



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SAGRADO CORAÇÃO

ANDRESSA PITAGUARY ZORZETTO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *BLASTOCYSTIS SP.* EM UMA COMUNIDADE QUILOMBOLA DE FILUS, ALAGOAS

BAURU
2022

ANDRESSA PITAGUARY ZORZETTO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *BLASTOCYSTIS SP.* EM
UMA COMUNIDADE QUILOMBOLA DE FILUS, ALAGOAS**

Monografia de Iniciação Científica do UNISAGRADO
(PIVIC, Edital 2021/2022)

Orientadora: Prof^a. Dr^a Érica Boarato David.

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

(Depto. Ciências da Saúde / UNISAGRADO).

BAURU
2022

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

Z83i	Zorzetto, Andressa Pitaguary Identificação molecular de <i>blastocystis SP</i> em uma comunidade quilombola de Filus, Alagoas / Andressa Pitaguary Zorzetto. -- 2022. 18f. : il. Orientadora: Prof. ^a Dra. Érica Boarato David Coorientadora: Prof. ^a M. ^a Thainá Valente Bertozzo Monografia (Iniciação Científica em Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP 1. Blastocystis. 2. transmissão. 3. quilombola. 4. DNA. 5. PCR. I. David, Érica Boarato. II. Bertozzo, Thainá Valente. III. Título.
------	--

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmão, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

As professoras Érica Boarato David e Thainá Valente Bertozzo, por terem sido minha orientadora e coorientadora e terem desempenhado tal função com dedicação e amizade.

Aos professores, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

À instituição Centro Universitário Sagrado Coração, essencial no processo do meu trabalho.

Ao laboratório da Agência Paulista de Tecnologia de Agronegócios – APTA, essencial para a finalização do meu projeto de pesquisa.

RESUMO

Blastocystis sp. é um organismo unicelular, eucarioto, anaeróbico, pertencente ao grupo dos *Stramenopiles*. O gênero *Blastocystis* é considerado polimórfico, uma vez que possui formas distintas encontradas, como a vacuolar, granular, ameboide e cística. Este polimorfismo está relacionado a fatores biológicos e físico-químicos, como o estado metabólico do hospedeiro e mudanças osmóticas. Sua transmissão parece ser por via oral-fecal, sendo a forma cística considerada a principal forma infectante. Os cistos podem ser ingeridos através de água e alimentos contaminados, ou até mesmo através do contato de pessoa a pessoa, como as mãos. A maioria dos indivíduos portadores de *Blastocystis* é assintomática. Quando a infecção é sintomática, há presença de diarreias agudas ou crônicas que podem ser acompanhadas de dores abdominais e flatulência, náuseas e vômitos. Normalmente a infecção é resolvida espontaneamente. Os quadros mais graves e crônicos são frequentemente associados a indivíduos imunocomprometidos. O tratamento da infecção por *Blastocystis* ainda é uma questão complicada, especialmente porque ainda não está bem definido o potencial patogênico desse parasita. Sendo assim, debate-se muito sobre a real necessidade de tratamento. O objetivo deste projeto foi identificar por PCR os isolados de *Blastocystis* sp nas amostras de fezes obtidas em quilombo no estado de Alagoas. Para isso, amostras de fezes congeladas de 84 indivíduos da 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), que já foram processadas em um projeto de pesquisa que tinha como objetivos realizar a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* nesta comunidade, foram submetidas à extração de DNA empregando o kit QIAamp DNA Stool Mini kit® (Qiagen), à amplificação dos isolados de *Blastocystis*, será realizada empregando-se técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Das 84 amostras 49 foram positivas (58,3%) para *Blastocystis*. Nos últimos anos, levantamentos epidemiológicos realizados na América do Sul, inclusive no Brasil, avaliaram a frequência de infecção por este parasita em diferentes grupos populacionais como crianças, população residentes em favelas, comunidades indígenas, comunidades rurais, moradores de aldeias de pescadores e indivíduos atendidos em hospitais. Em todos estes grupos, inclusive no Brasil, *Blastocystis* tem sido diagnosticado com taxas de infecção <15% até 50%, sendo que neste estudo a prevalência foi alta com aproximadamente 58% de indivíduos positivos.

