) = Amostra 6, 2ª eluição; 52(2) = Amostra 52, 2ª eluição; 53(2) = Amostra 53, 2ª eluição; 10(1) = Amostra recoleta. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Para melhoramento do gel foi realizado o teste do protocolo com a adição de glicerol como descrito na Tabela 9. A Figura 35 mostra o gel de eletroforese com os *amplicons* e reação de PCR com temperatura de anelamento de 50°C, que apesar de apresentar bandas um pouco

mais marcadas, inclusive bandas no tamanho de 605 pb que é o esperado (amostras 60 e 92), ainda possuem a presença de muitos fragmentos inespecíficos.

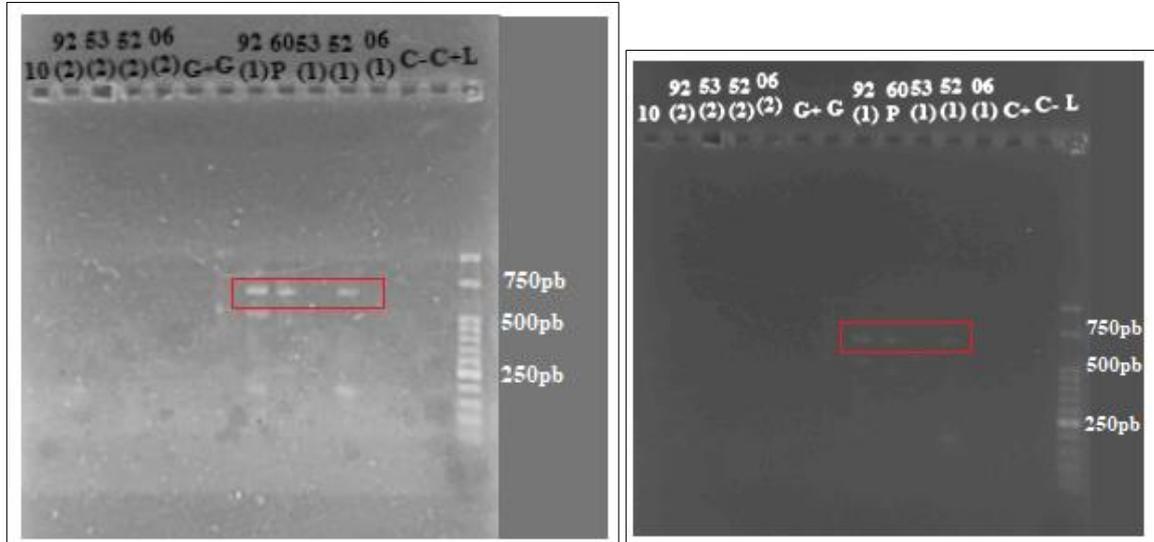
Figura 35 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores AL3543 e AL3546 do protocolo otimizado com glicerol com DNA das amostras positivas para *G. lamblia* a uma temperatura de anelamento de 50°C



Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 100 pb; C+ = Amostra positiva HU; C- = água ultrapura; 06(1) = Amostra 06; 52(1) = Amostra 52; 53(1) = Amostra 53; 60P = Amostra 60; 92(1) = Amostra 92; G = Amostra positiva do Laboratório de Parasitologia Clínica; G+ = Amostra positiva do Laboratório de Parasitologia Clínica; 06(2) = Amostra 6, 2ª eluição; 52(2) = Amostra 52, 2ª eluição; 53(2) = Amostra 53, 2ª eluição; 10(1) = Amostra recoleta. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Ainda, foi testada a temperatura de anelamento de 53°C, evidenciado na Figura 36 que demonstra os *amplicons*, com diminuição expressiva de fragmentos inespecíficos.

Figura 36 – Gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores AL3543 e AL3546 do protocolo otimizado com glicerol das amostras positivas para *G. lamblia* a uma temperatura de anelamento de 53°C



Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C+ = Amostra positiva HU; C- = água ultrapura; 06(1) = Amostra 06; 52(1) = Amostra 52; 53(1) = Amostra 53; 60P = Amostra 60; 92(1) = Amostra 92; G = Amostra do Laboratório de Parasitologia Clínica; G+ = Amostra positiva do Laboratório de Parasitologia Clínica; 06(2) = Amostra 6, 2º eluição; 52(2) = Amostra 52, 2º eluição; 53(2) = Amostra 53, 2º eluição; 10(1) = Amostra recoleta.

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

5.4.1.1.2 Avaliação de diferentes quantidades de DNA para otimização da PCR

Também foram avaliados os volumes descritos na Tabela 14, utilizando a temperatura de anelamento escolhida de 53°C e condições de ciclagem descritas na Tabela 12. Não houve amplificação dos produtos esperados quando testados os diferentes volumes; por isso, a quantidade de DNA selecionada para as reações foi de 1 µL (Figura 37).

Figura 37 – Fotografias do gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores AL3543 e AL3546 do protocolo otimizado com glicerol a temperatura de 53°C de anelamento, testando volumes de 3 µL e 6 µL de DNA das amostras positivas para *G. lamblia*



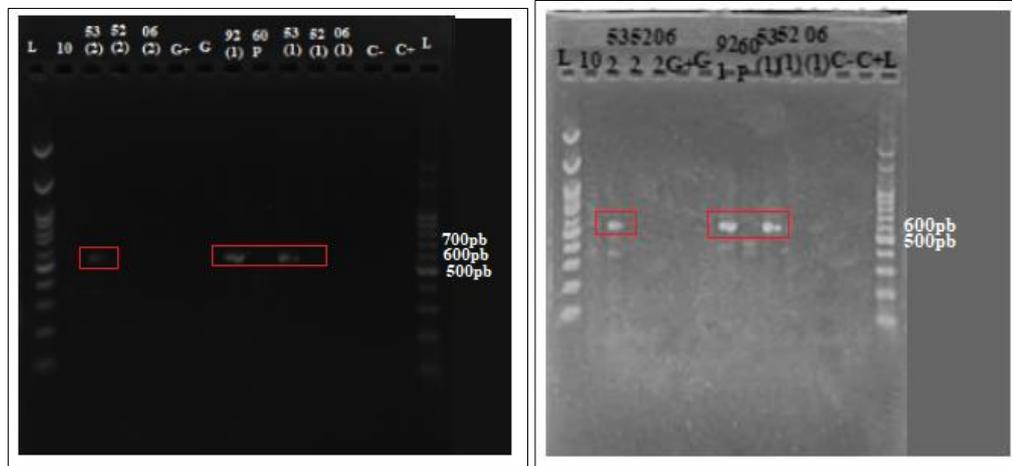
Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C+ = Amostra positiva 3 µL; C- = água ultrapura 3 µL; 06(1) = Amostra 06, 3 µL; 52(1)= Amostra 52, 3 µL; 53(1) = Amostra 53, 3 µL; 60P = Amostra 60, 3 µL; 92(1) = Amostra 92, 3 µL; G = Amostra positiva Laboratório de Parasitologia Clínica, 3 µL; G+ = Amostra positiva do Laboratório de Parasitologia Clínica, 6 µL; 06(2) = Amostra 6, 6 µL; 52(2) = Amostra 52, 6 µL; 53(2) = Amostra 53, 6 µL; 92(2) = Amostra 92, 6 µL; 10 = Amostra 10, 3 µL. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

5.4.1.2 Nested PCR

O protocolo testado foi descrito anteriormente com o segundo par de oligonucleotídeos (Tabela 9); sendo realizado testes de temperaturas para melhoramento do gel, conforme Tabela 13. Primeiramente foi testado sem a adição de glicerol e utilizando temperatura de anelamento de 50°C. Como observado na Figura 38 embora possa ser observado alguns fragmentos do tamanho de 530 pb para algumas das amostras avaliadas, fragmentos inespecíficos continuaram presentes; sendo assim a temperatura de anelamento de 57°C foi avaliada.

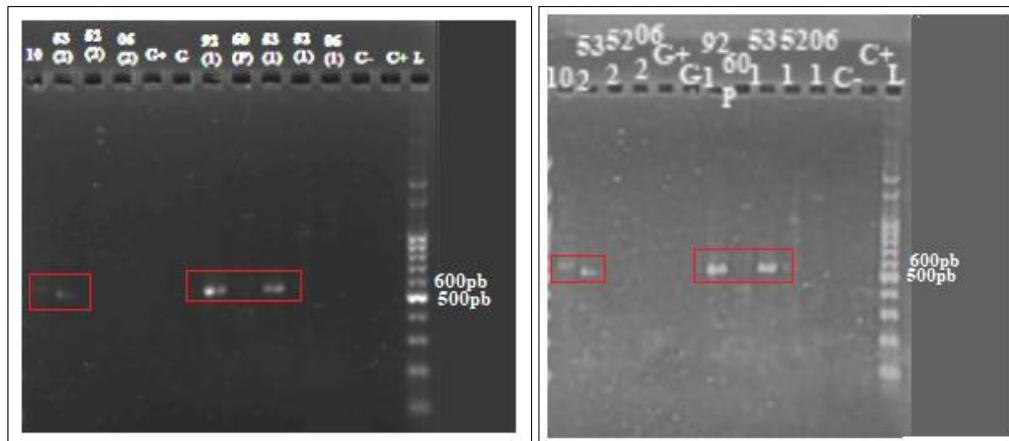
A Figura 39 demonstra o gel de agarose com amostras testadas com temperatura de anelamento de 57°C e sem glicerol (Tabela 13). Observou-se a amplificação dos fragmentos de 530 pb para algumas amostras; entretanto para o melhoramento, foi testado algumas temperaturas com adição de glicerol.

