



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SAGRADO CORAÇÃO

JULIANA DEZAN NUNES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *DIENTAMOEB*A
FRAGILIS EM UMA COMUNIDADE QUILOMBOLA DE FILUS,
ALAGOAS**

**BAURU
2022**

JULIANA DEZAN NUNES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *DIENTAMOEBIA*
FRAGILIS EM UMA COMUNIDADE QUILOMBOLA DE FILUS,
ALAGOAS**

Monografia apresentada ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário Sagrado Coração, a ser utilizado como base para o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica FAP/UNISAGRADO 2021/2022.

Orientadora: Profa. Dra. Érica Boarato David (Depto. Ciências da Saúde / UNISAGRADO).

Coorientadora: Profa. Ma. Thainá Valente Bertozzo.

BAURU

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com
ISBD

S586d

Silva, Juliana Dezan Nunes

Diagnóstico molecular de *Dientamoeba fragilis* em uma comunidade Quilombola de Filus, Alagoas / Juliana Dezan Nunes Silva. -- 2022.

40f. : il.

Orientadora: Prof.^a Dra. Érica Boarato David

Coorientadora: Prof.^a M.^a Thaina Valente Bertozzo

Monografia (Iniciação Científica em Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP

1. Parasitose. 2. *Dientamoeba fragilis*. 3. Protozoário. 4. Quilombola. I. David, Érica Boarato. II. Bertozzo, Thaina Valente. III. Título.

Dedico esse trabalho a Deus, à minha mãe e ao meu pai, que sempre foi uma grande inspiração para lutar com todas às forças por aquilo em que acredito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha professora e orientadora Érica Boarato David, pelo aprendizado, dedicação, carinho e paciência durante a execução da pesquisa, bem como pelo conhecimento que foi me passado e pela oportunidade de poder realizar um dos meus sonhos como aluna.

Agradeço também a minha professora e coorientadora Thainá Valente Bertozzo, pela dedicação, empenho, ensinamentos compartilhados e por estar comigo durante essa jornada de pesquisa.

Agradeço à Biblioteca do Centro Universitário Sagrado Coração, pelo suporte técnico.

Agradeço especialmente ao Centro Universitário Sagrado Coração, pela bolsa de iniciação científica e apoio para a execução deste trabalho, além da oportunidade e disponibilização do uso de materiais e do laboratório para a realização do presente estudo.

RESUMO

Dentre as causas de enteroparasitoses que afetam milhões de pessoas no mundo, podemos classificar como agente etiológico a espécie *Dientamoeba fragilis*. Por não ser ainda uma espécie muito conhecida, inicialmente a *D. fragilis* foi classificada como uma ameba comensal que possui dois núcleos. Sua forma de transmissão atualmente é bem conflitante, sendo a mais plausível via fecal-oral, tendo como sua forma infectante o trofozoíto, diferente de outros protozoários. Duas hipóteses para explicar esse conflito em sua transmissão, é que ovos de helmintos como *Ascaris lumbricoides* seria um vetor para a transmissão do parasita, e a outra é a identificação de cistos em fezes de camundongos contaminados com *D. fragilis*, que se assemelham a outros protozoários que possuem o cisto como forma infectante. Um pequeno número de animais, como macacos, ovelhas, porcos, gorilas e ratos selvagens foram identificados como hospedeiros desse parasita. Com isso, diferentes formas do parasita podem ser ingeridas do ambiente externo para humanos ou para esses hospedeiros. Uma vez ingerida, *D. fragilis* se instala no intestino grosso e em seguida, pré-cistos, cistos e trofozoítos são eliminados nas fezes, contaminando água e alimentos. O objetivo deste estudo foi determinar e identificar por Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) os isolados de *Dientamoeba fragilis* em 84 amostras congeladas de fezes obtidas em uma comunidade quilombola Filus, localizada entre os municípios de União dos Palmares e Santana do Mundaú (105 km de Maceió), Zona da Mata de Alagoas (CAAE: 78560617.4.0000.5502). Essas amostras foram processadas anteriormente em um projeto de pesquisa que tinha como objetivo realizar a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* nesta comunidade, em 2017. Na ocasião, todos os indivíduos identificados com parasitas intestinais patogênicos foram encaminhados para tratamento no posto de saúde mais próximo do quilombo. Empregando técnicas baseadas na PCR, o DNA das 84 amostras foi submetido à extração e à amplificação do gene SSUrDNA (300 pb) para pesquisa de *Dientamoeba fragilis*. Como resultado, obtivemos à amplificação de apenas cinco (6,0%) amostras para *D. fragilis*. Embora a incidência tenha se apresentado baixa neste estudo, a distribuição de *D. fragilis* na população humana é ampla, com destaque para áreas de baixas condições de higiene e em países em desenvolvimento em regiões onde o saneamento adequado não está disponível para todos. A patogênese dessa parasitose é