Palavras chaves: *Blastocystis*; transmissão; quilombola; DNA; PCR.

ABSTRACT

Blastocystis sp. is a unicellular, eukaryotic, anaerobic organism, belonging to the group of Stramenopiles. The genus *Blastocystis* is considered polymorphic, since it has different forms found, such as vacuolar, granular, amoeboid and cystic. This polymorphism is related to biological and physicochemical factors, such as the host's metabolic state and osmotic changes. Its transmission seems to be via the fecal-oral route, with the cystic form considered the main infective form. Cysts can be ingested through contaminated food and water, or even through person-to-person contact such as hands. Most individuals carrying *Blastocystis* are asymptomatic. When the infection is symptomatic, there is the presence of acute or chronic diarrhea that can be accompanied by abdominal pain and flatulence, nausea and vomiting. The infection usually resolves spontaneously. The most severe and chronic conditions are often associated with immunocompromised individuals. The treatment of *Blastocystis* infection is still a complicated issue, especially since the pathogenic potential of this parasite is not well defined. Therefore, there is a lot of debate about the real need for treatment. The objective of this project was to identify by PCR the isolates of *Blastocystis sp.* in stool samples obtained from quilombos in the state of Alagoas. For this, frozen feces samples from 84 individuals from the Filus quilombola community, located between the municipalities of União dos Palmares and Santana do Mundaú (105 km from Maceió), Zona da Mata de Alagoas (CAAE: 78560617.4.0000.5502), which have already been processed in a research project that aimed to carry out the research of *Schistosoma mansoni* eggs in this community, were submitted to DNA extraction using the QIAamp DNA Stool Mini kit® (Qiagen), the amplification of the *Blastocystis* isolates will be carried out using *Polymerase Chain Reaction (PCR)* based techniques are used. Of the 84 samples, 49 were positive (58.3%) for *Blastocystis*. In recent years, epidemiological surveys carried out in South America, including Brazil, have evaluated the frequency of infection by this parasite in different population groups, such as children, population living in slums, indigenous communities, rural communities, residents of fishing villages and individuals assisted in hospitals. In all these groups, including Brazil, *Blastocystis* has been diagnosed with infection rates <15% to 50%, and in this study the prevalence was high with approximately 58% of positive individuals.

Key words: *Blastocystis*; streaming; quilombola; DNA; PCR.

Sumário

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	3
2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	4
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA	4
2.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE <i>BLASTOCYSTIS SP.</i>.....	4
3. RESULTADOS.....	5
4. DISCUSSÃO.....	6
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	8
REFERÊNCIAS	9

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Blastocystis sp. é um organismo unicelular, eucarioto, anaeróbico, pertencente ao grupo dos Stramenopiles. O gênero foi criado por Alexeieff em 1911, sob a denominação *Blastocystis enterocola*, mas foi modificado em 1912 por Brumpt, que atribuiu o nome *Blastocystis hominis* aos organismos isolados em fezes. No entanto, ainda hoje, a identificação do organismo em nível de espécie ainda é um desafio não resolvido, sendo que estudos filogenéticos recentes indicam a limitação do nome apenas à *Blastocystis*, devido à grande diversidade genética revelada no gênero (STENSVOLD et al., 2007).

Ao longo da sua história taxonômica, este organismo foi classificado erroneamente durante anos como a forma cística do protozoário *Trichomonas* spp ou como um fungo ou um esporozoário, até que depois de muitos anos foi colocado entre os Stramenopiles, um dos maiores grupos dos eucariotas (STENSVOLD; CLARK, 2016).