Figura 38 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR para amplificação do gene TPI de 530 pb de *G. lamblia* sem glicerol e temperatura de anelamento de 50°C



Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C+ = Amostra positiva HU; C- = água ultrapura; 06(1) = Amostra 06; 52(1) = Amostra 52; 53(1) = Amostra 53; 60P = Amostra 60; 92(1) = Amostra 92; G = Amostra positiva do Laboratório de Parasitologia Clínica; G+ = Amostra positiva do Laboratório de Parasitologia Clínica; 06(2) = Amostra 6, 2ª eluição; 52 (2) = Amostra 52, 2ª eluição; 53 (2) = Amostra 53, 2ª eluição; 10 (1) = Amostra recoleta. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Figura 39 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) para amplificação do gene TPI de 530 pb de *G. lamblia* sem glicerol e temperatura de anelamento de 57°C



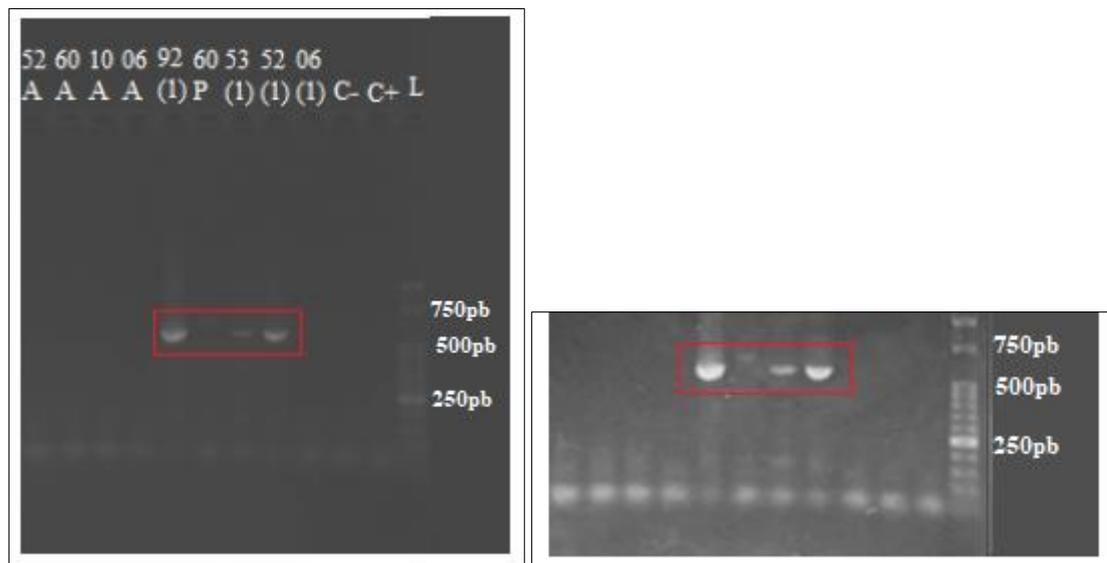
Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 100 pb; C+ = Amostra positiva HU; C- = água ultrapura; 06(1) = Amostra 06; 52(1) = Amostra 52; 53(1) = Amostra 53; 60P = Amostra 60; 92(1) = Amostra 92; G = Amostra

positiva da Parasitologia Clínica; G+ = Amostra positiva do Laboratório de Parasitologia Clínica; 06(2) = Amostra 6, 2ºeluição; 52(2) = Amostra 52, 2ºeluição; 53(2) = Amostra 53, 2ºeluição; 10 = Amostra recoleta.

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Conforme descrito na Tabela 9, com condições de temperatura da Tabela 13, a primeira temperatura de anelamento testada de 55°C, permitiu melhor resultado que o protocolo sem a adição de glicerol. Assim, pela Figura 40 é demonstrado os produtos das ampliações da segunda PCR, com fragmentos fortemente marcados no tamanho esperado de 530 pb, e sem muitos fragmentos inespecíficos.

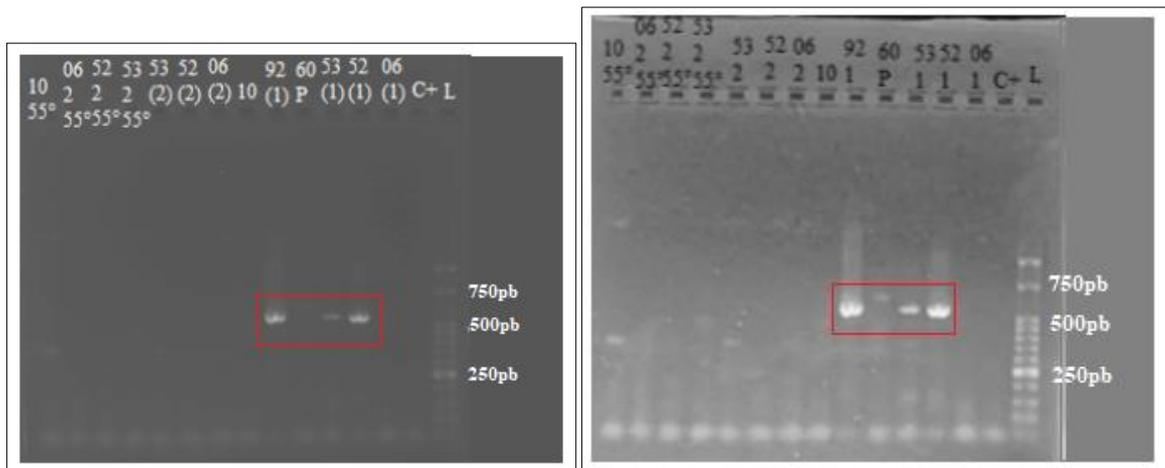
Figura 40 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) para amplificação do gene TPI de 530 pb de *G. lamblia* com glicerol e temperatura de anelamento de 55°C



Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C+ = Amostra positiva HU; C- = água ultrapura; 06(1) = Amostra 06; 52(1) = Amostra 52; 53(1) = Amostra 53; 60P = Amostra 60; 92(1) = Amostra 92; 06(A) = Amostra 6, 2ºeluição; 10(A) = Amostra recoleta, 2ºeluição; 60(A) = Amostra 60, 2ºeluição; 52(A) = Amostra 52, 2ºeluição. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

A segunda temperatura de anelamento testada foi a 57°C, demonstrado pela Figura 41, observou-se fragmentos de 530 pb, entretanto também foi possível observar a presença de bandas inespecíficas e o arraste bem mais evidenciado do que na condição de 55°C.

Figura 41 – Gel de agarose com resultados obtidos após a realização da segunda PCR (nPCR) para amplificação do gene TPI de 530 pb de *G. lamblia* com glicerol e temperatura de anelamento de 57°C



Legenda: L = Ladder/padrão molecular de 50 pb; C+ = Amostra positiva HU; 06(1)= Amostra 6; 52(1)= Amostra 52; 53(1) = Amostra 53; 60P = Amostra 60; 92(1) = Amostra 92; 10 = Amostra recoleta; G = Amostra positiva LPC; G+ = Amostra positiva LPC; 06(2) = Amostra 6, 2ªeluição; 52(2) = Amostra 52, 2ªeluição; 53(2) = Amostra 53, 2ªeluição; 53(2 55°) = Amostra 53, 2ªeluição a 55°C de anelamento; 52(2 55°) = Amostra 52, 2ªeluição a 55°C de anelamento; 06(2 55°C) = Amostra 6, 2ªeluição a 55°C de anelamento; 10(55°) = Amostra recoleta a 55°C. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

A partir da análise da reação de PCR escolhida com glicerol e temperatura de anelamento de 55°C, pode-se observar as bandas de 4 amostras de um total de 5 amostras positivas para *G. lamblia*. A amostra que não foi amplificada foi submetida ao segundo kit de extração para comparação de resultados.

5.4.2 PCR com DNA extraído pelo kit Qiagen

As amostras não amplificadas no primeiro kit de extração foram submetidas ao protocolo de extração do kit Qiagen, seguindo-se os mesmos passos das reações de PCR para comparação de resultados.

5.4.2.1 *Nested* PCR

O protocolo utilizado foi o descrito na Tabela 8, com temperatura de anelamento de 53°C na primeira PCR, seguindo as condições de ciclagem da Tabela 12. E o segundo protocolo para a segunda PCR, utilizando o segundo par de oligonucleotídeos, foi o descrito na Tabela 8 com 55°C de temperatura de anelamento (Tabela 13). Além disso, a amostra 6 submetida ao protocolo foi aquela acondicionada com Álcool absoluto e também com PBS. Entretanto, não houve produto de amplificação após as condições avaliadas, tanto na primeira quanto na segunda reação.

5.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Após o processo de purificação, foi realizado a quantificação, utilizando o aparelho NanoVue PLUS (GE Healthcare, EUA). A taxa de quantificação para as amostras de *Blastocystis* sp., variou de 139 – 35 ng/ µL (Tabela 21); já para as amostras de *G. lamblia* variou de 112 – 19 ng/ µL (Tabela 22).

Tabela 21 – Quantificação de DNA de *Blastocystis* sp. por espectrofotômetro após purificação

Kit comercial	Amostra	Concentração
Mebep Bioscience	1	56 ng/UI
Mebep Bioscience	4	63 ng/UI
Mebep Bioscience	15	60,5 ng/UI
Mebep Bioscience	18	66,5 ng/UI
Mebep Bioscience	19	66 ng/UI

Kit comercial	Amostra	Concentração
Mebep Bioscience	27	50 ng/UI
Mebep Bioscience	28	80 ng/UI
Mebep Bioscience	31	70 ng/UI
Mebep Bioscience	32	72,5 ng/UI
Mebep Bioscience	35	75,5 ng/UI
Mebep Bioscience	51	54,5 ng/UI
Mebep Bioscience	63	83 ng/UI
Mebep Bioscience	66	56 ng/UI
Mebep Bioscience	79	91 ng/UI
Mebep Bioscience	81	69 ng/UI
Mebep Bioscience	84	75,5 ng/UI
Mebep Bioscience	89	81 ng/UI
Mebep Bioscience	91	62,5 ng/UI
Mebep Bioscience	92	61 ng/UI
Mebep Bioscience	95	43 ng/UI
Mebep Bioscience	96	42,5 ng/UI
Mebep Bioscience	AM1	35 ng/UI
Mebep Bioscience	AM5	64,5 ng/UI
Mebep Bioscience	AM9	91,5 ng/UI
Mebep Bioscience	AM10	74 ng/UI
Mebep Bioscience	AM11	75,5 ng/UI
Mebep Bioscience	AM14	114,5 ng/UI
Mebep Bioscience	AM16	139 ng/UI

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 22 – Quantificação de DNA de *G. lamblia* por espectrofotômetro após purificação

Kit comercial	Amostra	Concentração
Mebep Bioscience	52	50 ng/UI
Mebep Bioscience	53	32,5 ng/UI
Mebep Bioscience	60	19 ng/UI
Mebep Bioscience	92	112 ng/UI

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Após o processo de purificação, as amostras foram armazenadas a -20°C até o envio para sequenciamento.

6 DISCUSSÃO

A prevalência das endoparasitoses é afetada por muitas razões relacionadas ao parasito como a presença de subtipos mais virulentos e altas cargas parasitárias; fatores ambientais como a localização geográfica e condições climáticas; e a fatores relacionados ao hospedeiro como a condição imunológica, idade, dieta, hábitos de higiene e condições sanitárias (LEUNG *et al*, 2019). Através do Painel de Saneamento do Brasil, observa-se 49,2% de índice de esgoto não tratado referido a água consumida pelos habitantes, 45% é a parcela da população sem coleta de esgoto, 15,9% é a parcela da população sem acesso à água tratada; totalizando em 167.513 internações totais por doenças de veiculação hídrica e 1.898 óbitos (SANEAMENTO BRASIL, 2020).

A capital catarinense, a cidade de Florianópolis possui um índice de 61,1% de esgoto não tratado referido a água consumida pelos habitantes, estando acima da média nacional; 59% é a parcela da população sem coleta de esgoto; 4,1% parcela da população sem acesso à água; totalizando em 399 internações totais por doenças de veiculação hídrica (0,24% da taxa nacional) e 8 óbitos. (SANEAMENTO BRASIL, 2020). A comunidade alvo de estudo encontra-se mais perto da UFSC e frequentemente é alvo de pesquisas; é observado a precariedade em saneamento básico, já evidenciado anteriormente (ASSUNÇÃO, 2012). A Casa São José (CSJ) funciona desde 2003 atuando no âmbito da Assistência Social, voltado para crianças de 6 a 15 anos, realizando aulas, apoio pedagógico, esporte e lazer. Já a Creche São Francisco de Assis (CSFA) foi inaugurada em 1981, e desde então obtiveram mudanças para aumentar a capacidade de atendimento, atendendo nos dias atuais 115 crianças (CARBONERA, 2019).

