

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

THAÍS TÂMARA CASTRO E SOUZA MINUZZI

Identificação fenotípica de *Dientamoeba fragilis* (Jepps & Dobell, 1918) e *Blastocystis hominis* (Brumpt, 1912) em pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília: Caracterização molecular preliminar de isolados diagnosticados.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: **César Augusto Cuba Cuba**

Brasília

2010

Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi

Identificação fenotípica de *Dientamoeba fragilis* (Jepps & Dobell, 1918) e *Blastocystis hominis* (Brumpt, 1912) em pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília: Caracterização molecular preliminar de isolados diagnosticados.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 22 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Dr. César Augusto Cuba Cuba (presidente)
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Dr. Gustavo Sierra Romera
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Dr. Rodrigo Gurgel
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Dr. Albino Verçosa Magalhães
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho ao meu **marido** e à minha **filha**.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido pela ajuda maravilhosa que me deu neste mestrado. Agradeço por estar sempre presente e lutando sempre pelos meus ideais.

Agradeço à minha pequena **Larissa** que, apesar de ser tão novinha, me acompanhou na realização dos experimentos, sempre chutando minha barriga quando estes davam certo.

À minha família, principalmente, ao meu pai e minha mãe, pelo apoio e carinho.

Ao Professor Cuba pela oportunidade de aprofundar e aprimorar meus conhecimentos.

Ao Professor Renato por possibilitar a realização da análise molecular.

À amiga Yandra pela maravilhosa ajuda nos experimentos.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório: Daniella Barreto, Daniella Souza e Rodrigo Gurgel.

Agradeço, ainda, ao técnico laboratorial Edson por viabilizar este estudo.

EPÍGRAFE

*“ Fazemos a Ciência com fatos, como fazemos
uma casa com pedras mas a acumulação de
fatos não é Ciência, assim como um monte de
pedras não é uma casa” (Poincaré)*

RESUMO EM LÍNGUA PORTUGUESA

Dientamoeba fragilis e *Blastocystis hominis* são parasitos do trato gastrointestinal de humanos que podem estar associados a infecções intestinais e diarreias, sendo, porém, negligenciados nos testes de diagnóstico hospitalar. 158 amostras fecais foram coletadas de pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília (HUB), durante o período de maio de 2008 a janeiro de 2009, com objetivo de identificar os protozoários parasitos com ênfases em *D. fragilis* e *B. hominis*. As amostras coletadas foram fixadas diretamente em SAF (acetato de sódio, ácido acético e formol) para a realização de exames coprológicos, auxiliados com técnicas de concentração, de preparação de lâminas permanentes coradas com Hematoxilina Férrica e biometria de trofozoítos de *D. fragilis* e cistos e trofozoítos de *B. hominis*. Estas amostras foram coletadas e sedimentadas frescas para realizar a amplificação do DNA de *D. fragilis* e *B. hominis* por intermédio da PCR (Polymerase Chain Reaction). Das 158 amostras fecais coletadas, 69% são pacientes do sexo feminino e 31% são pacientes do sexo masculino. Destas, 56,3% das amostras fecais (n = 89) foram positivas para algum parasito intestinal, sendo que 28 amostras foram positivas para *D. fragilis* e 44 para *B. hominis*. Houve poliparasitismo em 46 amostras sendo que ocorreu associação *D. fragilis* e *B. hominis* em 8 amostras. Com base na ferramenta molecular, a PCR foi otimizada com sucesso somente para *B. hominis*. Estudos moleculares confirmaram a presença do *B. hominis* em 6 de 8 amostras positivas em microscopia de luz e em 2 dos 5 amostras negativas. Esses resultados confirmam uma elevada frequência destes protozoários intestinais na população ambulatorial selecionada e podem ser justificados pelos métodos de diagnósticos utilizados que raramente são seguidos em laboratórios de diagnóstico clínico.

RESUMO EM LÍNGUA INGLESA

Dientamoeba fragilis and *Blastocystis hominis* are parasites of the gastrointestinal tract of humans that may be associated with intestinal infections and diarrhea, but are neglected in hospital diagnostic tests. 158 fecal samples were collected from patients attending the ambulatory service of the University of Brasilia (HUB) teaching hospital in Brasilia, Federal District, Brazil. During the period May 2008 to January 2009 aiming to identify the protozoan parasites with emphasis on *D. fragilis* and *B. hominis*. Samples were collected directly into sodium acetate–acetic acid–formalin (SAF) and also as unfixed specimens, during a period of may 2008 and january 2009. Stool tests, helped with concentration techniques, preparation of permanent slides stained with hematoxylin and biometry of trophozoites of *D. fragilis* and cysts and trophozoites of *B. hominis*, were performed for phenotypic characterization. The PCR (*Polymerase Chain Reaction*) was used with specific primers and optimized successfully only for *B. hominis*. Of the 158 fecal samples collected, 69% were female and 31% male. Of these, 56.3% of samples (n = 89) were positive for some intestinal parasite, and 28 samples were positive for *D. fragilis* and 44 for *B. hominis*. From 46 individuals an association of *D. fragilis* and *B. hominis* were identified in 8 patients. Molecular studies confirmed the presence of *B. hominis* in 6 of 8 positive samples in light microscopy and in 2 of 5 negative samples. These results confirm a high frequency of these protozoans in outpatient population selected and can be justified by the diagnostic methods used which are rarely followed in clinical diagnostic laboratories.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

1- Ciclo biológico de <i>D. fragilis</i> .	16
2- Proposta do ciclo biológico de <i>B. hominis</i> .	23
3- Frequência das espécies de protozoários encontradas nas amostras fecais em pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília.	33
4- Frequência das idades encontradas nas amostras fecais de pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília.	35
5- Frequência do maior e menor diâmetro das formas encontradas de <i>D. fragilis</i> .	36
6- Caracterização morfológica de <i>D. fragilis</i> em lâminas, com coloração de Hematoxilina férrica, visualizadas em microscópio óptico em aumento 1000X. Em A: Formas arredondadas e alongadas com dois núcleos; B: Forma arredondada com dois núcleos permitindo observar os grânulos nucleares; C: Forma arredondada com apenas um núcleo; D: Forma alongada e amebóide com dois núcleos bem corados.	36
7- Frequência do maior e menor diâmetro das formas encontradas de <i>B. hominis</i> .	37
8- Caracterização morfológica de <i>B. hominis</i> em lâminas, com coloração de Hematoxilina férrica, visualizadas em microscópio óptico com aumento 1000X. Em A e B: Forma vacuolar com dois núcleos e vacúolo sem granulações; C: Forma vacuolar com quatro núcleos e vacúolo sem granulações; D: Forma vacuolar com dois núcleos e vacúolo sem granulações.	38

9- Gel de agarose 1% das 8 amostras positivas em lâminas coradas 39
com Hematoxilina férrica para *D. fragilis*. M: Marcador molecular
(Kb⁺); 1-7 e 9: amostras positivas em lâminas; 8: Controle Positivo
cedido pelo C. Graham Clark, banda diagnóstica de 412pb; 10:
Controle negativo.