O gênero *Blastocystis* é considerado polimórfico, uma vez que possui formas distintas encontradas, como a vacuolar, granular, ameboide e cística. Este polimorfismo está relacionado a fatores biológicos e físico-químicos, como o estado metabólico do hospedeiro e mudanças osmóticas (STENZEL E BOREHAM, 1996). Sua transmissão parece ser por via oral-fecal, sendo a forma cística considerada a principal forma infectante. Os cistos podem ser ingeridos através de água e alimentos contaminados, ou até mesmo através do contato de pessoa a pessoa, como as mãos. Seu ciclo evolutivo não está elucidado, entretanto considera-se o mecanismo de divisão binária o mais provável (PARIJA E JEREMIAH, 2013; STENSVOLD et. al., 2007).

Quanto ao ciclo de vida (Figura 1), *Blastocystis* sp. infecta o hospedeiro a partir da ingestão da forma cística, que se rompe no trato digestivo, perdendo sua camada fibrilar e eliminando formas vacuolares. Após isso, essas formas podem se auto- multiplicar ou se transformar em novas formas: ameboides ou multivacuolares. As formas ameboides passam por esquizogonia e se desenvolvem em pré-cistos de camada grossa, que serão eliminados nas fezes. Já as formas multivacuolares passam por esquizogonia e se desenvolvem em pré-cistos de camada fina, mantendo a autoinfecção no hospedeiro (TAN, 2008).

A maioria dos indivíduos portadores de *Blastocystis* é assintomática. Quando a infecção é sintomática, há presença de diarreias agudas ou crônicas que podem ser acompanhadas de dores abdominais e flatulência, náuseas e vômitos. Normalmente a infecção é resolvida espontaneamente. Os quadros mais graves e crônicos são frequentemente associados a indivíduos imunocomprometidos. Estudos recentes estão relacionados à ocorrência de *Blastocystis* em indivíduos que possuem a síndrome do intestino irritável (SII), posto que a

mudança na microbiota intestinal em indivíduos portadores da síndrome poderia proporcionar condições favoráveis à colonização do protozoário (POIRIER et. al., 2012).

O tratamento da infecção por *Blastocystis* ainda é uma questão complicada, especialmente porque ainda não está bem definido o potencial patogênico desse parasita. Sendo assim, debate-se muito sobre a real necessidade de tratamento. Em um paciente sintomático, o isolamento de cistos nas amostras de fezes deve desencadear uma avaliação completa de outras causas das queixas gastrointestinais do paciente, dada a possibilidade de coinfeção com outros patógenos. Pacientes com *Blastocystis* isolados nas fezes podem estar parasitados com outros patógenos, como *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* e *D. fragilis* (COYLE et al.,2012). É bem possível que os pacientes que respondem ao tratamento para *Blastocystis* com metronidazol ou sulfametoxazol - trimetoprima (SMX - TMP) possam realmente ter melhora clínica devido ao tratamento de um patógeno secundário. (BASYONI et al., 2018).