As crianças com idades pré-escolares e escolares são um grupo de risco, que participam de ambientes e situações do cotidiano ao qual facilitam a infecção pelo parasito (creches, comportamento e higiene relacionados a idade) (ALEMU *et al*, 2019; LEUNG *et al*, 2019). Os efeitos dessas endoparasitoses em crianças não se concentram apenas na mortalidade ou na

morbidade, mas também em outros as quais são responsáveis, como distúrbios alimentares e nutricionais, carência de vitaminas, deficiência de ferro, anemia, perda de peso, perda de sangue crônica, retardo no crescimento físico. Ainda afetando o desenvolvimento mental, crescimento cognitivo, diminuição da frequência escolar, diminuição da produtividade e consequente atraso na inserção dessas crianças na sociedade a qual participa (DAPB, 1994; UNICEF, 2012; DONOWITZ *et al*, 2016).

A vigilância sanitária, através da Portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2011, estabelece o monitoramento de cistos de *Giardia* nos principais pontos de captação de água (BRASIL, 2011). Entretanto, o monitoramento e gerenciamento do risco potencial de transmissão de enteroparasitas em fontes de contaminação, em principal correlacionado com grupo de risco, precisam ser mais estudados (WHO, 2022). A análise molecular é sensível e dribla os resultados falsos negativos da análise microscópica, entretanto é um estudo complementar e mais utilizado para estudos de epidemiologia molecular (HARVEY *et al*, 2020). Uma recente revisão sistemática de identificação molecular de *Giardia* spp. na América Latina, analisou dados de 2017 a 2021, e o Brasil é o segundo país com mais estudos publicados sobre o tema, perdendo apenas para a Colômbia, demonstrando o grande interesse envolvido no assunto (GUZMAN *et al*, 2021).

Os protocolos selecionados para a realização da PCR, foram os de *nested* PCR para ambos os parasitos. Essa variação de PCR aumenta a sensibilidade e especificidade e é muito utilizada em casos em que é necessário amplificar genes polimórficos ou amplificar uma cópia de cDNA ou mRNA pouco presente em uma amostra clínica. A *nested* PCR envolve duas reações de amplificação de forma sequencial, cada uma com um par diferente de oligonucleotídeos iniciadores; sendo que o produto da primeira reação de amplificação vai servir de molde para a segunda reação (GREEN *et al.*, 2019). Essa técnica mais sensível é também mais trabalhosa, tanto no processamento quanto ao tempo necessário para realização.

No presente estudo, foram selecionadas 33 amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp. e 5 amostras positivas para *G. lamblia* obtidas a partir do estudo de Nunes (2022), com a finalidade de otimizar as condições para o diagnóstico molecular desses protozoários. No presente estudo, as amostras foram submetidas a extração de DNA e *nested* PCR. Três amostras negativas para *Blastocystis* sp. (3/35) por microscopia, porém positivas para *G. lamblia*, foram testados PCR para *B. hominis* e uma delas foi positiva. Correa e colaboradores (2020) traz uma

discussão interessante quando afirma que em análise microscópica de 105 amostras, apenas 7,6% foram positivas para *G. lamblia*, deixando *B. hominis* em primeiro lugar com 15,2% de prevalência; em um segundo momento, após análise molecular a taxa de incidência de *G. lamblia* sobe para 55% (CORREA *et al*, 2020).

Em relação a amplificação das amostras, para as amostras positivas de *G. lamblia* por microscopia (5), um total de 80% (4/5) foram positivas para a *nested* PCR padronizada; para as amostras positivas de *Blastocystis* sp. (33) por microscopia, um total de 84,8% (28/33) foram positivas por *nested* PCR. Esses resultados se assemelham aos encontrados na literatura, muitos estudos demonstram que as taxas de prevalência podem ser menores do que o observado em microscopia, como em Barbosa *et al* (2008) que demonstram que das 164 amostras positivas para *Blastocystis* sp., 51,8% foi amplificado. Segui e colaboradores (2018), também mostram taxas parecidas: de 216 amostras positivas para *Blastocystis* sp., 80,3% foram positivas por PCR, e 69,4% foi sequenciado com sucesso; para as 84 amostras positivas para *G. lamblia*, 85,7% foram positivas para PCR. Pacheco *et al* (2020) relata que das 110 amostras positivas por microscopia para *G. lamblia*, 72,7% foram positivas por PCR com sucesso para pelo menos um ou dois alvos.

Na rotina laboratorial, as amostras fecais são armazenadas em SAF, que por ficarem em contato com a solução conservante, acabam sendo modificadas, diminuindo a qualidade do DNA; em principal por mudança de pH, reticulação do ácido nucleico e diminuição da acessibilidade da Taq DNA Polimerase (GILBERT *et al.*, 2007). Entretanto, vale salientar que a preservação da amostra com SAF não leva a inteira degradação do DNA, e existem alguns estudos na literatura que procuram a otimização da extração do DNA preservado em formol (LEE *et al.*, 2019). Nesse estudo as amostras utilizadas para a extração de DNA foram aquelas coletadas sem solução conservante, tanto as que foram acondicionadas com PBS, quanto as que foram armazenadas com Álcool absoluto.

A extração de DNA de uma amostra fecal é uma etapa limitante para a reação de PCR, estando relacionada de forma proporcional a sensibilidade da técnica. A presença de constituintes das fezes como componentes metabólicos, grupamento heme, e ácidos biliares; podem interferir ou inibir a atividade da enzima DNA polimerase; além disso, a presença de contaminantes podem diluir o DNA alvo em meio a outros materiais genéticos do hospedeiro e de outros microrganismos, sendo um material de análise bastante complexo (DA SILVA *et al.*, 1999;

HAWASH, 2014; TERMMATHURAPOJ *et al.*, 2004; JAVANMARD *et al.*, 2018). Por isso recomenda-se trabalhar com a amostra de uma forma que durante o processo, procure evitar ou retardar o progresso das possíveis inibições, como a realização da extração de DNA da amostra fecal de forma imediata ao recebimento da amostra (JAVANMARD *et al.*, 2018). Algumas amostras obtiveram seus resultados divergentes a microscopia, justamente pela demora na realização do protocolo de extração.

Os kits comerciais de extração de DNA que foram utilizados não são específicos para amostra fecal, e foram aqueles disponibilizados pelo laboratório. Esses kits de extração comerciais são muito utilizados em diversos laboratórios pela sua facilidade, estabilidade e resultados reprodutíveis, além de otimizar o tempo, agilizando o processo que antecede a PCR (GREEN, 2012). Em relação as quantificações pelo kit de extração Promega, ao avaliar a relação entre as absorbâncias 260 nm/280 nm, é possível observar que o valor abaixo de 1,7 que indica contaminação de proteínas foi evidenciado em 33,33% (11) amostras no total das amostras positivadas para *Blastocystis* sp. e 20% (1) de *G. lamblia*. Já para a relação das absorbâncias 260 nm/230 nm foi observado todas as amostras fora da faixa esperada indicando contaminação por outros compostos como EDTA, fenol e carboidratos (OLIVEIRA *et al.*, 2007). O kit de extração Qiagen obteve também resultados que indicam contaminação por compostos como EDTA, fenol e carboidratos, entretanto não foram evidenciados indicadores de contaminação de proteínas para nenhuma amostra analisada (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A semi-quantificação também demonstrou um fator limitante. Nem todas as amostras foram contadas no mesmo dia, o que demonstrou um forte interferente, tendo em vista que essas amostras contadas posteriormente não apresentaram as formas características dos parasitos, e algumas nem sequer foram visualizadas novamente, não sendo contabilizadas. Demonstrando que a semi-quantificação deve ser concluída o mais breve possível, para evitar degradação das formas evolutivas presentes na amostra. Em relação as amostras que obtiveram resultados: amostras com três e duas cruzes obtiveram produtos de amplificação intensas no gel de agarose; com exceção da amostra 6 que não foi amplificada.

Ainda, para as amostras positivas para *Blastocystis* sp., o resultado das extrações de DNA, obtiveram resultados de 77,5 ng/UL a 6,5 ng/UL com o kit Promega, e as amostras que não foram amplificadas tinham quantidades de 35,5 ng/ UL e 4,2 ng/ UL. Para o kit Qiagen, as

amostras que foram negativas por nested PCR tinham quantidades de DNA de 74,5 ng/ UI a 8,2 ng/ UI.

Já para as amostras de *G. lamblia*, os resultados da quantificação de DNA a partir do kit Promega, foram de 52 ng/ UI a 92 ng/ UI, e obtiveram fragmentos intensos e específicos; exceto a amostra 6 que não amplificou, e que continha 45 ng/ UI de DNA. Para o kit Qiagen a amostra 6 obteve 74,5 ng/ UI de DNA e não amplificou. Vale salientar que após extração pelo kit Qiagen, nenhuma amostra positiva para *G. lamblia* foi observada, provavelmente pela degradação do DNA, tendo em vista que foi realizado muito depois do recebimento das amostras.

Muitos estudos demonstram que algumas amplificações não acontecem, como o estudo de Correa e colaboradores (2020), em que amplificaram apenas 4 das 58 amostras positivas para *G. lamblia* com o gene TPI; entretanto obteve-se amplificação em 48 das 58 amostras com o gene GDH. Estudos mais recentes relatam divergências entre as sequências genômicas e oligonucleotídeos iniciadores usadas na PCR, o que pode resultar na baixa amplificação. Por isso a importância da utilização de pelo menos dois marcadores para comparação entre os grupos e conjunto genético, devido a ocorrência significativa de infecções com associação entre assembleias (FENG and XIAO, 2011; RYAN *et al*, 2021).

Vários motivos podem culminar em uma PCR negativa como a presença de inibidores fecais da DNA polimerase, como: bilirrubina, sais biliares, hemoglobina, compostos fenólicos; e complexos polissacarídeos que podem aparecer após a extração de DNA. Esses inibidores variam de acordo com características específicas de cada indivíduo, como alimentação. O tempo de realização dos procedimentos é um fator limitante, tendo em vista o tipo de amostra trabalhada, muitos estudos demonstram a utilização de amostras fecais com conservantes, ou ainda um pré tratamento de amostra antecedendo a extração do DNA; todas essas otimizações seriam válidas de teste. Outro fator importante é a utilização de kits específicos para cada amostra, visto que os fabricantes utilizam meios e tampões específicos para facilitar o processo de PCR, o que relacionando com os resultados obtidos nesse estudo poderia servir de comparação futura. E por fim a análise de apenas uma amostragem é um outro ponto limitante, tendo em vista que o parasito pode estar ausente e o ideal seria a obtenção de ao menos três amostras para análise alimentação (WILKE *et al*, 2009; KUK *et al*, 2012; JAVANMARD *et al.*, 2018).