10- Gel de agarose 1 % das 8 amostras positivas em lâminas para 39
B. hominis. M: Marcador molecular (Kb⁺); 1-8: amostra positivas em
lâminas; 9: Controle negativo.

11- Caracterização molecular das 5 amostras negativas em lâminas 40
coradas com Hematoxilina férrica para *B. hominis*. M: Marcador
molecular (Kb⁺); 1-5: amostras negativas em lâminas; 6: Controle
negativo.

LISTA DE TABELAS

TABELAS

- | | |
|--|----|
| 1- Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para amplificar a região de genes <i>Trichomonadidae</i> do rRNA subunidade 16S em <i>D. fragilis</i> . | 30 |
| 2- Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para amplificar a região de genes do rRNA subunidade 16S do gene de <i>Blastocystis</i> . | 31 |
| 3- Relação das 158 amostras coletas com o sexo e o parasitismo | 32 |
| 4- Relação das 89 amostras positivas com sexo, monoparasitismo e poliparasitismo. | 32 |
| 5- Relação entre o sexo e o parasitismo por <i>B. hominis</i> e <i>D. fragilis</i> . | 33 |
| 6- Associações de parasitoses nas 46 amostras em que se verificou a ocorrência de poliparasitismo. | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius;
%	Por cento;
=	Igual;
µl	Microlitro;
µm	Micrômetros;
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albumina de soro bovino;
CB	<i>Central Body</i> - Corpo Central;
CE	Estado do Ceará;
DF	Distrito Federal;
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - <i>Ácido desoxirribonucleico (ADN)</i> ;
et al.	et alli, e outros (citações);
g	Grama;
HUB	Hospital Universitário de Brasília;
IBS	<i>Irritable Bowel Syndrome</i> - Síndrome do Intestino Irritado;
Kb⁺	Marcador molecular Kb plus;
MIF;	Merthiolate, Iodo e Formol;
mL	Mililitro;
pb	pares de bases;
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação de polimerase em cadeia;
PE	Estado de Pernambuco;
PVA	Álcool polivinílico;
rpm	Rotação por minuto;
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> - <i>Ácido Ribonucleico Ribossomal (rARN)</i> ;

- SAF** Acetato de Sódio, Ácido Acético e Formol;
- SPSS** Statistical Package for the Social Sciences - pacote estatístico para as ciências sociais;
- TBE** Tris, Borato e EDTA;
- TCLE** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- TE** Tris e EDTA;
- UnB** Universidade de Brasília.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Dientamoeba fragilis</i>	14
1.2 <i>Blastocystis hominis</i>	19
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MÉTODOS	27
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS	27
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	27
3.3 LAVAGEM E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS EM LÂMINAS	27
3.4 MÉTODO DE COLORAÇÃO DAS LÂMINAS COM HEMATOXILINA FÉRRICA	28
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA	29
3.6 AMPLIFICAÇÃO DO DNA	29
4 RESULTADOS	32
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PARASITISMO	32
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE <i>Dientamoeba fragilis</i>	35
4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE <i>Blastocystis hominis</i>	37
4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Dientamoeba fragilis</i>	38
4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Blastocystis hominis</i>	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	46
7 REFERÊNCIAS	48
8 APÊNDICE	55
9 ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA	77
10 ANEXO B – TCLE	78

Nome do arquivo: monografia thaís 1º parte versão final
Pasta: E:\MESTRADO MONO\versão final
Modelo: C:\Documents and Settings\Rodrigo\Dados de aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dot
Título: UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Assunto:
Autor: teste
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 5/3/2010 10:46:00
Número de alterações:7
Última gravação: 11/3/2010 09:47:00
Salvo por: Rodrigo
Tempo total de edição: 9 Minutos
Última impressão: 11/3/2010 09:58:00
Como a última impressão
Número de páginas: 13
Número de palavras: 1.723 (aprox.)
Número de caracteres: 9.305 (aprox.)

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Dientamoeba fragilis*

Dientamoeba fragilis é um protozoário parasito do trato gastrointestinal de humanos que pode estar associado a infecções intestinais e diarreias (Stark *et al.*, 2005a), além de ser um agente causador de enterite severa em pessoas imunossuprimidas (especialmente em HIV/AIDS positivos) (Lainson e Silva, 1999). *Dientamoeba fragilis* foi visto pela primeira vez por Wenyon, em 1909, mas somente foi descrito e catalogado por Jepps e Dobell, em 1918, quando foi considerado uma nova espécie.

O nome *Dientamoeba fragilis* refere ao fato de este protozoário, originalmente, ser considerado uma ameba. Porém, diferente das outras amebas, *D. fragilis* não apresenta estágio de cisto e sim estágio de trofozoíto no seu ciclo de vida (Yang e Scholten, 1977). Este protozoário apresenta dois núcleos e tem tendência a uma rápida degeneração após a liberação em fezes (Johnson *et al.*, 2004).

Estudos recentes baseados na sequência de genes do rRNA, pequena subunidade (16-S), sugeriram que *D. fragilis* possui uma afinidade filogenética maior no grupo dos protozoários flagelados que com grupos das amebas (Mengui *et al.*, 2006), especialmente com os gêneros *Histomonas* e *Trichomonas*. Portanto, é classificado como um flagelado (Yang e Scholten, 1977; Norberg *et al.*, 2003).