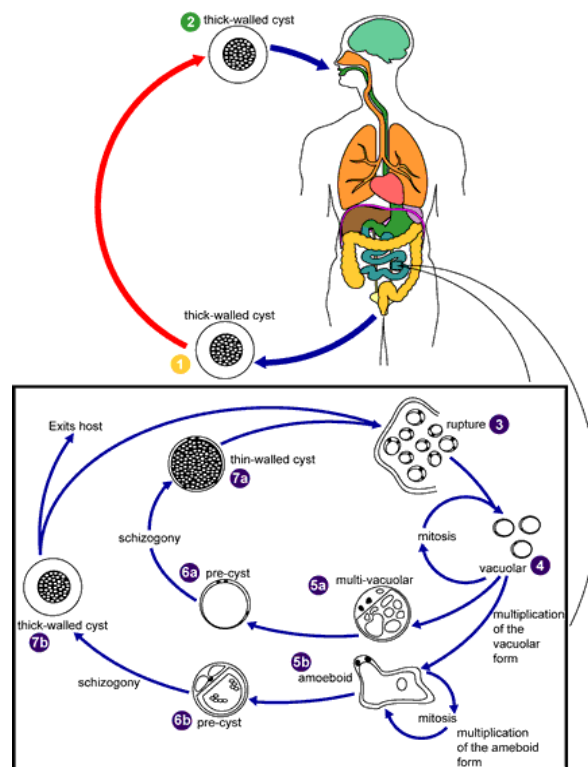


Figura 1. Ciclo biológico de *Blastocystis* sp. Cisto de parede grossa ingerido pelo hospedeiro (1 e 2), posterior ruptura do cisto (3) e liberação da forma vacuolar (4). Multiplicação da forma vacuolar através da mitose (4). Diferenciação em forma multivacuolar (5a) que dará origem à um pré-cisto (6a) que por esquizogonia se transformará em cisto de parede fina (7a). Diferenciação em forma ameboide (5b) que pode se multiplicar por mitose ou gerar novos pré-

cistos (6b) que por esquizogonia se transformarão em cistos de parede grossa (7b), eliminados nas fezes e reiniciando o ciclo. FONTE: CDC (www.cdpx.cdc.gov/html).

A distribuição geográfica de *Blastocystis* ainda é pouco conhecida, mas os estudos têm revelado uma ampla distribuição em todo o mundo, com prevalências altas, alcançando 62% de infecção. Nos países desenvolvidos, essas taxas geralmente são inferiores, podendo variar de aproximadamente 1% a 20%, como por exemplo, 0,5% no Japão a mais de 20% nos Estados Unidos. (CLARK et al., 2013). Nos últimos anos, levantamentos epidemiológicos realizados na América do Sul, inclusive no Brasil, avaliaram a frequência de infecção por este parasita em diferentes grupos populacionais como crianças (DIB et al., 2015; REBOLLA et al., 2016; RAMIREZ et al., 2017; SANCHEZ et al., 2017), população residentes em favelas. (FARIA et al., 2017; GIL et al., 2013), comunidades indígenas (MALHEIROS et al., 2011; SANCHEZ et al., 2017), comunidades rurais (INCANI et al., 2017; MACCHIONI et al., 2016; MACHICADO et al., 2012), moradores de aldeias de pescadores (DAVID et al., 2015) e indivíduos atendidos em hospitais (CASERO et al., 2015; MELO et al., 2017). Em todos estes grupos, inclusive no Brasil, *Blastocystis* tem sido diagnosticado com taxas de infecção <15% até 50%.

Com relação a prevalência de *Blastocystis* spp em comunidades quilombolas, não há estudos que mostrem a real frequência desse protozoário nessa população. Sendo assim, o conhecimento sobre aspectos como prevalência, e os possíveis fatores de risco além das condições ambientais envolvidas na exposição ao parasita é uma questão extrema relevância.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 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.

É importante salientar que esta comunidade quilombola reúne aproximadamente 30 famílias que vivem à margem dos direitos sociais e de cidadania. A principal atividade econômica dos moradores é plantio de banana, porém a maioria das famílias dependem de subsídios do governo federal como o bolsa família. No que se refere a infraestrutura, as famílias não dispõem de serviços públicos básicos, como: vias públicas, fornecimento de água e luz, saneamento básico, educação e saúde. As condições de moradia são também são precárias, pois a comunidade vive em casas improvisadas com cobertura de madeira e plástico ou em pequenas casas de alvenaria e/ou madeira. Como os serviços públicos de água, não estão presentes, os moradores utilizam a água do açude mais próximo (aproximadamente 200 metros das casas) para tomar banho, lavar roupa e também para lazer, principalmente das crianças. Já a água utilizada pela comunidade para beber e cozinhar é proveniente de uma cacimba, sendo que a quantidade de água, na maioria das vezes, é insuficiente para atender as necessidades das famílias.

2.2 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 do uso.