Quanto a consistência da amostra fecal, apenas uma delas foi pastosa 2,9% (1/35), um caso positivo para triparasitismo com coinfeção de *Blastocystis* sp., *E coli*, *E histolytica/E dispar*; com resultado de semi quantificação de uma cruz para *Blastocystis* sp. Entretanto, essa criança não obteve sintomas clínicos. Ainda, essa criança participou da coleta, após tratamento antiparasitário, e mesmo assim obteve resultado positivo para *Blastocystis* sp. O que pode evidenciar uma reinfecção, ou ainda resistência frente ao medicamento. O estudo de Nigro et al (2003) relata cura de 88% dos pacientes com Metronidazol e eliminação do parasita em 80% dos casos, mas os outros que obtiveram resultados positivos, demonstram uma possível infecção por diferentes subtipos ou ainda mais resistentes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo, foi possível identificar pontos cruciais para amplificação das amostras, pois muito embora não tenha sido utilizado kits de extração específicos para amostras fecais, foi possível obter boas extrações e amplificações; entretanto a extração de DNA deve ser realizada assim que a amostra estiver disponível, para evitar a degradação do mesmo. Outro ponto crucial é a análise de mais de uma amostra da criança, tendo em vista que pode haver ausência do parasito em apenas uma amostragem; além disso, fica evidente a necessidade de realização do método molecular mesmo em amostras negativas para análise microscópica.

Ainda, foi realizada a otimização intralaboratorial da *nested* PCR para os dois parasitos em questão, a partir de amostras fecais. Devido ao tempo reduzido, não foi possível realizar a etapa do sequenciamento, o que impacta diretamente as possíveis correlações almejadas, deixando as amostras purificadas para sequenciamento futuro.

O estudo demonstrou a taxa de prevalência de enteroparasitos a partir de análise microscópica e a partir disso, ao selecionar as amostras positivas para o estudo molecular, demonstrou prevalências que complementam a análise geral.

Por fim, este estudo foi o início de uma investigação genômica futura, que poderá contribuir para o conhecimento dos subtipos e assembleias de *Blastocystis* sp. e *G. lamblia* presentes na região, visando o entendimento da distribuição e conseqüentemente fornecendo

informações sobre o impacto relacionado a frequência da presença dos protozoários e possíveis correlações entre fonte de contaminação, sintomatologia, zoonoses, periodicidade e rastreabilidade, dessa forma auxiliando no entendimento epidemiológico.

REFERÊNCIAS

- ADAMSKA, M. First report of *Blastocystis* sp. subtypes in natural water bodies in north-western Poland: a one-year monitoring, *Environmental Health Research*, (2020).
- AGUIAR, M. A., FACHINI, D. Prevalência de enteroparasitoses em escolares da comunidade da Serrinha, Florianópolis, SC. Florianópolis [Monografia de conclusão da Disciplina de Estágio Supervisionado em Análises Clínicas ACL/UFSC], 2010.
- ALBERTON, F. A.; DALLAMICO, F. S.; CANONICA, R. L. Promovendo saúde: prevalência de parasitoses e ações educativas para a sua prevenção em crianças do bairro Itacorubi, Florianópolis-SC. Monografia (Conclusão da Disciplina de Estágio Supervisionado em Análises Clínicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Análises Clínicas, Florianópolis. 34f. (2007).
- ALEXEIEFF, A. Sur la nature des formations dites “kystes de *Trichomonas intestinalis*.” *C R Soc Biol.* v. 71, p. 296–298, (1911).
- ALI, S. A., HILL, D. R. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis.* v.16(5); p.453-60; (2003).
- AL-MEKHLAFI, HM., AL-MAKTARI, MT., JANI, R., AHMED, A., ANUAR, TS., et al. Burden of *Giardia duodenalis* Infection and Its Adverse Effects on Growth of Schoolchildren in Rural Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis* 7(10): e2516; (2013).
- ALZATE, J. F.; TORO-LONDONO, M.; CABARCAS, F.; GARCIA-MONTOYA, G.; GALVAN-DIAZ, A. Contrasting microbiota profiles observed in children carrying either *Blastocystis* spp. or the commensal amoebas *Entamoeba coli* or *Endolimax nana*. *Sci. Rep.* v. 10, 15354 (2020).
- AMATO NETO, V.; LARCON, R. S. R. et al. Blastocistose: controvérsias e indefinições. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, n.4, p. 515-517, (2003).
- AMATO NETO, V. Parasitologia: uma abordagem clínica. Rio de Janeiro: Elsevier. (2008).
- AMBRUS, CHEN, DAI, BIALIS, JONES, YANG. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Research*, v.34, n. 9, p. 2723–2735, (2006).
- ANDRADE E. C.; LEITE, I. C. G.; RODRIGUES, V. O.; CESCO, M. G. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *APS, Juiz de Fora*, v. 13, n. 2, p. 231-240, (2010).
- ANDSSEL, V. E., ERICSSON, C. D. Prevention and empiric treatment of traveler’s diarrhea. *Med Clin North Am.* v.83; p.945-973; (1999).
- ANDREWS, R. H., M. ADAMS, P.F.L. BOREHAM, G. MAYRHOFER, B.P. MELONI. *Giardia intestinalis*: Electrophoretic evidence for a species complex. *International Journal for Parasitology* Volume 19, Issue 2, April, Pages 183-190 (1989).
- ANKARKLEV, J.; LEBBAD, M.; EINARSSON, E.; FRANZÉN, O.; AHOLA, H.; TROELL, K.; SVARD, S. G. A novel high-resolution multilocus sequence typing of *Giardia intestinalis* assemblage A isolates reveals zoonotic transmission, clonal outbreaks and recombination. *Infection, Genetics and Evolution*, v.60, p. 7-16 (2018).

ANVISA – Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. 2007. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/nitroimidazolicos5.htm. Acesso em 05 de novembro de 2022.

ARAUJO FILHO, H, B.; CARMO-RODRIGUES, M, S.; MELLO, C, S, MELLI LCFL.; TAHAN, S.; MORAIS, M, B. Parasitoses intestinais se associam a menores índices de peso e estatura em escolares de baixo estrato econômico. **Paul Pediatr**, v. 29, n. 4, p. 521-528 (2011).

A, S, ZANETTI.; MALHEIROS, A, F.; MATOS, A.; SANTOS, C.; BATTAGLINI, P, F.; MOREIRA, L, M.; LEMOS, L, M, S.; CASTRILLON, S, K, I.; CORTELA, D, C, B.; IGNOTTI, E.; ESPINOSA, O, A. Diversity, deographical distribution, and prevalence of *Entamoeba* spp. in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Parasite**, v. 28, n. 17, p. 21, 30 March (2021).

ARA-MONTOJO., M. F., BUSTAMANTE, J., SAINZ, T., PÉREZ, S., JIMENEZ-MORENO, B., RUIZ-CARRASCOSO, G., ... MELLADO-PEÑA, M. J. Intestinal giardiasis in children: Five years' experience in a reference unit. **Travel Medicine and Infectious Disease**, 42, 102082; (2021).

ASSUNÇÃO, A., C. A memória como reinvenção do vivido” - Um estudo de caso sobre memória coletiva e Representações sociais na comunidade Serrinha, Florianópolis (sc). 2012. **TCC (Graduação)** – Curso de Ciências Sociais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/99074>. Acesso em 26 de novembro de 2022.

BANSAL, D.; AVE, P.; KERNEIS, S., et al. Na ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **PLoS Negl. Trop. Dis**, v 3, p. 551, (2009).

BARBOSA, C, V.; BARRETO, M, M.; ANDRADE, R, J.; SODRE, F.; DAVILA-LEVY, C, M.; PERALTA, J, M.; IGREJA, R, P.; DE MACEDO, H, W.; SANTOS, H, L, C. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. **PLoS One**, v. 13, n. 3, (2018).

BARRY, M.; CAPPELLO, M.; CESTODES. In: BLASER, M, J.; SMITH, P, D.; RAVDIN, J, I.; GREENBERG, H, B.; GUERRANT, R, L, EDITORS. Infections of the gastrointestinal tract. **New York: Raven**, v. 75, p. 1156-66, (1995).

BART, A.; WENTINK-BONNEMA, E, M.; GIGLIS, H.; VERHAAR, N.; WASSENAAR, C, J.; VAN VUGT, M.; GOORHUIS, A.; VAN GOOL, T. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* spp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherland. **BMC Infect Dis**, v.13, p. 389, (2013).

BARTELT, L, A., SARTOR, R, B. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. **F1000 Prime Rep**. v.7; p. 62; (2015).

BATISTA, L. *et al.* Escasa eficacia de metronidazol en la erradicación de *Blastocystis hominis* en pacientes sintomáticos: serie de casos y revisión sistemática de la literatura. **Gastroenterol Hepatol**. 2017.

BAHRAMIL, F., BABAEI, E., BADIRZADEH, Alireza., RIABI, T, R., ABDOLI, A. *Blastocystis*, urticaria, and skin disorders: review of the current evidences. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. V. 39, p. 1027–1042 (2019).

- BEER, K. D., COLLIER, S. A., DU, F., GARGANO, J. W. Giardiasis diagnosis and treatment practices among commercially insured persons in the United States. **Clin Infect Dis.** v. 6; p. 64; (2017).
- BEGHINI, F., PASOLLI, E., TRUONG, T. D., PUTIGNANI, L., CACCIÒ, S. M., and SEGATA, N. Large-Scale comparative metagenomics of blastocystis, a common member of the human gut microbiome. **ISME J.** 11, 2848–2863, (2017).
- BELLOTO, M. V. T. et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil. **Revista Pan-amazônica de Saúde.** v. 2, n. 1, p.37-43, (2011).
- BERGER, P.; PAPA ZIAN, L.; DRANCOURT, M.; LA SCOLA, B.; AUFRAY, J. P.; RAOULT, D. Ameba associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. **Emerg Infect Dis,** v. 12, p. 248-255, (2006).
- BERNE, A.C. *et al.* A. Presença de coccídios e outros enteroparasitos em uma população de crianças no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical,** v. 41, n. 1, p. 93-96, (2012).
- BRANCO, N.; LEAL, D, A, G.; FRANCO, R, M, B. A parasitological survey of natural water springs and inhabitants of a tourist city in Southeastern Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis,** v, 12, n. 5, p. 410-417, (2012).
- BRASIL, **MINISTÉRIO DA SAÚDE.** Portaria nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispões sobre as normas de portabilidade de água para o consumo humano.
- BRAZIL SANITATION PANEL. **Institute Brazil. Sanitation and Health.** Florianópolis. Disponível em: <https://www.painelsaneamento.org.br/localidade?id=421>. Acesso em: 12 de junho de 2022.
- BRUMPT, E. Cólite à *Tetramitus mesnili* (Wenyon 1910) et cólite à *Trichomonas intestinalis* Leuchart 1879. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. **Bull Soc Pathol** 1912; Exot v. 5: p.725–730, (1912).
- BRYNILD SRUD, O., TYSNES, K.R., ROBERTSON, L.J., DEBENHAM, J.J. *Giardia duodenalis* in primates: Classification and host specificity based on phylogenetic analysis of sequence data. **Zoonoses Public Health** 65, 637–647 (2018).
- BURET, A, G. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalius*. *Parasite.* v.15(3); p. 261-5; (2008).
- CABADA, M. M. et al. Prevalence of intestinal helminths, anemia, and malnutrition in Paucartambo. Peru. **Revista Panamericana de Salud Pública.** v. 37, n. 2, p.69-75, (2015).
- CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology,** v. 21, n. 9, p.430-437, (2005).
- CACCIO, S, M. & RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology,* v 160, n.2, p. 75-80, (2008).