mínima, geralmente assintomática e está diretamente relacionada a pacientes com a síndrome do intestino irritável.

Palavras-chave: *Dientamoeba fragilis*; parasitose; protozoários; e quilombolas.

ABSTRACT

Among the causes of intestinal parasites that affect millions of people in the world, we can classify *Dientamoeba fragilis* as the etiological agent. As it is not yet a well-known species, initially *D. fragilis* was classified as a commensal amoeba that has two nuclei. Its form of transmission is currently quite conflicting, the most plausible being the fecal-oral route, with the trophozoite as its infective form, unlike other protozoa. Two hypotheses to explain this conflict in its transmission is that helminth eggs such as *Ascaris lumbricoides* would be a vector for the transmission of the parasite, and the other is the identification of cysts in the feces of mice contaminated with *D. fragilis*, which resemble others protozoa that have the cyst as an infective form. A small number of animals such as monkeys, sheep, pigs, gorillas and wild rats have been identified as hosts of this parasite. With this, different forms of the parasite can be ingested from the external environment to humans or these hosts. Once ingested, *D. fragilis* settles in the large intestine and then pre-cysts, cysts and trophozoites are eliminated in the feces, contaminating water and food. The objective of this study was to determine and identify *Dientamoeba fragilis* isolates by Polymerase Chain Reaction (PCR) in 84 frozen stool samples obtained from a Filus quilombola community, located between the municipalities of União dos Palmares / Santana do Mundaú (105 km from Maceió), Zona da Mata de Alagoas (CAAE: 78560617.4.0000.5502). These samples were previously processed in a research project that aimed to carry out a search for *Schistosoma mansoni* eggs in this community, in 2017. At the time, all individuals identified with pathogenic intestinal parasites were referred for treatment at the health center closest to the quilombo. Using PCR-based techniques, the DNA from the 84 samples was subjected to extraction and amplification of the SSUrDNA gene (300 bp) to search for *D. fragilis*. As a result, we obtained the amplification of only five (6.0%) samples for *D. fragilis*. Although the incidence was low in this study, the distribution of *D. fragilis* in the human population is wide, especially in areas with poor hygiene conditions and in developing countries in regions where adequate sanitation is not available to everyone. The pathogenesis of this parasitosis is minimal, usually asymptomatic and is directly related to patients with irritable bowel syndrome.

Keywords: *Dientamoeba fragilis*; parasitosis; protozoa; and quilombolas.

Sumário

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3. RESULTADOS.....	15
4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	16
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	17

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Dientamoeba fragilis é espécie inicialmente classificada como uma ameba comensal (JEEPS e DOBBEL, 1918), recentemente foi incluída na ordem *Trichomonadida* (MARITZ et al., 2014). É um organismo ameboide, que em sua maioria possui dois núcleos, e a única forma evolutiva conhecida é o trofozoíto (JOHNSON et. al., 2004). Seu mecanismo de transmissão não está claro, mas estudos têm sugerido a via fecal-oral como mais plausível, porém ao contrário da maioria dos protozoários intestinais, sua forma infectante é o trofozoíto (MIGUEL et. al., 2018).

Atualmente são aceitas duas hipóteses conflitantes para explicar a transmissão de *Dientamoeba fragilis*: a primeira é de que ovos dos helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* e *Trichuris trichiura* seriam vetores para a transmissão do parasita (OGREN et. al., 2013; ROSER et. al., 2013a); a segunda é a identificação de formas pré-císticas e císticas em fezes de camundongos contaminados com *Dientamoeba fragilis* que sugerem que esse organismo se assemelham a outros protozoários que apresentam o cisto como forma infectante (MUNASINGHEA et. al., 2013).