2.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *BLASTOCYSTIS SP.*

Foi realizada a amplificação dos isolados de *Blastocystis*, empregando-se técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) (Quadro 1). Assim, para os isolados de *Blastocystis* são utilizados primers para a amplificação de fragmentos de DNA do gene SSUrDNA (600 pb), de acordo com o protocolo proposto por Scicluna et al. (2006). Além disso, em todas as baterias de reações foram adicionadas amostras-controle, positiva e negativa. Para controle de contaminação, em cada bateria de reações foi 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 será feita 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 *Blastocystis* spp.

Parasita	Gene	Primer (Referência)	Sequência dos primers	Ciclos
<i>Blastocystis</i>	SSUr DNA	BL18SF1	5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA-3'	94°C - 3 min
		BL18SR1	5'-GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3'	94°C - 30 seg*
	600 pb			55°C - 30 seg*
				72°C - 60 seg*
		(Scicluna, et al 2006)		40 ciclos*
				72°C - 7 min

3 RESULTADOS

Foram realizadas a extração de DNA de todas as 84 amostras de fezes congeladas, empregando o kit QIAamp DNA Stool Mini kit® (Qiagen) de acordo com as recomendações dos fabricantes. Após a extração de DNA, as amostras extraídas foram congeladas e mantidas em freezer a -20°C para a amplificação do gene SSUrDNA de *Blastocystis* sp. As amplificações do DNA genômico para *Blastocystis* sp. foram realizadas, na qual foram amplificadas 84 amostras e 49 dessas amostras foram positivas (58,33%) para isolados de *Blastocystis* sp (Figuras 1, 2, 3 e 4); sendo elas, as amostras: 11, 26, 29, 30, 51, 52, 58, 59, 63, 73, 83, 90, 99, 103, 106, 115, 119, 128, 131, 135, 140, 142, 145, 147, 148, 151, 153, 155, 156, 168, 169, 176, 178, 186, 188, 192, 194, 195, 197, 198, 199, 203, 207, 208, 211, 212, 213, 215 e 218.

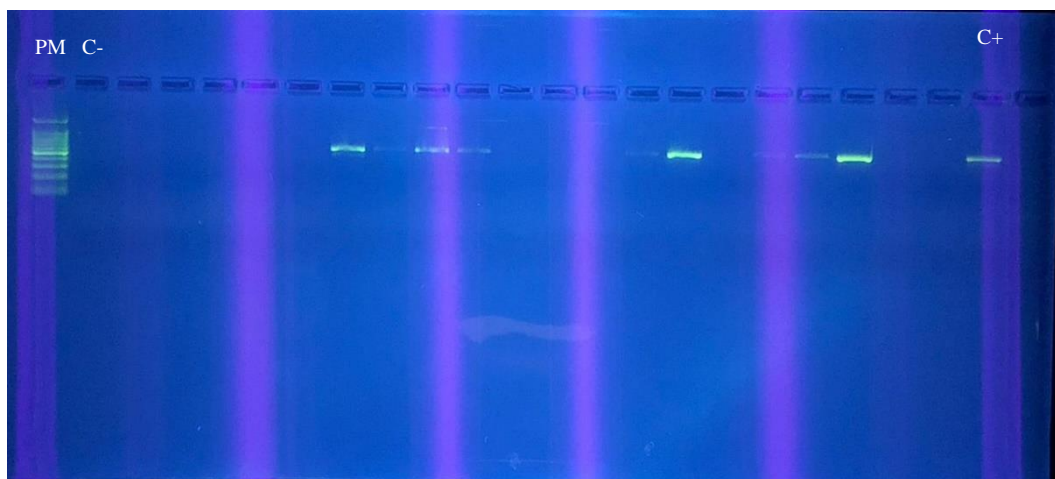


Figura 1 Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Blastocystis* spp correspondente ao gene SSUrDNA (600pb). **PM** (padrão de peso molecular. **C** - Controle negativo. **C +** - Controle positivo (amostra positiva para *Blastocystis* sequenciada). Amostras de fezes positivas (11 a 63).