CAEIRO, J. P.; MATHEWSON, J. J.; SMITH, M. A.; JIANG, Z. D.; KAPLAN, M. A & DUPONT, H. L. Etiology of outpatient pediatric nonsenteric diarrhea: a multicenter study in the United States. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 18, n. 2, p. 94-97, (1999).

CAMA, V. A., MATHISON, B.A. Infections by intestinal *Coccidia* and *Giardia duodenalis*. **Clin Lab Med**. v.35(2); p.423-44; (2015).

CARADONNA, T.; MARANGI, M.; DEL CHIERICO, F.; FERRARI, N.; REDDEL, S.; BRACAGLIA G.; NORMANNO, G.; PUTIGNANI, L.; GIANGASPERO, A. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. **Food Microbiol**, v 67, p. 67-75, (2017).

CARBONERA, M. A Universidade Federal de Santa Catarina e a interação com a comunidade por meio dos serviços de extensão universitária: desafios do acesso e participação das comunidades vizinhas. 2019. f 97p. **TCC (Graduação) – Curso de Serviço Social da Universidade Federal de Santa Catarina**. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/199508>. Acesso em 26 de novembro de 2022.

CARRERO, S. H. S. Prevalencia de parásitos intestinales y factores de riesgo en escolares del colegio Chicamocha Kennedy I del municipio de Tuta, Boyacá – Colombia. **Universidad y Salud**. v. 15, n. 2, p.218-224, (2013).

CDC, **Centers for Disease Control and Prevention** – Diagnostic Procedures Stool Morphcomp, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/stool/morphcomp.html>. Acesso em 17 de setembro de 2022.

CDC, **Centers for Disease Control and Prevention** – Giardiasis., 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>. Acesso em 20 de outubro de 2022.

CDC, **Centers for Disease Control and Prevention** – Neglected Tropical Diseases, 2022. Disponível em: <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/>. Acesso em: 31 de maio de 2022.

CDC, **Centers for Disease Control and Prevention** – Parasites. *Blastocystis* Biology, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/blastocystis/biology.html>. Acesso em 17 de setembro de 2022.

CDC, **Centers for Disease Control and Prevention** – Parasites. Soil transmitted helminths, 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/sth/>. Acesso em 31 de maio de 2022.

CDC, **Centers for Disease Control and Prevention** - Giardiasis. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html>. Acesso em 23 de outubro de 2022.

CELESTINO, A. O.; VIEIRA, S. C. F.; LIMA, P. A. S.; RODRIGUES, L. et al. Prevalence of intestinal parasitic infections in Brazil: a systematic review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v 54, p. e 00332021, (2021).

CERTAD, G., VISCOGLIOSI, E., CHABÉ, M., CACCIÒ, S. M. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 7, p.561-576, (2017).

CIFRE, S., GOZALBO, M., ORTIZ, V., SORIANO, J. M., MERINO, F., TRELIS, M. *Blastocystis* subtypes and their association with Irritable Bowel Syndrome. **Medical Hypotheses**; v. 116; p. 4 – 9; (2018).

CLARK, C, G. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. **Mol Biochem Parasitol**; v. 87, p.79–83, (1997).

CLARK, C, G., DIAMOND, S, L. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 329-341; July (2002).

CLARK, C.G.; MARK, V, G.; MOHAMMED, A, A.; STENSVOLD, C, R. Recent developments in *Blastocystis* research. **Adv. Parasitol.** v 82, p. 1–32, (2013).

COELHO C, H.; DURINGAN, M.; LEAL, D, A, G.; SCHNEIDER, A, D, B.; FRANCO, R, M, B.; SINGER, S, M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v 11, n. 10, e0006005, (2017).

CONEXÕES DE SABERES. [Internet] Disponível em: (<https://petcs.paginas.ufsc.br/historico/>). Acesso em 30 de maio de 2022.

CORRÊA, C, R, T., OLIVEIRA-ARBEX, A, P., DAVID, É, B., GUIMARÃES, S. Genetic analysis of *Giardia duodenalis* isolates from children of low-income families living in an economically successful region in Southeastern Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo.** v.62; (2020).

DA CRUZ, P. F. F. et al. Ações educativas com ênfase à prevenção de parasitoses intestinais em uma localidade rural no município de Uberlândia, MG. **Revista Brasileira de Educação e Saúde.** v. 4, n. 2, p. 8-15, (2014).

DAPB, N, C. Does helminth infection affect mental processing and educational achievement? **Parasitology Today.** 1994; 10:14

DAVID, E, B., GUIMARÃES, S., OLIVEIRA, A, P., SEQUEIRAL, T, C, G, O., BITTENCOURT, G, N., NARDI, A, R, M., RIBOLLAL, P, E, M., FRANCO, R, M, B., BRANCO, N., TOSINI, F., BELLA, A., POZIO, E., CACCIO, S, M. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. **Parasites & Vectors** 8:103; (2015).

DAWSON, S, C., HOUSE, S, A. Life with eight flagella: flagellar assembly and division in *Giardia*. **Curr Opin Microbiol.** v. 13; p. 480-90; (2010).

DAWNSON, S, C., SAGOLLA, M, S., MANCUSO, J, J., WOESSNER, D, J., HOUSE, S, A., FRITZ-LAYLIN, L., et al. Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. **Eukaryot Cell.** V.6; p. 2354-64; (2007).

DE CARLI, G, A. Parasitologia Clínica. 2ª edição. São Paulo: **Editora Atheneu**, (2011).

DENG, L., and TAN, K. S. W. Interactions between *Blastocystis* subtype ST4 and gut microbiota in vitro. **Parasitol. Vectors** 15, 80, (2022).

DOS SANTOS, J.; DUARTE, A, R, M.; GODATTIE, G.; LIMA, L, M. Intestinal parasites in children from a community daycare center in Florianópolis, SC, Brazil. **Patol. Trop.** V. 43, n.3, p. 332-340, (2014).

DOS SANTOS, ZANETTI, A.; MALHEIROS, A, F.; DE MATOS, T, A.; DOS SANTOS, C.; BATTAGLINI, P, F.; MOREIRA, L, M.; LEMOS, L, M, S., CASTRILLON, S, K, I.; DA COSTA, BOAMORTE, C, D., IGNOTTI, E.; ESPINOSA, O, A. Diversity, geographical

distribution, and prevalence of *Entamoeba* spp. in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Parasite**, v. 28, n. 17, 30 March, (2021).

DPDx. Laboratory diagnosis of giardiasis: *Giardia duodenalis* (lamblia). **Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern**, CDC; 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/resources/benchAids/Giardia>. Acesso em 30 de outubro de 2022.

DRUGS – Albendazole, 2022. Disponível em: <https://www.drugs.com/mtm/albendazole.html>. Acesso em 05 de novembro de 2022.

DRUGS – Mebendazole, 2022. Disponível em: <https://www.drugs.com/mtm/mebendazole.html>. Acesso em 05 de novembro de 2022.

DRUGS – Metronidazole, 2021. Disponível em: <https://www.drugs.com/metronidazole.html>. Acesso em 05 de novembro de 2022.

DRUGS – Secnidazole, 2022. Disponível em: <https://www.drugs.com/mtm/secnidazole.html>. Acesso em 05 de novembro de 2022.

DRUGS - Sulfamethoxazole and trimethoprim, 2021. Disponível em: <https://www.drugs.com/mtm/sulfamethoxazole-and-trimethoprim.html>. Acesso em 13 de novembro de 2022.

DRUGS – Tinidazole, 2021. Disponível em: <https://www.drugs.com/mtm/tinidazole.html>. Acesso em 05 de novembro de 2022.

DRUGS – Paromomycin, 2022. Disponível em: <https://www.drugs.com/mtm/paromomycin.html>. Acesso em 13 de novembro de 2022.

DUNN, N.; JUERGENS, A., ANDREW L. Giardiasis, In: StatPearls [Internet]. **StatPearls Publishing**, 2021.

DURIGAN M, GUILLARDI M C, RODRIGUES RC. A GOULART J A G, CASTRO, I C. V, LEAL, D A G, YAMASHIRO S, BONATTI T, ZUCCHI M I, FRANCO R B, SOUZAL A P. Population genetic analysis of *Giardia duodenalis*: genetic diversity and haplotype sharing between clinical and environmental sources. *MicrobiologyOpen*. 2017;6:e424. (2016).

EFSTRATIOU, A., ONGERTH, J. E., & KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. **Water Research**, v.114; p.14–22, (2017).

EINARSSON, E.; MA'AYEH, S., SVARD, S, G. An up-date on *Giardia* and giardiasis. **Current opinion in microbiology**, v. 34, p. 47-52, (2016).

EIPPER, S.; PIMENTA, L, F. Processo de ocupação e serviço urbanos no Maciço central de Florianópolis: Serrinha e alto Caieira, **Revista Eletrônica de Extensão**, n.4, ano (2006).

ELMENDORF, H, G., DAWSON, S, C., MCCAFFERY, J,M. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. **Int J Parasitol**. v. 33; p. 3-28; (2003).

ELKINS, K. M. Chapter 4 - DNA Extraction. In: ELKINS, K. M. (Ed.). *Forensic DNA Biology*. San Diego: **Academic Press**, p.39-52; (2013).

ESCOBEDO, A. A., ALMIRALL, P., ALFONSO, M., CIMERMAN, S., CHACIN-BONILLA L. Sexual transmission of giardiasis: a neglected route of spread? **Acta Trop.** Apr; v.132; p.106–11; (2014).

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. **Microbiological Risk Assessment Series**, no. 23, rome 302pp, (2014).

FANTINATTI M., GONÇALVES-PINTO M., LOPES-OLIVEIRA LAP., DA-CRUZ AM. Epidemiology of *Giardia duodenalis* assemblages in Brazil: there is still a long way to go. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.25; p.115; Jan (2021).

FELEKE, B, E. Nutricional Status and Intestinal Parasite in School age children: a comparative cross-sectional studt. **Int. J. Pediatr.**, [s.l.], v. 2016, p. 1-8, (2016). DOI: 10.1155/2016/1962128.

FENG, M.; PANDEY, K.; YANAGI, T.; WANG, T.; PUTAPORNTIP, C.; JONGWUTIWES, S.; CHENG, X.; SCHERCHAND, J, B.; PANDEY, B, D., TACHIBANA, H. Prevalence and genotypic diversity of *Entamoeba* species in inhabitants in Kathmandu, Nepal. **Parasitology Research**, v. 117, p. 2467-2472, (2018).

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology og *Giardia* species and giardiasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n.1, p. 110-140, (2011).