Diversas espécies já foram investigadas como hospedeiras potenciais de *D. fragilis*. Apesar disso, somente um pequeno número de animais foram confirmados como hospedeiros: macacos (HELENBROOK et. al., 2015), ovelhas (NOBLE & NOBLE, 1952), porcos e gorilas (LANKESTER et. al., 2010, CACCIÒ et. al., 2012) e em ratos selvagens (OGUNNIYI et. al., 2014). A figura 2 mostra o possível ciclo deste protozoário de acordo com Stark e colaboradores (2016), evidenciando que diferentes formas do parasita podem ser ingeridas (1) do ambiente externo para humanos ou para os outros hospedeiros já citados (2). Uma vez ingerida, *D. fragilis* se instala no intestino grosso, onde se multiplica por divisão binária (3). Logo em seguida, os pré-cistos, cistos e trofozoítos formados serão eliminados através das fezes (4) podendo então contaminar água e alimentos. O número (5) demonstra a via alternativa de transmissão através de ovos de helmintos.

Os estudos envolvendo a patogênese do micro-organismo são mínimos e não chegam a um consenso quanto sua patogenicidade. A primeira evidência de que *D. fragilis* poderia ser patogênica surge quando HAKANSSON (1936) observou sintomatologia em

pacientes infectados pelo protozoário. Quando há sintomatologia, a diarreia é o aspecto mais presente, seguido de dores abdominais, perda de peso, anorexia e náuseas, porém a maioria dos portadores é assintomática (STARK et. al., 2010). Um estudo retrospectivo com pacientes positivos para *D. fragilis* (2009-2014) avaliou 108 indivíduos infectados, sendo que destes, 34 (31,5%) apresentavam os sintomas característicos da infecção, chamando atenção para a patogenia do micro-organismo (MIGUEL et. al., 2018).

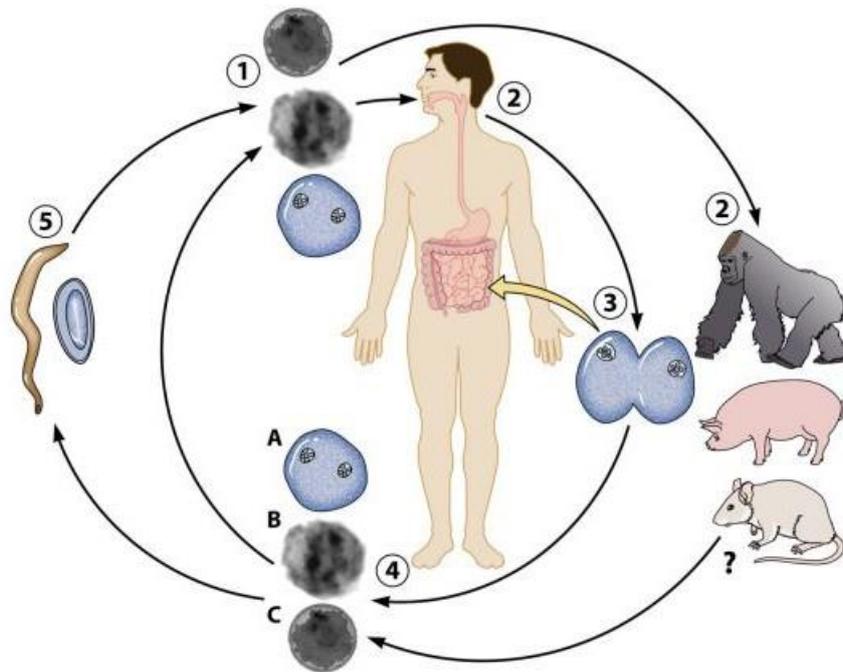


Figura 1. Ciclo evolutivo de *Dientamoeba fragilis*. Formas variadas do parasita sendo ingeridas (1) do ambiente externo para o hospedeiro humano ou animais como porcos, primatas não-humanos e possivelmente ratos (2). *D. fragilis* se instala no intestino grosso e lá se multiplica por divisão binária (3). Formação de diferentes formas: pré-cistos, cistos e trofozoítos. Via alternativa de veiculação das formas infectantes, através de ovos do helminto *Enterobius vermicularis* (5). FONTE: Stark et. al., 2016.