Entre estes dois gêneros, *D. fragilis* apresenta uma relação bem próxima e mais específica como grupo *Histomonas*. Análises filogenéticas determinaram uma relação estreita entre *D. fragilis* e *Histomonas meleagridis*, o que mostra que ambos os organismos compartilham um recente e comum ancestral (Stark *et al.*, 2006b).

Atualmente, *D. fragilis* pertence ao filo Parabasalia, classe Trichomonadea, família Trichomonadidae e possivelmente a subfamília Tritrichomonadinae. Esta classificação pode mudar por causa da grande afinidade com o gênero *Histomonas* (Johnson *et al.*, 2004).

O *D. fragilis* apresenta a forma de trofozoíto polimórfico com tamanho entre 3,5 (Johnson *et al.*, 2004) a 20 µm, mais frequentemente entre 5 a 15 µm (Stark *et*

al., 2006b). Os trofozoítos de *D. fragilis* são em sua maioria binucleares. No entanto, cerca de 30 a 40% são mononucleados (Menghi *et al.*, 2005). Os trofozoítos mononucleados são encontrados quando sofrem processo de divisão ou fissão binária (Johnson *et al.*, 2004).

O núcleo apresenta um diâmetro de 1 a 2,5 µm (Lainson e Silva, 1999), no qual a cromatina se condensa em grupos de 3 a 8 grânulos, sendo observados em alguns casos, núcleos com maiores agrupamentos. No núcleo não se observa cromatina periférica (Neves, 2000). O citoplasma de *D. fragilis* é granular e pode ser vacuolado. Estes vacúolos podem conter alimentos como bactérias e células vermelhas do sangue (Hotez, 2000) ou detritos (Stark *et al.*, 2006b).

Com relação a sua patogenicidade, apesar de este protozoário já ter sido considerado um organismo comensal não patogênico, há estudos com inúmeros casos de pessoas infectadas por *D. fragilis* apresentando sintomas (Chan *et al.*, 1993). Hoje, considera-se que *D. fragilis* seja patogênico (Lagacé-Wiens *et al.*, 2006), porém o indivíduo contaminado pode ou não apresentar sintomas durante a infecção.

Johnson e Clark (2000) em um estudo de análise baseado na sequência de genes do rRNA, pequena subunidade (16-S), verificaram a existência de grupos geneticamente distintos de *D. fragilis*. Esta variabilidade genética também é vista em outros grupos da subreino Protozoa, incluindo espécies de *Entamoeba*, *Cryptosporidium parvum* e *Blastocystis hominis*, sem variação na forma morfológica destes protozoários. É aceito, portanto, que ocorra a possibilidade da existência de dois ou mais organismos distintos chamados de *D. fragilis*, sendo que apenas um deste organismo seja patogênico (Johnson e Clark, 2004).

Os principais sintomas causados pelo *D. fragilis* são diarreia, dor abdominal, fadiga, flatulência, vômitos, anorexia, náuseas, perda de peso e perda de apetite (Chan *et al.*, 1994). Outros sintomas mais severos podem ser acrescentados como febre, sangue nas fezes, sensibilidade a lactose (Norberg *et al.*, 2003), fibrose do apêndice, fagocitose de eritrócitos, baixo grau eosinofilia e a presença de *D. fragilis* no trato biliar (Chan *et al.*, 1993). Com frequência, também é relatado um sintoma mais crônico denominado Síndrome do Intestino Irritado (*Irritable Bowel Syndrome - IBS*) (Lagacé-Wiens *et al.*, 2006). Todos os sintomas desaparecem quando ocorre a eliminação do parasito (Yang e Scholten, 1977).

A IBS é definida como uma desordem funcional do intestino, com dor abdominal associada com a defecação ou alteração do hábito de defecar. Recentemente, estudos descrevem a possibilidade de parasitos intestinais como *B. hominis* e *D. fragilis* serem a etiologia da IBS (Stark *et al.*, 2007).

A distribuição de *D. fragilis* é ampla, sendo encontrado na maior parte do mundo tanto nas áreas rurais como urbanas (Chan *et al.*, 1993). A infecção causada por *D. fragilis* é, provavelmente, influenciada pela densidade da população e o nível de desenvolvimento humano.

A prevalência deste organismo varia entre 0% a 52% dependendo do local (Johnson *et al.*, 2004). Porém, a taxa de infecção é mais alta em instituições psiquiátricas, entre militares, estudantes de parasitologia e missionários (Yang e Scholten, 1977). Pode-se considerar ainda a presença deste protozoário, parasitismo oportunista, em pessoas imunodeficientes soropositivas para o vírus HIV/AIDS (Lainson e Silva, 1999).

O ciclo de vida de *D. fragilis* ainda não está determinado, porém com base em dados clínicos algumas suposições podem ser feitas (Figura 1):

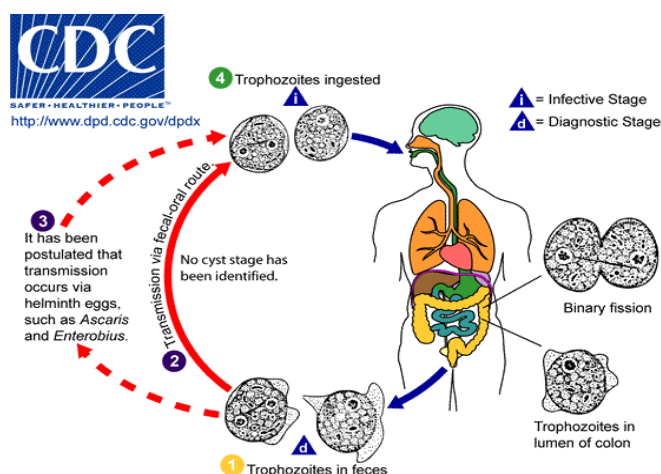


Figura 1: Ciclo biológico de *D. fragilis*.

Fonte: CDC, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Dientamoeba.htm>

A primeira delas diz respeito à possibilidade de que a transmissão ocorra pela via oral-fecal. Outro tipo de transmissão que vem sendo aceita é a transmissão pelo ar (Preiss *et al.*, 1991).

Outra suposição está relacionada à existência de um vetor, possivelmente o *Enterobius vermicularis* (Burrows e Swerdlow, 1956, Menghi *et al.*, 2006).