FERREIRA, A, Z., BUNSELMEYER, H., PASSAGLIA, L, M, P. Biologia Molecular Básica, 4ª edição. **ArtMed**, (2012).

FIGUEIREDO P, F, T., SILVA, R, K, N, R., CARVALHO, S., ROCHA, F, C., CHAGAS, T, G, M., GOMES, C, D., JUNIOR, H, C, R., RIBEIRO, T, C, M., MATTOS, P, Â., SILVA, L, K., SOARES, M, N., TEIXEIRA, A, M, C. The predominance of *Giardia duodenalis* AII sub-assemblage in young children from Salvador, Bahia, Brazil. **Biomedica** 40: 557-568; (2020).

FILICE, F.P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ. **Calif. Publ. Zool.** V.57, p. 53–146; (1952).

FLETCHER, S, M. et al. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. **Clin Microbiol Ver**, v. 25, n.3, p. 420-49, Jul (2012). ISSN 08938512

FREALLE, E.; EL SAFADI, D.; CIAN, A.; AUBRY, E.; CERTAD, G.; OSMAN, M.; et al. Acute Blastocystis associated apendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. **Emerg Infect Dis.**, v 21, p. 91-4, (2015).

GARCIA, L. Diagnostic Medical Parasitology. 5th ed. Washington (D.C.): **ASM Press**, (2007).

GDWQ/WHO – World health organization (WHO). Guidelines for drinking-water qaulity (GDWQ): **Fourth edition incorporating first addendum.** Geneva. (2017). Acesso em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254637>, acessado em 30 de maio de 2022.

GHENGESH, K, S., GHANGHISH, K., BENDARIF, E, T., SHEMSESH, K., FRANKA, E. Prevalence of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium* spp. in Libya: 2000/2015. **Libyan Journal of Medicine.** (2016).

- GONÇALVES, A. L. R. et al. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, n. 2, p.191-193, (2011).
- GUPTA, R., RAYAMAJHEE, B., SHERCHAN, S, P., RAIL, G., MUKHIYA, R, K., KHANALL, B., RAI, S, K. Prevalence of intestinal parasitosis and associated risk factors among school children of Saptari district, Nepal: a crosssectional study. **Tropical Medicine and Health**; v.48; p.73; (2020).
- GUTZEIT, C., MAGRI, G., CERUTTI, A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol. Rev.* 260, 76–85, (2014).
- GUZMAN, S, Y., ROMERO, C, Y., BERNAL, J, E., GONZALEZ, J, F, E., SILVA, S, N., FUSARO, C. Molecular identification of *Giardia* spp. in Latin America: An updated systematic review on reports from 2017 to 2021. **J Infect Dev Ctries**. v.16; p. 392-401; (2022).
- HAJISSA, K., ISLAM, M, A., SANYANG A, M., MOHAMED, Z. Prevalence of intestinal protozoan parasites among school children in Africa: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**. v.16(2): e0009971; (2022).
- HALLIEZ, M, C., BURET, A, G. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. **World J Gastroenterol**. v.19; p.8974–85; (2013).
- HAQUE, R.; HUSTON, C, D.; HUGHES, M.; HOUP, E. & PETRI, W, A., Jr. Amebiasis. **New England Journal of Medicine**, v 348, p. 1565-1573, (2003).
- HARLT, D, L., & CLARK, A, G. Principles of population genetics, 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- HARVEY TV, TANG AM, DA PAIXAO SEVA´ A, ALBANO DOS SANTOS C, SANTOS CARVALHO SM, MAGALHÃES DA ROCHA CMB, et al. Enteric parasitic infections in children and dogs in resource-poor communities in northeastern Brazil: Identifying priority prevention and control areas. **PLoS Negl Trop Dis** 14(6): e0008378; (2020).
- HAWASH, Y. DNA Extraction from Protozoan Oocysts/Cysts in Feces for Diagnostic PCR. **Korean J. Parasitol**. v. (52) 3; p. 263-271; (2017).
- HEYWORTH, M, F. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. **Parasite**, v. 23, (2016).
- HOTEZ, P, J.; BRINDLEY, P, J.; BETHONY, J, M.; KING, C, H. et al. Helminth infections/; the greatd neglected tropical diseases, **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1311-1321, Apr (2008).
- HUBLIN, J.S.Y.; MALONEY, J.G.; SANTIN, M. *Blastocystis* in Domesticated and Wild Mammals and Birds. **Res. Vet. Sci.**, 135, (2020).260–282. [CrossRef] [PubMed]
- Huey, C.S., Mahdy, M.A., Al-Mekhlafi, H.M., Nasr, N.A., Lim, Y.A., Mahmud, R., Surin, J. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Malaysia. **Infect. Genet. Evol.** 17, 269–276. (2013).
- HUYSE, T.; POULIN, R.; & THERON, A. Speciation in parasites: A population genetics approach. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 469-475, (2005).
- IBGE. **AGÊNCIA IBG NOTÍCIA**, 2018. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de->

noticias/noticias/28903-10-3-milhoes-de-pessoas-moram-em-domicilios-com-inseguranca-alimentar-grave. Acesso em 30 de maio de 2022.

IBGE. **DIRETORIA DE PESQUISAS** – DPE – Coordenação de População Indicadores Sociais – COPIS. 2021. Disponível em: https://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2021/estimativa_dou_2021.pdf. Acesso em 30 de maio de 2022.

JAVANMARD, E.; NIYYATIA, M.; GHASEMI, E.; MIRJALALI, H.; ASADZADEH A, H.; ZALI, M, R. Impacts of human development index and climate conditions on prevalence of *Blastocystis*: A systematic review and meta-analysis. **Acta Trop.**, v. 185, p. 193-203, Epub, 24 May (2018).

JEFFS, E., WILLIMAN, J., MARTIN, N., BRUNTON, C., WALLS, T. The epidemiology of non-viral gastroenteritis in New Zealand children from 1997 to 2015: an observational study. **BMC Public Health**. Jan 5;19(1):18. (2019).

JELINEK, T.; PEYERL, G.; LOANSCHER, T.; & NOTHDUR, H, D. Evolution of na antigen capture enzyme immunoassay for detection of *Entamoeba histolytica* in stool samples. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 15, n. 752-755, (1996).

JELINEK, T.; PEYERL, G.; LOSCHER, T.; VON SONNENBURG, F.; NOTHDURFT, H, D. The role of *Blastocystis hominis* as a possible intestinal pathogen in travellers. **J. Inf. Secur.** v. 35, p. 63–66, (1997).

JIMÉNEZ, P, A.; JAIMES, J, E.; RAMÍREZ, J, D. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. *Parasites Vectors*, v. 12, n. 1, p. 376, 29 Jul (2019).

JONHSTON, S. P.; BALLARD, M. M.; BEACH, M. J.; CAUSER, L.; WILKINS, P. P. Evaluation of tree commercial assays for detection of *Giardia* and *cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal Clinical Microbiology**; v. 41; p. 623-626; (2003).

JOLENE, H, N.; COLLIER, S, A., GARGANO, J, W. Giardiasis and Subsequent Irritable Bowel Syndrome: A longitudinal Cohort Study using Health Insurance date, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 5, p. 798-805, 1 March, (2017).

KHAIRNAR, K, S.; & PARIJA, S, C. A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. **BMC Microbiology**, v 7, Art. No 47., (2007).

KHAN, S., CHANG, L. Diagnosis and management of IBS. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**; v. 7(10); p. 565–81, (2010).

KHORSHIDVAND, Z.; KHAZAEI, S.; AMIRI, M, R.; TAHERKHANI, H.; MIRZAEI, A. Worldwide prevalence of emerging parasite *Blastocystis* in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis, **Microbial Pathogenesis**, v. 152, (2021).

KUK S, YAZAR S, CETINKAYA U. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2012;107:965-8. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800001>

KOEHLER, A. V., JEX, A. R., HAYDON, S. R., STEVENS, M. A., GASSER, R. B. *Giardia*/giardiasis — A perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**. V.32 (2); p. 280-289; (2014).

KUNSTLER, J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. **C. R. Soc. Biol. Ses Filial**. V.95; p.347–349; (1882).

KOSIK-BOGACKA, D.; LEPCZYNSKA, M.; KOT, K.; SZKUP, M.; DZIKA, E.; GROCHANS, E. Prevalence, subtypes and risk factors of *Blastocystis* spp. infection among pre-and perimenopausal women. **BMC Infect Dis**, v. 21, p. 1125, (2021).

LAL, A.; BAKER, M. G.; HALES, S.; & FRENCH, N. P. Potential effects of global environmental changes on cryptosporidiosis and giardiasis transmission. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 83-90, (2013).

LALLE, M.; HANEVIK, K. Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. **Infect Drug Resist**, v. 11, p. 1921-1933, (2018).

LANDER, R. L. Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast Region of Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. v.28, n. 11, p. 2177-2188, (2012).

LAUGART, E. L. *et al.* Aspectos epidemiológicos de las parasitosis intestinales en niños de Vegón de Nutrias, Venezuela. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**. vol.50, n.3, p.330-339, (2012).

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agentes associated with waterborne diseases. **Crit Reve Microbiol**, v. 28, n. 4, p. 371-409, (2002). ISSN 1040-841x (Print) 1040-841x.

LÉGERET, C., RUTTIMANN, C., FURLANO, R. I., RUF, T., POPPERT, S., FANKHAUSER, H., KOHLER, H. *Blastocystis* in Swiss children: a practical approach. **European Journal of Pediatrics**. V. 179, p. 979–984 (2020).

LEE, M. F., LINDO, J. F., AUER, H., & WALOCHNIK, J. Successful extraction and PCR amplification of *Giardia* DNA from formalin-fixed stool samples. **Experimental Parasitology**, 198, 26–30. (2019).

LEITE, R. O; TOMA, H. K; ADAMIL, Y. L. Diagnóstico parasitológico e molecular de enteroparasitoses entre crianças residentes e funcionários de uma instituição beneficente para menores no município de Niterói- RJ, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. v.43, n.4, p. 446-458, (2014).

LEUNG, A. K., LEUNG, A. A., WONG, A. H., SERGI, C. M., KAM, J. K. Giardiasis: an overview. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 134-143, (2019).

MACKAY, I. M. Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. **Horizon Scientific Press**, (2007).

MELO, G. B.; PAULA, F. M.; MALTA, F. M.; MARUTA, C. W.; CRIADO, P.; CASTILHO, V. L. P.; GONÇALVES, E. M. N, ESPIRITO SANTO, M. C.; GRYSCHKE, R. C. B.

Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from São Paulo city, **Brazil. Parasitol Open**, v. 2, n.2, p. 10, (2017).

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 233-244, (2003).

MOTTA, M, E, F, A.; SILVA, G, A, P. Diarreia por parasitas. **Ver. Bras. Saude Mater. Infant.** [periódico na internet]. (2002).

MUHSEN, K., COHEN, D., LEVINE, M. M. Can *Giardia lamblia* Infection Lower the Risk of Acute Diarrhea among Preschool Children? **Journal of Tropical Pediatrics**, 60(2), 99–103; (2013).