Esse protozoário se faz presente em pacientes com a síndrome do intestino irritável (YAKOOB et al., 2010). Além disso, outros estudos sugerem que alguns protozoários, dentre eles *Dientamoeba fragilis*, são capazes de influenciar na etiologia desta doença (STARK et al., 2007). O fato de que a muitas pessoas diagnosticadas com a síndrome do intestino irritável apresentam altas taxas de infecção por protozoários pode ser uma possível explicação para essa relação (YAKOOB et al., 2010). Além do mais, a

síndrome provoca mudanças na microbiota intestinal, podendo proporcionar condições favoráveis para a colonização de protozoários.

O diagnóstico tradicional de *D. fragilis* depende tradicionalmente da detecção microscópica de trofozoítos em esfregaços corados. Apesar de várias limitações como curto tempo de sobrevivência e perda de características morfológicas do trofozoíto fora do hospedeiro, preservação adequada das amostras de fezes e pessoal técnico treinado, esse método ainda tem sido útil para a identificação de rotina e pesquisas epidemiológicas (INTRA et al., 2019). Os ensaios moleculares, incluindo PCR convencional e em tempo real (*qPCR*) foram desenvolvidos como uma alternativa diagnóstica ao exame microscópico (STARK et al., 2016, CACCIÒ, 2018). Entretanto, nos países de baixa renda a inclusão no diagnóstico de rotina ainda não é factível, devido ao alto custo das técnicas.

Quanto ao tratamento, uma variedade de medicamentos antiparasitários e esquemas já foram empregados, mas o metronidazol e a paromomicina são os mais comumente administrados. Em estudo recente, tratamento com paromomicina apresentou maiores taxas de eliminação de *D. fragilis* do que o metronidazol, exceto em indivíduos com menos de seis anos de idade (BURGAÑA et al., 2019).

A distribuição mundial de *D. fragilis* na população humana é ampla, tendo destaque em áreas de baixas condições de higiene, principalmente em países em desenvolvimento (BARRATT et. al., 2011). A frequência de infecções observadas na população humana é muito variável, o que vai depender da população estudada, da região e, particularmente, dos procedimentos de diagnóstico empregados (STARK et al., 2016, CACCIÒ, 2018). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência de infecção por *D. fragilis* pode variar de 0,2% a 80% (STARK et. al., 2016; CACCIÒ, 2018). Taxas de infecção mais altas têm sido observadas em populações que vivem em países desenvolvidos, particularmente na Europa (STARK et al., 2016; CACCIÒ, 2018). No entanto, dados de prevalência também foram relatados em regiões em desenvolvimento onde o saneamento adequado não está disponível para todos (BARRATT et. al., 2011).

Em um estudo realizado na Itália, CALDERARO e colaboradores (2010) analisaram as fezes de 491 pacientes com suspeita de infecção parasitária e evidenciaram 21% de positividade para *D. fragilis*. Outro estudo, na Holanda, desenvolvido por MASS

e colaboradores (2013), empregando a técnica da PCR– multiplex, o parasita foi detectado em 89% das amostras de fezes obtidas de pacientes pediátricos com sintomas gastrointestinais.

Na Dinamarca, um estudo desenvolvido por ROSER e colaboradores (2013b), com 9945 amostras de fezes mostrou positividade em 43% dos indivíduos, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Outro estudo realizado também na Dinamarca no ano seguinte incluiu pacientes adultos que apresentavam a síndrome do intestino irritável.

D. fragilis foi detectado em 34,8% das amostras, enquanto no grupo controle foi diagnosticado em 23,4% dos indivíduos (KROGSGAARD et al., 2014). Em contrapartida, um estudo com pacientes suecos apresentando sintomas e um grupo controle demonstrou apenas 3% e 2% de positividade, respectivamente (OGREM et. al., 2015). Mais recentemente, HOLTMAN e colaboradores (2017) na Holanda, analisaram 107 amostras de crianças com sintomas gastrointestinais através de PCR em tempo real e identificaram uma prevalência de 55% de *D. fragilis* nos indivíduos estudados.