O *E. vermicularis*, um nematóide, pode estar associado à transmissão do protozoário *D. fragilis* (Ockert e Schmidt, 1976). Estudos moleculares com *E. vermicularis* e *D. fragilis*, demonstraram que os trofozoítos de *D. fragilis* podem ser transportados por meio de ovos de *E. vermicularis* (Menghi *et al.*, 2006). No entanto, alguns estudos demonstram que *E. vermicularis* não pode ser considerado como um meio significativo de transmissão já que foram encontrados pacientes infectados por *D. fragilis* sem associação com este nematóide (Stark *et al.*, 2005a).

Esta associação da transmissão de *D. fragilis* por meio dos ovos de *E. vermicularis* é aceita por alguns autores pelo fato de o *D. fragilis* ser muito próximo filogeneticamente do protozoário *H. meleagridis*, além de este protozoário ser transmitido de hospedeiro a hospedeiro por meio de ovos de nematóides *Heterakis gallinarum* (Gerbod *et al.*, 2001).

Outros vetores podem transmitir o protozoário *D. fragilis* como os nematóides *Ascaris* e *Trichuris* por meio de seus ovos (Dobell, 1940). Sukanahaketu (1977) encontrou estruturas de *D. fragilis* em ovos de *Ascaris lumbricoides* em pacientes infectados somente com *A. lumbricoides*. No entanto, estas vias de transmissão ainda não foram confirmadas (Girginkardesler *et al.*, 2008).

A infecção por *D. fragilis* pode ser acompanhada por outros protozoários causando uma co-infecção. Stark *et al.* (2005a) descreveu alguns destes protozoários: *Blastocystis hominis*, *Endolimax nana*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, *Iodamoeba butschlii*. Além disso, alguns autores incluem *E. vermicularis* como causador de co-infecção com *D. fragilis* (Preiss *et al.*, 1991).

Ayadi e Barri (1999) investigaram 1.497 casos confirmados de *D. fragilis* e encontraram co-infecção em 40% dos casos com *Blastocystis hominis*; 24% com *Endolimax nana*; 6% com *Entamoeba coli*; 5,7% *Giardia lamblia*; e 5% com *E. vermicularis*.

Alguns autores buscam relacionar a infecção de *D. fragilis* com sexo e idade. Estudos no Canadá demonstraram que a infecção por *D. fragilis* é maior em pessoas mais jovens e mulheres do que em pessoas mais velhas e homens (Yang e Scholten, 1977).

No Brasil há estudos que comprovam a ocorrência do parasita *D. fragilis* em portadores do vírus HIV/AIDS (Lainson e Silva, 1999) e em populações indígenas

(Lawrence *et al.*, 1983). Em Fortaleza (CE) há um único estudo relatando a presença do *D. fragilis* com outras enteroparasitoses (Riedel *et al.*, 1987). Em Recife (PE) foram relatados dois casos de dientamebíase (Huggins *et al.*, 1991). No DF não foi encontrado na literatura revista nenhum estudo sobre este parasita.

O diagnóstico de *D. fragilis* pode ser feito por meio da análise de fezes frescas ou fezes conservadas (Peek *et al.*, 2004). Porém sua identificação é difícil, pois sua forma pode ser semelhante à forma de protozoários não patogênicos (Stark *et al.*, 2006a). Além disso, possui dificuldade de sobrevivência no meio ambiente ou em meios de cultura por tempo prolongado (Menghi *et al.*, 2006). Portanto, para um eficaz diagnóstico por meio da análise de fezes frescas, há a necessidade de o exame ser realizado em um pequeno espaço de tempo após a defecação (Yang e Scholten, 1977).

Para uma melhor preservação das amostras e, conseqüentemente, um melhor diagnóstico, deve-se utilizar preservadores logo após a defecação. Estes preservadores são PVA (álcool polivinílico), fixador Schaudin's, Fenol – Álcool – Formol e SAF (acetato de sódio, ácido acético e formol), sendo este menos tóxico aos trofozoítos de *D. fragilis* comparado com outros preservadores, por isso é o mais utilizado. Ademais, quando este conservante é utilizado para fixar fezes com *D. fragilis* pode-se usar em conjunto métodos de concentração sem causar degeneração deste protozoário (Johnson *et al.*, 2004).

Para um diagnóstico definitivo de *D. fragilis* há necessidade de preparação de lâminas com colorações permanentes. Assim, torna-se possível diferenciar suas características e estruturas nucleares que não poderiam ser observados sem colorações (Stark *et al.*, 2005a). A combinação de conservadores/preservadores de fezes com colorações é importante, pois melhora a qualidade do material, aumentando a visibilidade dos detalhes da morfologia dos protozoários (Johnson *et al.*, 2004).

Para *D. fragilis*, geralmente, utiliza-se o preservador SAF com corante Hematoxilina férrica para preparação de lâminas permanentes (Yang e Scholten, 1977; Johnson *et al.*, 2004; Menghi *et al.*, 2006; Stark *et al.*, 2006b).

A maioria dos laboratórios de diagnóstico clínicos utilizam o preservador MIF (merthiolate, iodo e formol) para preservar as fezes. Porém este preservador é menos apropriado para *D. fragilis* porque pode causar sua rápida degeneração, além de não corar devidamente o núcleo desta espécie (Yang e Scholten, 1977). Por isso,

percebe-se que, em razão de problemas na identificação, a frequência de *D. fragilis* pode estar sendo negligenciada nestes laboratórios, tendo por consequência, um desconhecimento real da prevalência deste protozoário.

Em estudos realizados em Sydney, Austrália, observou-se que de 15 laboratórios apenas 1 conseguiu detectar o *D. fragilis* em amostras de fezes, pois a maioria dos laboratórios não possui técnicas adequadas para identificação deste parasito (Stark *et al.*, 2005a).

No Brasil, estudos realizados revelaram que muitos laboratórios possuem técnicos sem a familiaridade com a aparência deste parasito, dificultando a sua identificação. Outros não possuem técnicas para manter o organismo vivo (*in vitro*) ou, ainda, identificam *D. fragilis* como outro protozoário (Lainson e Silva, 1999).