NASH, T, E.; HERRINGTON, D, A.; LOSONSKY, G, A.; & LEVINE, M, M. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 6, p. 974-984, (1987).

NASH T E, MCCUTCHAN T, KEISTER D, DAME J B, CONRAD J D, FRANCES D. Gillin, Restriction-Endonuclease Analysis of DNA from 15 *Giardia* Isolates Obtained from Humans and Animals, **The Journal of Infectious Diseases**, Volume 152, Issue 1, July. Pages 64–73, (1985).

NAKAO, H, J.; COLLIER, S, A.; GARGANO, J, W. Giardiasis and Subsequent irritable bowel syndrome: a longitudinal cohort study using health insurance data, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 5, p. 786-805, 1 March (2017).

NCEZID-Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, **Parasites, Giardia**. (2021). Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/giardia>. Acesso em 22 de outubro de 2022.

NEVES, DP; MELO, A.L.; GENARO, O; LINARDI, PM. **Parasitologia Humana**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.

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

NIMIRI, L, F. Evidence of na epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in northern **Jordan. J Clin Microbiol**, v. 31, n. 10, p. 2706-8, (1993).

NUNES J, G. Diagnóstico de enteroparasitoses em crianças e adolescentes da comunidade da Serrinha, Florianópolis-SC. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – Universidade Federal de Santa Catarina, **UFSC**, 2022, 62 p.

OLIVEIRA, REGITANO, ROESE, ANTHONISEN, PATROCINIO, PARMA, SCAGLIUSI, TIMÓTEO, BELICUAS. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, (2007).

OLIVEIRA- ARBEXA, A, P., DAVIDA, E, B., GUIMARÃES, S. *Blastocystis* genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**. V. 57; p. 59-63; (2018).

OPAS-PAHO (**PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION**). In: Health in the Americas. Pan American Health Organization, Washington DC, USA. Mexico, Pp. 357-378, (1998).

OPAS-PAHO (**PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION**). ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. 3. ed. Vol. I, II, III. Scientific and Technical Publication n° 580, Parasitoses. Washington, D.C.: PAHO (2003).

OPPONG, T, B., YANG, H., AMPONSEM-BOATENG, C., EKD, K., ABDULAI, T., DUAN, G., OPOLOT, G. Enteric pathogens associated with gastroenteritis among children under 5 years in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. **Epidemiology and Infection**; v. 148, e64, p. 1–9; (2020).

PACHECO FT, RODRIGUES SILVA RK, DE CARVALHO SS, ROCHA FC, DAS CHAGAS GM, GOMES DC, et al. Predominance of *Giardia duodenalis* AII subassemblage in young children from Salvador, Bahia, Brazil. **Biomédica**. 2020;40(3).

PANTI-MAYA, J, A., ZONTAB, L, M., COCIANCICB, P., MEDINAA, R, C, B., WILLIAMSC, C, M., ROBLESB, M, R., BETANCOURTA, S, F, H. Occurrence of intestinal parasites in Mayan children from Yucatán, Mexico. **Acta Tropica**. v.195; p. 58-61; (2019).

PARIJA, S.C., JEREMIAH, S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. **Trop. Parasitol.** 3,17-25, (2013).

PEREA, M., VÁSQUEZ, V., PINEDA, V., SAMUDIO, F., CALZADA, J, E., SALDAÑA, A. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. infecting children from a rural community in Panama. **Parasite Epidemiology and Control**. V. 9, (2020).

PIMENTA, M, C, A.; PIMENTA, L, F. Projeto de Atividade de Extensão: Diagnostico sócio-espacial Maciço Central de Florianópolis: História, Meio ambiente, e Espaços público. Plano Comunitário de Urbanização e de Preservação do Maciço Central de Florianópolis – SC. Florianópolis: UFSC, **Bolsas de Extensão programa** (2004).

POIRIER, P.; WAWRZYNIAK, I.; ALBERT, A.; EL ALAOUI, H.; DELBAC, F.; LIVRELLI, V. Development and evaluation of a real time PCR assay, for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 975-983, (2011).

POIRIER P., ET AL. “Molecular subtyping of *Blastocystis* spp. using a new rDNA marker from the mitochondria-like organelle genome”. **Parasitology** 141.5: 670-681; (2014).

POPRUK, S.; ADAO, V, E, D.; RIVERA, W, L. Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, 95 (2021).

PUTHIA, M. K., VAITHILINGAM, A., LU, J., TAN, K. S. W. Degradation of human secretory immunoglobulin a by *Blastocystis*. **Parasitol. Res.** 97, 386–389, (2005).

RAMÍREZ, J, D., SÁNCHEZ, A., HERÁNDEZ, C., FLÓREZ, C., BERNAL, M, C., GIRALDO, J, C., REYES, P., LÓPEZ, M, C., GÁRCIA, L., COOPER, P, J. VICUÑA, Y., MONGI, F., CASERO, R, D. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. **Infection, Genetics and Evolution**. V. 41; p. 32-35; (2016).

RANG, H, P., DALE, M, M., RITTER, J, M., FLOWER, R, J., HENDERSON, G. Farmacologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, (2012).

RAUFF-ADEDOTUN, A.A.; MEOR TERMIZI, F.H.; SHAARI, N.; LEE, I.L. The Coexistence of *Blastocystis* spp. in Humans, Animals and Environmental Sources from 2010–2021 in Asia. **Biology**, 10, 990, (2021).

RENAME - Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais** Rename 2022; Brasília : Ministério da Saúde, (2022).

REY, L. Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Guanabara Koogan. **Rio de Jesus**, (2008).

RESOLUÇÃO **64/A/RES/64/292**, de 28 de julho de 2010. Disponível em: https://www.un.org/waterforlifedecade/pdf/human_rigt_to_water_and_sanitation_media_brief_por.pdf. Acesso em 26 de junho de 2022.

RUDZINSKAA, M., KOWALEWSKAA, B., WAŻBKATARZYNA, P, S., SZOSTAKOWSKA, B. *Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland – A single center study. **Infection, Genetics and Evolution**. v 75, November (2019).

RYAN, U.; HIJAWI, N.; FENG, Y.; XIAO, L. Giardia: na under-reported foodborne parasite. **International jornal for Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 1-11, (2019).

RYAN U M., FENG Y., FAYER, R., XIAO L. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). **International Journal for Parasitology**. v.51; p 1099-1119, (2021).

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.. Polymerase Chain Reaction. In: GREEN, Michael R; SAMBROOK, Joseph. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

SÁNCHEZ, G. P. *et al.* Prevalencia de parasitismo intestinal en escolares de 6-11 año. Santiago, Cuba. **MEDISAN**. vol.16, n.4, p. 551-557, (2012).

SANTOS, H, L.; SODRE, F, C.; DE MACEDO, H, W. *Blastocystis* sp. In splenic cysts: causative agente of acidental association? A unique case report. **Parasit Vectors**, v. 29, n. 7, p. 207, (2014).

SCANLAN, P, D.; STENSVOLD, C, R.; COTTER, P, E, D.; 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**, v. 15, n. 12, p. 4071-6, (2015).

SCHUURMAN, T.; LANKAMP, P.; van BELKUM, A.; KOOISTRA –SMID, M.; van ZWET, A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detections of *Giardia lamblia* in human stool specimens. **Clinical Microbiology infect**. v. 13; p. 1186-1191; (2007).

SCICLUNA, S, M.; TAWARI, B.; CLARK, G. DNA Barcoding of *Blastocystis*. **Protist**, V. 157, p. 157-77, 20 January (2006).

SMITH, H. V. CACCIO, S. M., COOK, N., NICHOLS, R. A. B., TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary parasitology**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, 2007.

- SEGUÍ, R., MUÑOZ-ANTOLI, C., KLISIEWICZ, D, R., OISHI, C, Y., KÖSTER, P, C., LUCIO, A., HERNÁNDEZ-DE-MINGO, M., PUENTE, P., TOLEDO, R., ESTEBAN, J, G., CARMENA, D. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: A community survey. **Parasit Vectors** 11: 490; (2018).
- SHAMS, M.; SHAMSI, L.; YOUSEFI, A.; SADREBAZZAZ, A.; ASGHARI, A.; MOHAMMADI-GHALEHBIN, B.; SHAHABI, S.; HATAM, G. Current global status, subtype distribution and zoonotic significance of *Blastocystis* in dogs and cats: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, v. 15, p. 225, (2022).
- SILVA, F. S. et al. Frequência de Parasitos Intestinais no Município de Chapadinha, Maranhão, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. vol. 39 n.1 p. 63-68, (2010).
- SMITH, H. V.; S. M. CACCIO.; A. TAIT.; J. MCLAUCHLIN.; R. C. THOMPSON. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends Parasitol**. v. 22; p. 160–167, (2006).
- SINGH, R. R.; PATEL, K. P. Chapter 4 Emulsion PCR: Techniques and Appl. Clinical Applications of PCR, **Methods in Molecular Biology**, v. 1392, p. 33–42, (2016).
- SILBERMAN, J. D., SOGIN, M. L., LEIPE, D. D., and CLARK, C. G. Human parasite finds taxonomic home. **Nature** 380, 398–398, (1996).
- SNEL, S. J.; M. G. BAKER.; K. VENUGOPAL. The epidemiology of giardiasis in New Zealand, 1997-2006. **N. Z. Med. J**, v. 122, p. 62–75, (2009).
- SOARES, R.; TASCA, T. Review Giardiasis: na update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 129, p. 98-102, (2016).
- SPEICH, B.; CROLL, D.; FURST, T.; UTZINGER, J.; KEISER, J. Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 1, p. 87-99, Sep (2015).
- STENSVOLD, C, R.; CLARK, C, G. Pre-empting Pandora's box: *Blastocystis* sub-types revisited. **Trends Parasitol**, v. 36, n. 3, p. 229-32, (2020).
- STENSVOLD, C. R., & CLARK, C. G. Current status of *Blastocystis*: A personal view. **Parasitology International**, 65(6), 763–771; (2016).
- STENSVOLD, C, R.; SURESH, G, K.; TAN, K, D.; TROMPSON, R, C.; TRAUB, R, J.; VISCOGLIOSI, E.; et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. **Trends Parasitol**, v. 23, p. 93-96, (2007).
- STENSVOLD, C, R., ALFELLANI, M, A., NØRSKOV-LAURITSEN, S., PRIP, K., VICTORY, E, L., MADDOX, C., NIELSEN, H, V., CLARK, C, G. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. **Int J Parasitol**.v39, p. 473–479; (2009).
- STENZEL, D, J.; BOREHAM, P, F, L. *Blastocystis hominis* revisited. **Clin Microbiol Rev**; v. 9, p.563–584, (1996).