Nas regiões mais pobres, recentemente, levantamentos epidemiológicos baseados em microscopia e/ou ensaios moleculares foram realizados em comunidades de baixa renda na Ásia, com taxas de infecção menores que 5% (ANUAR et al., 2015; ÖGREN et al., 2016; WONG et al., 2016), Oriente Médio, com taxas variando de 0,19% à 60,6% (OSMAN et al., 2016; SARKARI et al., 2016; ABU- MADI et al., 2017) e África, com taxas variando de 8% à 16,7% (SEHATA; HASSANEIN, 2015; FORSELL et al., 2016; GREIGERT et al., 2018). Na América Latina, as informações ainda são limitadas, porém estudos mostram taxas do parasita variando entre 1,2% a 40,4% (LAINSON; SILVA, 1999; GARCIA; CIMERMAN, 2012; JIMENEZ-GONZALEZ et al., 2012; DAVID et al., 2015; INCANI et al., 2017). Até onde sabemos, três estudos foram realizados no Brasil, dois envolvendo pacientes com HIV com prevalência de 3% e 1,2% de *Dientamoeba fragilis* (LAINSON; SILVA, 1999; GARCIA; CIMERMAN, 2012) e um em crianças e adultos saudáveis vivendo em duas comunidades de baixa renda, com 13,6% e 18,4% de prevalência (DAVID et al., 2015).

Considerando que não há estudos no Brasil que relatam a ocorrência de *D. fragilis* em comunidades quilombolas, o conhecimento sobre aspectos como prevalência, dinâmica de transmissão e os possíveis fatores de risco e condições ambientais envolvidos na exposição ao parasita é uma questão urgente e relevante.

O presente estudo teve como objetivo identificar as amostras positivas *Dientamoeba fragilis* através da Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) em amostras de fezes obtidas em uma comunidade quilombola localizada em Alagoas

2. MATERIAIS E MÉTODOS

1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

Para a realização deste projeto foram utilizadas 84 amostras congeladas de fezes obtidas em novembro de 2017 na comunidade quilombola Filus, localizada entre os municípios de União dos Palmares e Santana do Mundaú (105 km de Maceió), Zona da Mata de Alagoas (CAAE: 78560617.4.0000.5502). Essas amostras foram processadas anteriormente em um projeto de pesquisa que tinha como objetivo realizar a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* nesta comunidade. Na ocasião, todos os indivíduos identificados com parasitas intestinais patogênicos foram encaminhados para tratamento no posto de saúde mais próximo do quilombo.

2. EXTRAÇÃO DE DNA

Todas as 84 amostras de fezes congeladas foram submetidas à extração de DNA empregando o kit QIAamp DNA Stool Mini kit® (Qiagen) de acordo com as recomendações dos fabricantes. Após a extração, o DNA obtido das amostras foi mantido em freezer -20°C, até o momento da amplificação do DNA genômico para *D. fragilis*.

3. AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *D. FRAGILIS*

A amplificação dos isolados de *D. fragilis*, foi realizada empregando-se técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) (Quadro 1). Assim, para os isolados desse protozoário foram utilizados primers para a amplificação de fragmentos de DNA do gene SSUrDNA (300 pb), de acordo com o protocolo proposto por Cacciò et al. (2012). Além disso, em todas as baterias de reações foram adicionadas amostras-controle, positiva e negativa. Para controle de contaminação, em cada bateria de reações é incluído um tubo contendo o tampão de reação, omitindo-se

a aplicação da amostra de DNA. A eletroforese dos produtos de amplificação foi feita em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e a visualização em Transiluminador UV. O comprimento dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de bases (Base-Pair Ladder).

Quadro 1. Primer e protocolo de amplificação do gene empregado para a identificação dos isolados de *D. fragilis*.