De fato, outro fator que dificulta o diagnóstico de *D. fragilis* decorre da possibilidade de ser confundido com outros protozoários, como *Endolimax nana*, *Blastocystis hominis* e *Trichomonas hominis*, quando apresenta apenas um núcleo ou quando este núcleo está com os grânulos sobrepostos ou bem próximos (Yang e Scholten, 1977).

Notavelmente, apesar da abundante ocorrência e do conhecimento dos principais sintomas da infecção de *D. fragilis*, pouco se sabe sobre seu ciclo de vida, sua patogenicidade e origens filogenéticas (Silberman *et al.*, 1996). Não obstante ser o *D. fragilis* um significativo enteropatógeno, ainda há poucas pesquisas relacionadas com este organismo, fato que contribui para o pouco conhecimento sobre *D. fragilis*. (Stark *et al.*, 2006b).

1.2 *Blastocystis hominis*

Blastocystis é um parasito intestinal muito comum em humanos, além de ser encontrado em uma gama de animais (Stensvold *et al.*, 2006). *Blastocystis* é encontrado nos tratos intestinais de primatas, porcos, aves e anfíbios. Mas também é encontrado, mais raramente, em répteis e insetos (Abe *et al.*, 2002).

Blastocystis é geneticamente variável e é considerado geneticamente heterogêneo. Portanto, isolados de *Blastocystis* que são encontrados em humanos são chamados de *Blastocystis hominis* e em outros animais de *Blastocystis* spp.

(Stensvold *et al.*, 2008). Assim como *D. fragilis*, pouco se sabe sobre a taxonomia, ciclo de vida e modo de transmissão de *B. hominis* (Hotez, 2000).

B. hominis foi classificado por Brumpt, em 1912, apesar de sua primeira citação ser datada de 1849 por Swayne e por Brittan em surto de cólera na Inglaterra.

A espécie *B. hominis* foi classificada em 1985 como pertencente ao Reino Protista, ao Subreino Protozoa, ao Filo Sarcomastigophora, ao Subfilo Sarcodina, à Superclasse Rhizopoda, à Classe Lobosea, à Subclasse Gymnamoeba, à Ordem Amoebida, à Subordem Blastocytina, ao Gênero *Blastocystis* (Zierdt, 1991).

Hoje, *Blastocystis* é considerado um organismo unicelular endosimbionte do cólon e é classificado taxonomicamente, por alguns autores, dentro do grupo heterogêneo do Stramenopiles (Stensvold *et al.*, 2008). Stramenopiles constitui um grupo altamente diverso que inclui organismos fotossintéticos como as diatomáceas e não fotossintéticos entre eles *Blastocystis* spp. Este organismo pode viver em condições tanto aeróbica como anaeróbica, dependendo do seu habitat (Wawrzyniak *et al.*, 2008).

O *B. hominis* é provavelmente o protozoário mais comum encontrado no intestino humano (Clark, 1997), com uma prevalência maior de 50% em países em desenvolvimento (Stenzel e Boreham, 1996). É um organismo pleomórfico, com seis formas: Vacuolar (Corpo Central), Granular, Amebóide, Avacuolar, Multivacuolar e Cística (Stensvold *et al.*, 2008).

A forma Vacuolar ou Corpo Central (CB, do inglês *central body*) parece estar completamente vazia. O vacúolo ou CB ocupa 50 a 95% do volume da célula, com a média de 80%. O vacúolo contém aparência densa e com material amorfo ou partículas que coram com Gram, Tricrômico, Hematoxilina e Eosina. Esta forma pode ser encontrada em fezes e em culturas (Zierdt, 1991).

A forma Vacuolar é a forma típica do *B. hominis* e, geralmente, é utilizada para o diagnóstico deste organismo. O tamanho desta forma pode variar significativamente entre 2 a 200 µm em diâmetro, com médias de 4 a 15 µm de diâmetro (Stenzel e Boreham, 1996). O organismo tem uma fina borda de citoplasma com um a quatro núcleos e muitos grânulos (De Carli, 2007). Estes grânulos são formados por mitocôndrias que estão concentrados no citoplasma. Eventualmente, esta forma pode se diferenciar na forma Cística (Hotez, 2000).

A forma Granular mede de 10 a 60 μm de diâmetro, podendo chegar a 80 μm em alguns casos (Stenzel e Boreham, 1996). Pode ser encontrada em fezes ou em culturas, sendo predominantes em culturas (De Carli, 2007). A forma Granular tem uma ultra-estrutura semelhante à forma Vacuolar, e a grande diferença entre essa forma e a Vacuolar é a grande presença de grânulos no vacúolo ou CB.

Há a presença de três tipos de grânulos, que foram propostos em estudos microscopia eletrônica, o primeiro é com referência metabólica, o segundo com função lipídica e o terceiro na participação reprodutiva (Stenzel e Boreham, 1996). Também, tem sido sugerido que a forma Granular origina-se a partir da forma Vacuolar (Zaman e Howe, 1995). Esta transição pode ser induzida por uma variedade de fatores, como diferentes concentrações de soro no meio de cultura “in vitro”, transferência das células a diferentes meio de cultura, axenização e adição de certo antibióticos (De Carli, 2007).

A forma Multivacuolar ocorre em fezes e em culturas e ao invés de um vacúolo único, apresenta vários vacúolos de tamanhos e morfologias diferentes, mas sempre pequenos. Não foi identificado se a presença desses pequenos vacúolos nesta forma apresentam-se distintamente ou formam uma rede interligada (Stenzel e Boreham, 1996). Ademais, a forma Multivacuolar apresenta apenas um núcleo, ocasionalmente dois núcleos, e seu tamanho varia entre 5 a 8 μm . Acredita ser um estágio entre as formas Vacuolar e Cística (Stensvold *et al.*, 2008).

As formas Multivacuolar e Avacuolar não foram identificadas na mais nova proposta do ciclo de vida de *B. hominis* (Tan, 2004). No entanto, há a possibilidade de transmissão entre animais e humanos por intermédio destas formas indicando um potencial zoonótico (Stensvold *et al.*, 2008).

A forma Avacuolar ocorre no cólon e no ceco do intestino de humanos (Stensvold *et al.*, 2008) e é encontrada apenas em culturas. O tamanho é de aproximadamente 5 μm , tem 1 a 2 núcleos e não apresenta vacúolo central ou CB (Stenzel e Boreham, 1996).