Figura 2 Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Blastocystis* spp correspondente ao gene SSUrDNA (600pb). **PM** (padrão de peso molecular. **C** - Controle negativo. **C +** - Controle positivo (amostra positiva para *Blastocystis* sequenciada). Amostras de fezes positivas (73 a 119).



Figura 3 Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Blastocystis* spp correspondente ao gene SSUrDNA (600pb). **PM** (padrão de peso molecular. **C** - Controle negativo. **C +** - Controle positivo (amostra positiva para *Blastocystis* sequenciada). Amostras de fezes positivas (128 a 207).

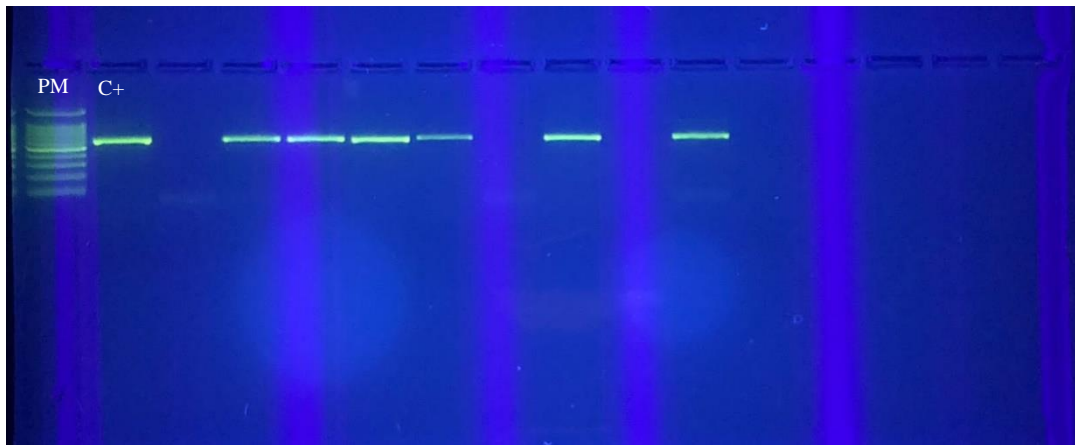


Figura 4 Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Blastocystis* spp correspondente ao gene *SSUrDNA* (600pb). **PM** (padrão de peso molecular. **C** - Controle negativo. **C+** - Controle positivo (amostra positiva para *Blastocystis* sequenciada). Amostras de fezes positivas (208 a 218).

4 DISCUSSÃO

As parasitoses intestinais apresentam frequências elevadas em países em desenvolvimento, como o Brasil, ocorrendo variações quanto à região de cada país, sendo influenciada pelas condições de saneamento básico, nível socioeconômico, graus de escolaridade, idade e os hábitos de higiene dos indivíduos (MACHADO *et al.* 1999, SILVA-NETO *et al.* 2010, ZANETTI *et al.* 2020).

A diferença entre os índices de prevalência de *Blastocystis* sp. nas diversas populações estudadas pelo mundo, e que estas diferenças tão grandes de uma região para outra sem dúvida obedecem a fatores geográficos e a fatores dependentes do parasita que ainda não se conhece (DEVERA 1998, MARTINS *et al.* 2007, INABA *et al.* 2016). Estudos demonstram que fatores ambientais como condições climáticas podem estar relacionadas a ocorrência de *Blastocystis* sp., principalmente durante o tempo quente (MASRY *et al.* 1990, VISSER *et al.* 2011).

Nesse estudo, foi observado uma alta prevalência (58,3%) de *Blastocystis* pelo exame da PCR. Recentemente uma revisão sistemática sobre a ocorrência desse protozoário no Brasil, demonstrou que a prevalência combinada na população brasileira geral é de 24%. Sendo que as maiores taxas foram encontradas nos estados de Mato Grosso do Sul (41,0%) e São Paulo (33,0%) (ZANETTI *et al.* 2020).