Parasita	Gene	Primers (Referência)	Sequência dos primers	Ciclos
<i>Dientamoeba</i>	<i>SSUr DNA</i> 300 pb	DF1094For	5'-TCAGGCTATAGGTCTTTCAGGA-3'	94°C - 3 min 94°C - 30 seg*
		DF1250Rev	5'-CATCTTCCTCCTGCTTAGACGC-3'	55°C - 30 seg* 72°C - 30 seg*
		(Cacciò et al, 2012)		40 ciclos*
				72°C - 7 min

3. RESULTADOS

De um total de 84 amostras de DNA submetidas à PCR, a amplificação dos fragmentos gênicos (Figura 2) nas reações para *D. fragilis* foi observada em apenas cinco (6,0%) amostras. Essa frequência não difere das taxas observadas em diferentes regiões, inclusive nos países em desenvolvimento. No presente estudo, apenas a PCR foi empregada para a detecção desse protozoário, pois o exame microscópico requer que a amostra seja processada logo após a defecação, procedimento que não foi possível realizar nesse estudo devido a logística, uma vez que as amostras foram coletadas no quilombo que está localizado no estado de Alagoas e processadas em laboratório na cidade de Bauru - SP. Além disso, o exame microscópico requer métodos especiais de coloração para visualização do protozoário. Ainda assim, a microscopia é um método demorado e com baixa sensibilidade.

No que se refere a capacidade de *D. fragilis* de causar doença gastrointestinal, muitas vezes debilitante, ainda é pouco conhecida já que a prevalência na população ainda é

subestimada, uma vez que o diagnóstico de rotina depende do emprego de colorações especiais para o exame microscópico e de profissionais experientes. (FLETCHER et al., 2012).

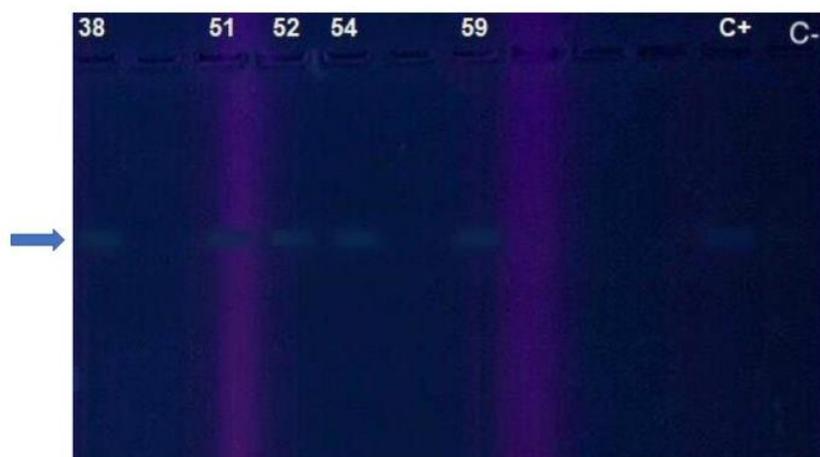


Figura 2. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Dientamoeba fragilis* correspondente ao gene *SSUrDNA* (300pb). C - Controle negativo. C + - Controle positivo (amostra sequenciada). 38, 51, 52, 54 e 59 - Amostras de fezes positivas.

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nesse estudo, foi observado uma prevalência baixa (6%) sendo que, infecções humanas por *D. fragilis* têm sido relatadas em países de todos os continentes, especialmente nos países industrializados. Com base em diferentes procedimentos diagnósticos, a prevalência varia de 0,2% a 82% e, ao contrário do observado em outros protozoários intestinais, é geralmente mais alta nos países desenvolvidos (STARK et. al., 2016; CACCIÒ, 2018; BOUGHATTAS et al., 2017; AL-HINDI et al., 2019). Quando apenas estudos epidemiológicos moleculares são levados em consideração, prevalência maior que 20% já foram observadas em várias regiões do mundo, incluindo países da Europa, Oriente Médio e América do Sul (CACCIÒ, 2018). No Brasil, um estudo envolvendo os moradores de duas comunidades ribeirinhas do rio Tietê, no Estado de São Paulo, *D. fragilis* foi detectada por PCR/sequenciamento em 15,1% das amostras de fezes desses indivíduos (DAVID et al., 2015).

Um recente estudo realizado no Estado de São Paulo, apresentou resultados que corroboram com os resultados deste estudo. Das 156 crianças carentes assintomáticas que frequentavam uma creche, 16 (10,3%) apresentaram diagnóstico molecular (PCR) positivo para *D. fragilis*. (ARBEX-OLIVEIRA et al., 2021).