A forma Amebóide foi conhecida com o avanço dos diagnósticos e é identificada por sua forma irregular (Zaman e Howe, 1995), sendo que essa forma é raramente reportada (Stenzel e Boreham, 1996). Esta forma mede de 2,6 a 7,8 μm de diâmetro, podendo apresentar pseudópodes, um ou dois núcleos e, usualmente, não contém vacúolo central (De Carli, 2007).

Em culturas, esta forma pode se reverter na forma Vacuolar, por meio de fissão binária, apresentando as mesmas características. Em diarreias fluídas, no entanto, a forma Amebóide imita os leucócitos. Esta forma Amebóide, entretanto, é vista em humanos apenas em diarreias fluídas ou pacientes em que morreram com esta doença (Zierdt, 1991).

A forma Cística foi descrita e publicada há apenas 20 anos (Stenzel e Boreham, 1996). O atraso nesses estudos se deve provavelmente ao pequeno tamanho (3 µm a 5 µm) e a morfologia dos cistos que são facilmente confundidos com artefatos fecais.

O cisto é polimórfico, mas geralmente é oval ou circular, protegido ou não por uma ou mais camadas de membrana circundante (Zaman e Howe, 1995). Além disso, são mais frequentes e observados em culturas axênicas. O conteúdo celular inclui de 1 a 4 núcleos, múltiplos vacúolos e depósitos de glicogênio e lipídeos (De Carli, 2007). Há a possibilidade que essa forma represente o estágio de infecção já que consegue sobreviver fora do hospedeiro (Stensvold *et al.*, 2008).

Todas as formas deste parasita, com exceção do cisto, são extremamente frágeis e se rompem rapidamente com a mudança de tonicidade do ambiente externo. Portanto, já que o cisto é a única forma que sobrevive ao ambiente externo é, provavelmente, o estágio de infecção deste parasita (Zaman e Howe, 1995).

O ciclo de vida de *B. hominis* proposto segue o seguinte padrão: O cisto que sobrevive ao ambiente externo contamina água, alimentos e outros. Ao entrar no hospedeiro, chega ao intestino e se diferencia na forma Avacuolar. Esta forma se diferencia na forma Amebóide e, posteriormente, na forma Multivacuolar. Em algum momento, há a diferenciação nas formas Vacuolar e Granular, que podem se diferenciar na forma Multivacuolar ou na forma Cística. A forma Vacuolar pode se diferenciar na Granular e vice-versa. Este ciclo ainda está sendo discutido, já que não se sabe ao certo como uma forma se transforma na outra – Figura 2 (Stenzel e Boreham, 1996).

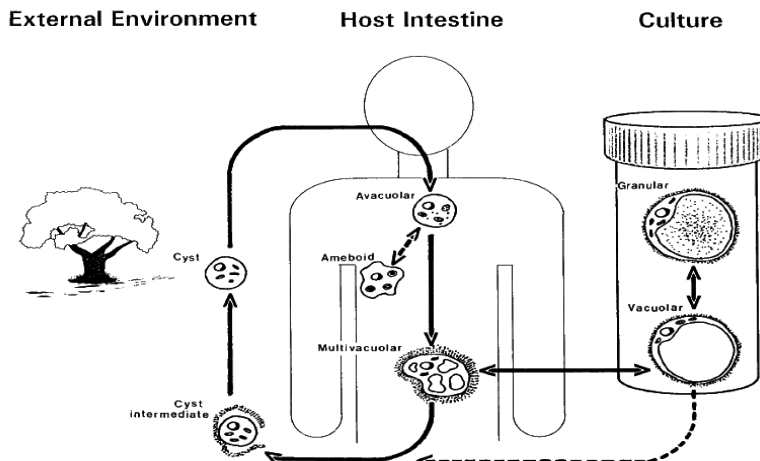


Figura 2: Proposta do ciclo biológico de *B. hominis*.

Fonte: Stenzel e Boreham, 1996

A rota de transmissão inclui um ciclo direto, por intermédio da transmissão oral-fecal, ou indireto, por intermédio da água (Stensvold *et al.*, 2008), alimentos contaminados (Hotez, 2000) e de pessoa a pessoa, principalmente em creches (Guimarães e Sogayar, 1995). A transmissão por intermédio da água e alimentos contaminados pode ser justificada pela contaminação destes por resíduos de esgoto, situação muito comum em países em desenvolvimento. Tal mecanismo é um importante foco de infecção de humanos (Zaman e Howe, 1995).

A transmissão também pode ocorrer por intermédio da rota zoonótica (Hotez, 2000), principalmente em primatas, répteis e insetos, como a barata (Zaman e Howe, 1995). Acredita-se que a transmissão de *Blastocystis* ocorra em animais para animais, humanos para humanos, animais para humanos e, possivelmente, humanos para animais (Noël *et al.*, 2005).

Estudos demonstraram uma extensiva diversidade genética entre os isolados de *Blastocystis* (Stensvold *et al.*, 2007), sendo que há uma diferenciação genética em mais de 7% entre cada isolado. Em análises moleculares baseadas na sequência de genes do rRNA, pequena subunidade (16-S), isolados de humanos, são geneticamente diversificados em 9 subgrupos. Isolados de mamíferos e pássaros podem ser identificados como um de pelo menos 9 subtipos de *Blastocystis* (Özyurt *et al.*, 2008).

Há controvérsias entre o potencial patogênico deste organismo. De um lado alguns autores aceitam a hipótese de este parasito ser comensal, mas de outro lado há evidências de que este parasito é patogênico (Zaman e Howe, 1995).

Há a possibilidade de o *B. hominis*, originalmente comensal, tornar-se patogênico em razão da observância de certas condições específicas, como por exemplo, sua presença em pessoas imunossuprimidas, com má nutrição ou com infecções concomitantes. A existência de diferentes *B. hominis* com diferentes patogenicidades não foi esclarecida e, atualmente, é prudente considerar *B. hominis* um patógeno potencial (Stenzel e Boreham, 1996).