A análise evidenciou que *Blastocystis* sp. circula na população com moderada frequência, reforçando, desta maneira, a importância do diagnóstico deste parasita de modo que evite a emissão errônea de laudos parasitários. Além disso, por se tratar de uma doença parasitária de

veiculação fecal-oral, reforça-se a importância de medidas de educação para a saúde com ênfase em higiene das mãos e alimentos. (BARBOSA, 2018; EYMAE et al., 2010)

Vale destacar que a prevalência deste protozoário é subestimada no nosso país, já que as técnicas amplamente utilizadas em laboratórios clínicos, como os métodos de flutuação com sulfato de zinco ou sedimentação espontânea com água não são muito eficientes para o seu diagnóstico, pois o contato com o sulfato de zinco e com a água, causa lise do parasita presente em amostras de fezes frescas, como a maioria recebida nos laboratórios para análise (AMATONETO et al., 2009). Como esse parasita é polimórfico e diferentes formas podem ser detectadas nas fezes, a inexperiência técnica também pode comprometer o diagnóstico preciso das infecções.

Diante disso, por ser transmitido por via fecal-oral, tanto por contato direto quanto indiretamente por meio de água e alimentos contaminados por fezes dos indivíduos infectados, torna-se importante conhecer a distribuição do *Blastocystis* sp. para adotar estratégias de possível controle na população.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho possibilitou um maior conhecimento acerca da realidade quilombola quanto a infecção por *Blastocystis* sp., embora este parasita ainda mantenha vários aspectos relativos à sua epidemiologia controversos e a quantidade de estudos ainda permaneça insuficiente. Ressalta-se, ainda, a grande relevância observar que o clima quente, bem como as interações entre os animais e humanos podem de fato contribuir para as altas taxas de positividade como foi detectada na população de estudo.

Diante dos resultados obtidos, estudos mais específicos acerca deste protozoário tornam-se necessários, a fim de se promover o conhecimento científico e auxiliar no preenchimento das lacunas ainda existentes bem como a inclusão da pesquisa para *Blastocystis* sp. na rotina diagnóstica dos exames laboratoriais, maior conhecimento acerca de sua epidemiologia, distribuição, sintomatologia bem como melhor padronização terapêutica adequada.

REFERÊNCIAS

- Barbosa, Carolina Valença. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE Blastocystis sp. DE ORIGEM HUMANA E ANIMAL**. Orientador: Dra. Claudia Masini d'Avila Levy. 2018. 84 f. Tese (Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular) - INSTITUTO OSWALDO CRUZ, Rio Grande do Sul, 2018.
- Basyoni M.M.A., et al. *Atorvastatin: In-Vivo Synergy with Metronidazole as Anti Blastocystis Therapy*. **Korean J Parasitol**. Apr; 56(2):105-112, 2018.
- Casero, R.; Mongi, F.; Sánchez, A.; Ramírez, J.D. *Blastocystis and urticaria: examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation*. **Acta Trop**. 2015. 126, 12–16.
- Clark, C.G., Van der Giezen, M., Alfellani, M.A., Stensvold, C.R. *Recent developments in Blastocystis research*. **Adv. Parasitol**. 2013; 82, 1–32.
- Coyle C.M., et al. *Blastocystis: to treat or not to treat...* **Clin Infect Dis**. Jan 1;54(1):105-10, 2012.
- 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.
- Devera, RA. 1998. *Blastocystis hominis: o enigma continua*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 31(5):491-493.
- Dib, J.R. et al. *Prevalence of intestinal parasitic infection among children from a shanty town in Tucuman, Argentina*. **Trop. Biomed**. 2015; 32, 210–215.
- Eymae, Dayane et al. *Padronização do diagnóstico de Blastocystis hominis por diferentes técnicas de coloração: Standardization of Blastocystis hominis diagnosis using different staining techniques*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio Grande do Sul, v. 43, ed. 3, p. 309-312, 12 abr. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/BfHLp9JtJQCQKxsftNLJBWh/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 13 set. 2022.
- Faria, C.P., Zanini et al. *Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants*. **PLoS Negl. Trop**. Dis. 11, 2017.
- Gil, F.F., et al. *High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group*. **Pathog. Glob. Health**, 2013; 107, 320–324.
- Inaba MHM, Oliveira CS, Seo NM, Chiu WC, Takizawa MGMH. 2016. Identificação de *Blastocystis hominis* em amostras coletadas em bairros da região oeste de Cascavel-PR. **Revista Varia Scientia**, 2 (1): 16-22.
- 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.