É importante salientar que a presença de inibidores nas amostras fecais pode interferir na interação do DNA com a DNA polimerase inibindo a reação de amplificação, e com isso, reduzir significativamente a sensibilidade da PCR. Diferentes substâncias presentes nas fezes podem atuar como inibidores e, entre essas substâncias, destacam-se os polissacarídeos complexos, sais biliares, bilirrubina e produtos da degradação de hemoglobina (GONÇALVES et al., 2008). Em se tratando de fezes, além da diversidade de inibidores, a concentração dessas substâncias na amostra varia em função da consistência das fezes, da dieta, da flora intestinal e das condições de saúde do hospedeiro.

Além da presença de inibidores, outros fatores como número de trofozoítos nas fezes, e aspectos relacionados à coleta, conservação e processamento das amostras podem colaborar para a redução da eficiência da PCR.

Outro fator é que, a eliminação das formas parasitárias nas fezes não ocorre de forma contínua e o exame de uma única amostra de fezes pode gerar resultados falso-negativos. (GONÇALVES et al., 2008). Para minimizar a interferência deste fator biológico, recomenda-se o exame de, pelo menos, três amostras de fezes coletadas em dias alternados. Neste estudo, por questões relacionadas ao transporte das amostras, foi possível coletar apenas uma única amostra de fezes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora muitos avanços já tenham sido alcançados em saúde pública no século XXI, as infecções por parasitas intestinais ainda contribuem significativamente para a carga de doenças gastrointestinais em todo o mundo, em particular, nos países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias inadequadas e a indisponibilidade de tratamento eficiente da água favorecem a transmissão desses organismos. Nesses países, os parasitas intestinais são frequentemente ignorados como causa de diarreia e outros transtornos gastrintestinais. Exemplo disso é o que se observa em relação ao diagnóstico do protozoário, *Dientamoeba fragilis*, que normalmente não entram na rotina dos laboratórios clínicos, seja pelo desconhecimento dos profissionais das áreas médica e

laboratorial e/ou pela falta de técnicas adequadas e sensíveis para a identificação em amostras de fezes. Com isso, a prevalência na população ainda é subestimada.

REFERÊNCIAS

Abu-Madi M. et al. Coproscopy and molecular screening for detection of intestinal protozoa. *Parasit Vectors*. 2017 Sep 6;10(1):414.

Anuar T. S. et al. Prevalence of *Dientamoeba fragilis* among an orangasli population in rural malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2015 Sep;46(5):844-9.

Barratt J.L., et al. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes*. 2011; 2(1):3-12.

Burgaña A., et al. Paromomycin is superior to metronidazole in *Dientamoeba fragilis* treatment. *Int. J. Parasitol. Drugs. Drug. Resist*. Dec;11:95-100. 2019

Cacciò S.M. et al. Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18:838–481.

Cacciò S.M. Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis*. *Acta Trop*. 2018 Aug;184:73-77.

Calderaro A., et al. Evaluation of a realtime polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010, 67, 239–245.

David, E.B. et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the state of Sao Paulo, Brazil. *Parasites Vect*. 2015; 8, 103.

eggs. Pathog Dis. 2013; 69(2):157-8.

Fiuza V.R.D.S., et al. Zoonotic Enterocytozoon bienersi genotypes found in Brazilian sheep. Res Vet Sci. 2016 Aug;107:196-201.

Fletcher S.M.; Stark D.; Harkness J.; Ellis J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. Clin Microbiol Rev. 2012; 25 (3):420-49.

Forsell J. et al.. High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. Parasit Vectors. 2016 Jun 29;9(1):370.

Garcia J. A.; Cimerman S. Detection of *Dientamoeba fragilis* in patients with HIV/AIDS by using a simplified iron hematoxylin technique. Rev Soc Bras Med Trop. Mar-Apr;45(2):156-8, 2012.

Gonçalves E.M. et al. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. May-Jun;50(3):165-7, 2008.

Greigert V. et al. Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa. PLoS One. 2018 Oct 10;13(10)

Hakansson E.G. *Dientamoeba fragilis*, a cause of illness: report of a case. Am J Trop Med Hyg 1936; 16:175-8.

Helenbrook W.D. et al. Gastrointestinal parasites of Ecuadorian mantled howler monkeys (*Alouatta palliata aequatorialis*) based on fecal analysis. J Parasitol 101: 341–350, 2015.

Holtman G.A. et al. *Dientamoeba fragilis* colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level. Family Practice; 34, 25–29, 2017.