- SULAIMAN, I, M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R, H., TROUT, J, M.; SCHANTZ, P, M.; DAS, P & LAL, A, A., XIAO, L. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, November (2003).
- SURESH, K.; SMITH, H, V.; TAN, T, C. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. **Appl Environ Microbio**, v. 71, n. 9, p. 5619-20, (2005).
- TAN, K. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. **Vet Parasitol**; v. 126: p. 121-144, (2004).
- TAN, K. S. W. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. **Clin. Microbiol. Rev.** 21, 639–665, (2008).
- TAN, K, S.; MIRZA, H.; TEO, J, D.; WU, B.; MACARY, P, A. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. **Curr Infect Dis Rep**; v. 12, p. 28–35, (2010).
- TAN KS., et al. “Recent advances in Blastocystis hominis research: hot spot in terra incognita”. **International Journal Parasitology** 32.7: 789-804. (2002).
- TAYLOR-ROBINSON, D, C.; MAAYAN, N.; DONEGAN, S.; CHAPLIN, M. et al. Public health deworming programmes for soil-transmitted helminths in children living in endemic areas. **Cochrane Database Syst Rv**, v. 9, n. 9, p. Cd000371, 11 Sep (2019).
- TEIMOURI, A.; KESHAVARZ, H.; MOHTASEBI, S.; GOUDARZI, MIKAEILI, F.; BORJIAN, A.; ALLAHMORADI, M.; YIMAM, Y.; MOHAMMAD JAVAD, A, A. Intestinal parasites among food handlers in Iran: A systematic review and meta-analysis, **Food Microbiology**, v. 95, (2021).
- THOMPSON, RC A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1259-1267, 2000.
- THOMPSON, R. C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 15-35, (2004).
- THOMPSON, R. C.; MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 69-137, (2004).
- THOMPSON, R.C.A. Foodborne enteric, asexual, unicellular parasites (in press) In: Gajadhar, A. (Ed.), Foodborne Parasites: Occurrence and Control in the Food Supply Web. **Elsevier**, pp. 149–164. (2015).
- TUMMLER, B. Molecular epidemiology in current times. **Environmental Microbiology**, (2020). Doi: 10.1111/1462-2920.15238.
- TURLKELTAUB, J, A.; MCCARTY, T, R.; HOTEZ, P, J. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, p. 38-44, (2015).
- UCHÔA, F, F, M., SUDRÉ, A, P., CAMPOS, S, D, E., ALMOSNY, N, R, P. Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. **J Microbiol Methods**. v. 145: 73-78; (2018).

UNICEF. The World Bank Joint Child Malnutrition Estimates: Levels and trends in child malnutrition. (2012)

VALENÇA-BARBOSA, C. Caracterização molecular de isolados de *Blastocystis* sp. De origem humana e animal. Rio de Janeiro, (2018). 168 f:il Tese de Doutorado - **Instituto Oswaldo Cruz**, Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

VAN HATTEM, J., ARCILLA, M., BART, A, et al. Carriage of *Blastocystis* spp in travellers- a prospective longitudinal study. **Travel Med Infect Dis** v. 27; p. 87–91; (2019).

VAN PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification, 2008.

VASSALOS, C, M.; SPANAKOS, G.; VASSALOU, E., PAPAPOPOULOU, C.; VAKALIS, N. Differences in clinical significance and morphologic features of *Blastocystis* sp. subtype 3. **Am J ClinPathol**; v. 133, p. 251–258, (2010).

ROJAS-VELÁZQUEZ, L; MORÁN, P; SERRANO-VÁZQUEZ, A; PORTILLO-BOBADILLA, T; GONZÁLEZ, E; PÉREZ-JUÁREZ, H; HERNÁNDEZ, E; PARTIDA-RODRIGUÉZ, O, NIEVES-RAMÍREZ, M; PADILLA, A; ZARAGOZA, M and XIMÉNEZ, C. The regulatory function of *Blastocystis* spp. on the immune inflammatory response in the gut microbiome Front. Cell. Infect. **Microbiol.** 12:967724, (2022).

WALDRAM, A., VIVANCOS, R., HARTLEY, C., LAMDEN, K. Prevalence of *Giardia* infection in households of *Giardia* cases and risk factors for household transmission. **BMC Infectious Diseases**; v.17; p.486; (2017).

WEINKE, T.; FRIEDRICH-JAENICKE, B.; HOPP, P. & JANITSCHKE, K. Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travellers returning from the tropics and male homosexuals. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 1029-1031, (1990).

WHO. Protozoan parasites (Cryptosporidium, Giardia, Cyclospora). In: **Guidelines for drinking-water quality**, 2nd ed. Addendum: Microbiological agents in drinking water. Geneva, World Health Organization, pp. 70-118, (2002).

WHO/PAHO/UNESCO report. “A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico, 28-29 January 1997”, **Epidemiological Bulletin**, v. 18, n. 1, pp. 13-14, (1997).

WILKE H, ROBERTSON LJ. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. **J Microbiol Methods.** 2009;78:292-6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.06.018>

WOLFE, M, S. Giardiasis. **Clin Microbiol Rev.** Jan;5. v.1; p.93–100 (1992).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – **Sanitation**, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sanitation>. Acesso em 30 de junho de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – **SDG Goal 6** Ensure availability and sustainable management of water and sanitation for all, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/sdg-target-6-ensure-availability-and-sustainable-management-of-water-and-sanitatio-for-all>. Acesso em: 30 de junho de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): **Soil-transmitted helminth infections**. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/newa-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>. Acesso em 31 de maio de 2022.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2022: monitoring health for the SDGs sustainable development goals**. World Health Organization, 2022.

XIAO, L.; FENG, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 8, p. 14-32, (2017).

YASON, J. A., LIANG, Y. R., PNG, C. W., ZHANG, Y., and TAN, K. S. W. Interactions between a pathogenic blastocystis subtype and gut microbiota: in vitro and in vivo studies. **Microbiome** 7, 30, (2019).

YODER, J. S.; C. HARRAL; M. J. BEACH. Giardiasis surveillance—United States, 2006-2008. **MMWR Surveill. Summ.** v. 59, p. 15-25, (2010).

YOSHIKAWA, H., ABE, N., IWASAWA, M., KITANO, S., NAGANO, I., WU, Z., TAKAHASHI Y. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. **J Clin Microbiol.** Apr;38(4):1324-30; (2000).

ZANETTI, A.d.; MALHEIROS, A, F.; DE MATOS, T, A. *et al.* Prevalence of *Blastocystis* sp. infection in several hosts in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Parasites Vectors**, v.13, p.30 (2020).

ZAHA, A; FERREIRA, H B; PASSAGLIA, L M. P. Biologia molecular básica. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed Editora Ltda.** 407 p. (2014)

ZHAO, G, H.; HU, X, F.; LIU, T, L.; HU, R, S.; YU, Z, Q.; YANG, W, B.; et al. Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qinling Mountains. **Parasitol Res**, v. 116, n. 8, p. 2327-2333, (2017).

ZIERDT, C, H. *Blastocystis hominis*—past and future. **Clin Microbiol Rev**; v. 4, p. 61-79, (1991).

APÊNDICE

APÊNDICE A - Kit de extração PROMEGA

As amostras acondicionadas foram utilizadas para realização do kit de extração.

O procedimento utilizado é descrito a seguir.

1. Descongelamento das amostras e homogeneização das mesmas;
2. Adicionar 20 μ L de Proteinase K (PK) em um eppendorf com capacidade de 1,5mL;
3. Adicionar 200 μ L da amostra e vortexar;
4. Adicionar 200 μ L de Cell Lysis Buffer (CLD) e vortexar por 10 segundos;
5. Incubar a 56°C por 10 minutos;
6. Adicionar 250 μ L de Binding Buffer (BBA) e vortexar por 10 segundos;
7. Preparar os tubos do kit com a coluna ReliaPrep Binding;
8. Adicionar o líquido à coluna e centrifugar por 1 minuto em rotação máxima. Se a amostra ainda estiver visível no topo da membrana, centrifugar novamente;
9. Trocar o tubo coletor e adicionar 500 μ L de Wash Column (CWD) e centrifugar por 3 minutos em rotação máxima;
10. Repetir o passo 9 duas vezes, para um total de 3 lavagens;
11. Eluir a amostra duas vezes com 50 μ L de Nuclease-Free Water (NFW) e incubar por 1 minuto em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugar por 1 minuto em rotação máxima.;
12. Dosar cada eluição para avaliar a concentração de DNA das amostras extraídas;
13. Descartar a coluna e armazenar o DNA genômico a -20°C a longo prazo.

APÊNDICE B - Kit de extração QIAGEN

Esse kit já foi amplamente utilizado no laboratório e por estar disponível posteriormente ao prazo do começo do estudo, foi utilizado apenas em amostras que obtiveram falha na amplificação. As amostras utilizadas encontravam-se nas mesmas condições da extração anterior e foi seguido o protocolo do fabricante.

O procedimento utilizado é descrito a seguir.

1. Descongelar amostras e homogeneização;
2. Adicionar 30 μ L da amostra em um eppendorf de capacidade de 1,5mL;
3. Adicionar 100 μ L do tampão ATL;
4. Adicionar 20 μ L da Proteinase K (PK), vortexar e incubar a 56°C por 3 horas com agitador;
5. Após aquecimento e *spin*, adicionar 200 μ L tampão AL e vortexar por 15 segundos, incubar a 70°C por 10 minutos;
6. Após aquecimento e *spin*, adicionar 200 μ L de Etanol e vortexar por 15 segundos;
7. Preparar os tubos do kit com a coluna disponibilizada;
8. Transferir o conteúdo para uma coluna e centrifugar a 6.000 g por 1 minuto;
9. Após trocar o tubo coletor, adicionar 500 μ L de tampão de lavagem AW1 e centrifugar a 6.000 g por 1 minuto.
10. Adicionar 500 μ L do tampão de lavagem AW2 e centrifugar por 3 minutos em rotação máxima;
11. Trocar o tubo coletor e centrifugar por 1 minuto em rotação máxima;
12. Realizar a eluição duas vezes com 200 μ L de tampão de eluição AE ou água ultrapura e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente, centrifugando ao final por 1 minuto a 8.000 rpm;
13. Dosar cada eluição para avaliar a concentração de DNA das amostras extraídas;
14. Descartar a coluna e armazenar o DNA genômico a -20°C a longo prazo.

APÊNDICE C – Purificação

Os produtos de PCR de *G. lamblia* e *Blastocystis* sp. foram purificados através do kit comercial PCR Products Purification Kit da empresa Mebep Bioscience, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante, após esse processo, as amostras foram acondicionadas a -20°C até o envio para sequenciamento.

O procedimento utilizado é descrito a seguir.

1. Adicionar 250 µL de tampão BB para 50 µL de produto de PCR no próprio eppendorf da amostra e vortexar;
2. Colocar a mistura na coluna e centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto, descartando o fluido e recolocando a coluna no mesmo tubo;
3. Adicionar 600 µL de tampão WB e centrifugar a 12.000 rpm por 30 segundos, descartando o fluido;
4. Repetir mais uma vez o passo 3;
5. Centrifugar a coluna vazia a 13.000 rpm por 2 minutos para remoção do etanol da coluna;
6. Colocar a coluna em um eppendorf de 1,5 mL, adicionando 30 µL de tampão de eluição e incubar por 2-3 minutos a temperatura ambiente, após, centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto.
7. Descarte da coluna e armazenamento do DNA genômico purificado a -20°C até o envio para sequenciamento.