- Macchioni, F. *et al.* *Intestinal parasitic infections and associated epidemiological drivers in two rural communities of the Bolivian Chaco.* **J. Infect. Dev. Ctries.** 2016; 10, 1012–1019.
- Machado, RC, Marcari EL, Cristante SFV, Carareto CMA. 1999. Giardíase e Helmintíases em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32 (5): 697-704.
- Malheiros, A.F., *et al.* *Short report: molecular characterization of Blastocystis obtained from members of the indigenous Tapirape ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil.* **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2011; 85, 1050–1053.
- Masry NA, Bassily S, Farid Z, Aziz AG. 1990. *Potential clinical significance of Blastocystis hominis in Egypt.* **R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 84:695.
- Martins LPA, Serapião AATB, Valenciano RF, Pires JEE, Castanho REP. 2007. Frequência de *Blastocystis hominis* e outras enteroparasitoses em amostras fecais analisadas no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Marília-SP. **Revista de Parasitologia Tropical**, 36 (1): 47-53.
- Melo, G.B., *et al.* *Identification of Blastocystis subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil.* **Parasitol. Open.** 2017.
- Parija S.C., Jeremiah S. *Blastocystis: Taxonomy, biology and virulence.* **Trop Parasitol.** 2013; 3(1):17-25.
- Poirier P, *et al.* *New insights into Blastocystis spp.: a potential link with irritable bowel syndrome.* **PLoS Pathog.** 2012; 8(3).
- Ramirez, J.D. *et al.* *Blastocystis subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia.* **PLoS One** 2017; 12.
- Rebolla, M.F. *et al.* *High prevalence of Blastocystis spp. infection in children and staff members attending public urban schools in São Paulo State, Brazil.* **Rev. Inst. Med. Trop.** 2016; Sao Paulo 58, 31.
- Sánchez, A. *et al.* *Molecular epidemiology of Giardia, Blastocystis and Cryptosporidium among indigenous children from the Colombian Amazon Basin.* **Front. Microbiol.** 2017; 8, 248.
- Scicluna S. M., Tawari B., Clark C. G. *DNA barcoding of blastocystis.* **Protist.** 2006 Feb;157(1):77-85, 2006.
- Silva AA. 2006. Incidência de *Blastocystis hominis* na População da Cidade do Rio de Janeiro, **R J. News Lab**, 76: 86-96.
- Stensvold C. R. *et al.* *Detecting Blastocystis using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study.* **Diagn Microbiol Infect Dis.** Nov; 59 (3):303-7, 2007.
- Stenzel D.J.; Boreham P.F. *Blastocystis hominis revisited.* **Clin Microbiol Rev.** 1996; 9(4):563-84.

Tan K.S. *New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp.* **Clin Microbiol Rev.** 2008 Oct;21(4):639-65.

Visser S, Giatti LL, Carvalho RAC, Guerreiro JCH. 2011. Estudo da associação entre fatores socioambientais e prevalência de parasitose intestinal em área periférica da cidade de Manaus (AM, Brasil). **Cienc Saúde Coletiva**, 16(8):3481-92.

Zanetti AS, Malheiros AF, Matos TA, Longhi FG, Moreira LM, Silva SL, Castrillon SKI, Ferreira SMB, Ignotti E, Espinosa OA. 2020. *Prevalence of Blastocystis sp. Infection in several hosts in Brazil: a systematic review and meta-analysis.* **Parasites Vectors**, 13:30 <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3900-2>.