Inceni, R.N. et al. Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. *Acta Trop*; 167, 64–70, 2017.

Intra J. et al. The importance of considering the neglected intestinal protozoan parasite *Dientamoeba fragilis*. *J Med Microbiol*. Jun;68(6):890-892, 2019.

Jepps M.W., Dobell C. *Dientamoeba fragilis* n.g., n. sp.: a new intestinal amoeba from man. *Parasitology*. 10:352-67; 1918.

Jimenez-Gonzalez D.E. et al. *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol Res*. 2012 Mar;110(3):1269-75.

Johnson E.H.; Windsor J.J.; Clark C.G. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(3):553-70.

Jokelainen P, Hebbelstrup Jensen B, Andreassen BU, Petersen AM, Röser D, Kroghfelt KA, Nielsen HV, Stensvold CR. *Dientamoeba fragilis*, a Commensal in Children in Danish Day Care Centers. *J Clin Microbiol*. 2017 Jun;55(6):1707-1713. doi: 10.1128/JCM.00037-17. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28330885; PMCID: PMC5442526.

Krogsgaard L.R. et al. The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014; 16(14): S1542- 3565.

Lainson R.; da Silva B.A. Intestinal parasites of some diarrhoeic HIV-seropositive individuals in North Brazil, with particular reference to *Isospora belli* Wenyon, 1923 and

Dientamoeba fragilis Jepps & Dobell, 1918. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999 Sep-Oct;94(5):611-3.

Maas L. et al. Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. Eur. Soc. of Cli. Microb. and Infec.s Dis. 2013 20: 545–550.

Maritz J.M.; Land K.M.; Carlton J.M.; Hirt R.P. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? Trends Parasitol. 2014; 30(7):333-41.

Miguel L. et al. Clinical and Epidemiological Characteristics of Patients with *Dientamoeba fragilis* infection. Am J Trop Med Hyg. 2018 Nov;99(5):1170-1173.

Munasinghea V.S. et al. Cyst formation and faecal - oral transmission of *Dientamoeba fragilis* - the missing link in the life cycle of an emerging pathogen. Int J Parasitol. 2013;43(11):879-83.

Ögren J. et al. *Dientamoeba fragilis* DNA detection in *Enterobius vermicularis*

Ögren J. et al. Prevalence of *Dientamoeba fragilis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, and *Cryptosporidium spp* in Da Nang, Vietnam, detected by a multiplex real-time PCR. APMIS; Jun;124(6):529-33, 2016.

Oliveira-Arbex AP, David ÉB, Cacciò SM, Fonseca CRBD, Martin JG, Kurokawa CS, Tosini F, Souza Neto JA, Guimarães S. Prevalence and genetic characterization of *Dientamoeba fragilis* in asymptomatic children attending daycare centers. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2021 May 7;63:e39. doi: 10.1590/S1678-9946202163039. PMID: 33978095; PMCID: PMC8112823.

Osman M. et al. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. PLoSNegl Trop Dis. Apr 15;10(4), 2016.

Röser D et al. *Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2013; 32, 1303–1310. (b)

Röser D. et al. DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. Exp Parasitol. 2013;133(1):57-61. (a)

Sarkari B. et al. Prevalence and risk factors of intestinal protozoan infections: a population-based study in rural areas of Boyer-Ahmad district, Southwestern Iran. BMC Infect Dis. 2016 Nov 25;16(1):703.

Shehata A.I.; Hassanein F. Intestinal parasitic infections among mentally handicapped individuals in Alexandria, Egypt. Ann Parasitol. 2015;61(4):275-81.

Stark D. et al. A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. Am J Trop Med Hyg. 2010; 82(4):614-9.

Stark D. et al. *Dientamoeba fragilis*, the neglected trichomonad of the human bowel. Clin Microbiol Rev 2016; 29:553–580.

Stark D. et al. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. Int. J. Parasitol. 2007; 37:11– 20.

Wong Z.W.; Faulder K.; Robinson J.L. Does *Dientamoeba fragilis* cause diarrhea? A systematic review. Parasitol Res. 2018;117(4):971–980.

Yakoob J. et al. Blastocystis hominis and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. Parasitol Res. 2010; 107(3): 679–84.