Outros fatores que contribuem para a patogenicidade de *B. hominis* são: a) a abundância do parasito (Doyle *et al.*, 1990); b) o estado imunológico do indivíduo infectado (Ciriori, 1999) - por exemplo, há a possibilidade de este organismo ser agente causador de doenças em pacientes imunocomprometidos, como pacientes com AIDS/HIV (Stenzel e Boreham, 1996), o que o caracterizaria como um parasita oportunista (Stensvold *et al.*, 2008); c) a variação genética observada, em estudos baseados na seqüência de genes do rRNA, pequena subunidade (16-S), demonstraram que a patogenicidade de *B. hominis* depende do seu subtipo genômico (Clark, 1997; Özyurt *et al.*, 2008); d) tratamento e intervenção; e) interação parasito – hospedeiro (Tan e Nasirudeen, 2005).

Indivíduos infectados por *B. hominis* podem apresentar sintomas ou não. Altas prevalências de *B. hominis* podem ser encontrados em pacientes assintomáticos (Stensvold *et al.*, 2008). Os pacientes sintomáticos estão em menor número, podendo chegar a 10% dos infectados (Zaman e Howe, 1995).

Os sintomas atribuídos ao *B. hominis* podem ser gastrointestinais, como: diarreia, flatulência, dores abdominais, diarreia com muco, constipação seguido de diarreia e a *IBS*. E extra-intestinais como: anorexia, desconforto, inchaço, câimbras, falta de sono, vômito, desidratação, perda de peso, incapacidade para trabalhar (Zierdt, 1997; Hotez, 2000; Stark *et al.*, 2007; Stensvold *et al.*, 2008).

Há sintomas que variam entre gastrointestinais e extra-intestinais, são eles: diarreia com dores abdominais, colites, colites com ulceração, hemorragia no proto-sigmóides, dores abdominais agudas em crianças, urticária crônica, erupções cutâneas, prurido e inchaço (Stenzel e Boreham, 1996; Hotez, 2000; Stensvold *et al.*, 2008).

O diagnóstico de *B. hominis*, convencionalmente, é realizado por métodos parasitológicos utilizando fezes frescas que podem ser não coradas com colorações permanentes (porém com Lugol ou não) ou em esfregaços permanentes corados pelas colorações de Tricrômico, Giemsa (De Carli, 2007) e Hematoxilina férrica.

Para melhorar o diagnóstico, é comum utilizar preservadores de fezes já que com a exceção da forma de cisto, as outras formas são frágeis e degradam rapidamente (Zaman e Howe, 1995).

Com a variação morfológica apresentada pelo *B. hominis*, pouco se sabe sobre como identificar melhor este parasito. Entender a ocorrência deste polimorfismo nas fezes é um pré-requisito para melhorar o diagnóstico. O cisto, por exemplo, não pode ser identificado prontamente nas fezes, pois podem ser confundidos com leveduras e detritos fecais (Tan, 2004). Hoje, o método de diagnóstico parasitológico verifica a forma de Vacuolar como a mais comumente encontrada (Zaman, 1996).

Outros métodos de detecção de *B. hominis* são utilizados como culturas, métodos moleculares como PCR e detecção de anticorpos IgG no soro dos pacientes (Zaman, 1996; De Carli, 2007; Stensvold *et al.*, 2008).

Há vários estudos de prevalência, epidemiologia e patogenicidade de *B. hominis*, porém não esclarecerem como é seu ciclo de vida, transmissão, formas morfológicas e taxonomia (Sheehan *et al.*, 1986; Qadri *et al.*, 1989; Doyle *et al.*, 1990; Stensvold *et al.*, 2007; Özyurt *et al.*, 2008; Wawrzyniak *et al.*, 2008).

No Brasil, alguns estudos sobre a frequência e prevalência foram realizados em São Paulo (Guimarães e Sogayar, 1933, Kobayashi *et al.*, 1995; Neto *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2007), Rio de Janeiro (Moura *et al.*, 1989; Da Silva, 2006), Bahia (Brites *et al.*, 1997) e Paraná (Nascimento e Montinho, 2005). Há, ainda, um estudo de revisão sobre *B. hominis* encontrado no Brasil (Jones, 1997). No DF, no entanto, nenhum estudo foi encontrado.

A ausência de informação e a falta de pesquisas relacionadas à *D. fragilis* e *B. hominis* no mundo e, principalmente, no Brasil, contribuem para a ocorrência de inexplicáveis casos de diarreia crônica, dor abdominal, fadiga, flatulência e tantos outros sintomas.

Portanto, o problema, em razão da difícil detecção, está longe de ser solucionado. Dessa forma o presente estudo visa contribuir no conhecimento destes protozoários e melhorar os estudos sobre estes parasitos no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a presença de *Dientamoeba Fragilis* e *Blastocystis hominis* em amostras fecais de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília – HUB, no DF, utilizando técnicas morfológica e molecular.

2.1.1 Objetivos Específicos

1. Verificar a frequência de *D. fragilis* e *B. hominis* nas amostras fecais obtidas;
2. Verificar a frequência de co-infecção de *D. fragilis* e *B. hominis*, usando técnicas morfológicas padronizadas de coloração, com outros protozoários intestinais;
3. Confirmar a identificação de *D. fragilis* e *B. hominis* por métodos de caracterização molecular.
4. Analisar a distribuição do parasitismo de *D. fragilis* e *B. Hominis* em relação ao sexo e a idade dos pacientes.

3 MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS

158 amostras fecais foram obtidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) na seção de parasitologia, durante o período maio de 2008 a janeiro de 2009. Todas as amostras fecais foram coletadas em recipientes plásticos individuais e foram identificadas de acordo com o sexo e a idade do paciente, mantendo descrição e total sigilo do nome. As fezes ainda frescas foram levadas para o Laboratório de Parasitologia da UnB onde foram analisadas.

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

No Laboratório de Parasitologia da UnB, aproximadamente, 2g de fezes foram fixadas em SAF (acetato de sódio, ácido acético e formol) (1:1) e guardadas em temperatura ambiente para posterior técnica de sedimentação espontânea de Hoffman, Pons e Jenner, ligeiramente modificada. As fezes fixadas em SAF foram utilizadas para preparação de lâminas e verificação de *D. fragilis* e *B. hominis*.

Outros 2g de fezes, dos mesmos indivíduos, foram diretamente sedimentadas utilizando-se a técnica modificada de Hoffman, Pons e Jenner e congeladas a - 20°C em tubos de eppendorf 1,5 mL, com 400 µl de fezes sedimentada sem re-suspender. Este material foi utilizado para os ensaios moleculares.

3.3 LAVAGEM E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS EM LÂMINAS

As amostras fecais fixadas em SAF foram sedimentadas e preparadas para receber a coloração de Hematoxilina férrica.

Para sedimentação das amostras foi utilizada a técnica de sedimentação espontânea de Hoffman, Pons e Jenner, ligeiramente modificada: 3 mL das amostras fecais com SAF foram misturadas com 14 mL de água destilada e centrifugadas por 5 minutos a 4.000 rpm. Este processo de sedimentação foi repetido por 2-3 vezes, dependendo da pureza da amostra.

Após a sedimentação, uma gota do sedimento do material fecal foi misturado com uma gota de Albumina Mayer's (albumina, glicerina e ácido sódico). Deste material, foi feito esfregaço em duas lâminas, uma gota em cada lâmina, por amostra e seco por 1 hora.

3.4 MÉTODO DE COLORAÇÃO DAS LÂMINAS COM HEMATOXOLINA FÉRRICA

As lâminas, do item anterior, foram coradas com Hematoxilina férrica conforme o protocolo de Spencer Monroe modificado: As lâminas com esfregaços e secas foram colocadas em álcool 70% por 5 minutos e, em seguida, em álcool 70% iodado por 15 minutos e, novamente, em álcool 70% por 5 minutos por duas vezes. Após este processo, foram colocadas em água destilada por 10 minutos e, depois, foi no corante Hematoxilina férrica por 15 minutos. E novamente, deixou-se na água destilada por 10 minutos.

Logo após, foram colocadas em álcool 95% por 5 minutos, seguido de álcool 100% por 5 minutos. E finalmente, foram colocadas em Xilol por 10 minutos e quando secas foram montadas com Entelan.

Por fim, as lâminas permanentes coradas com Hematoxilina férrica foram observadas por meio da visualização por microscópio binocular óptico com lentes de 1000X com o intuito de proceder à identificação de *D. fragilis*, *B. hominis* e outros protozoários.

Para definir os tamanhos aproximados das formas coradas de *D. fragilis* e *B. hominis*, forma realizadas medições em micrômetros (μm) do maior e menor diâmetro utilizando-se um microscópio calibrado (Leitz binocular) com uma ocular métrica.

Análises estatísticas, com a utilização do programa SPSS versão 17, foram realizadas para a verificação da ocorrência de associações entre a frequência de

protozooses, sexo e idade. Com relação à existência de relação entre a frequência das protozooses x sexo foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2). Para a verificação da existência de associação entre frequência de protozooses e a idade dos pacientes foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Das 158 amostras, 8 positivas (sendo as amostras com co-infecção entre *D. fragilis* e *B. hominis*) e 5 negativas para *D. fragilis* e *B. hominis*, congeladas a -20°C , foram escolhidas para extração do DNA utilizando-se o *kit de extração* de DNA em fezes da INVETEK (PSP Spin Stool DNA Kit – Invetec - USA). A extração de DNA seguiu o protocolo do *kit* e cada amostra extraída obteve um volume final de 150 μl .

Outro procedimento foi testado para *D. fragilis*, do volume final, 100 μl do DNA das amostras extraídas foi lavado com álcool isopropílico 100% gelado (-20°C), em volume igual (1:1). As amostras foram agitadas por “vórtex” e incubada por 1 hora à -20°C . O DNA foi concentrado por centrifugação a 13.000 rpm durante 10 minutos e foi ressuscitado com 20 μl de TE (Tris - EDTA). Os outros 50 μl foram utilizados diretamente na PCR.

3.6 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Após a extração de DNA, o material foi amplificado por intermédio da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se a enzima *Taq polimerase* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Para a amplificação do DNA de *D. fragilis* utilizou-se o *nested-PCR*. Foram desenhados primers específicos para ampliar somente a região de genes Trichomonadidae do rRNA subunidade 16S.

Estes *primers* foram chamados de TRD3 e TRD5 por Jonhson e Clark (2000) (Tabela 1). O primeiro fragmento resultante deveria apresentar tamanho em torno de 1.700 pares de bases.

Uma segunda amplificação de DNA, por intermédio da PCR, foi realizada utilizando os primers DF3 e DF5, desenhados por Menghi *et al.* (2006) (Tabela 1). O segundo fragmento deveria apresentar tamanho em torno de 412 pares de bases.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para amplificar a região de genes *Trichomonadidae* do rRNA subunidade 16S em *D. fragilis*.

<i>Primers</i>	Seqüência de nucleotídeos
TRD3	GAT CCA ACG GCA GGT TCA CCT ACC
TRD5	GAT ACT TGG TTG ATC CTG CCA AGG
DF3	GGT TGG ATA CTC CTA CTC TCG C
DF5	TTG TAA CCT AGC AGA GGG CCA G

O DNA de *D. fragilis* usado como controle positivo foi gentilmente cedido pelo Dr. C. Graham Clark (London School of Hygiene & Tropical Medicine, Londres, Inglaterra).

O ciclo de amplificação da PCR para os *primers* TRD3/TRD5 apresentou a seguinte reação: uma desnaturação e ativação da enzima à 95°C por 5 minutos, 40 ciclos com 95°C por 1 minuto, 52°C por 40 segundos e 72°C por 1,5 minutos e finalizando com uma extensão de 72°C por 7 minutos.

E a PCR para os *primers* DF3/DF5 apresentou a seguinte reação: uma desnaturação e ativação da enzima à 95°C por 5 minutos, 40 ciclos com 95°C por 1 minuto, 54°C por 40 segundos e 72°C por 1,5 minutos e finalizando com uma extensão de 72°C por 5 minutos.

Na PCR que foi utilizada para confirmar a presença de *B. hominis*, utilizou-se os *primers* desenhados especificamente para ampliar a região de genes do rRNA subunidade 16S do gene de *Blastocystis*. Estes *primers* foram chamados de F1 e BHCRseq3 que foram citados por Böhm-Gloning *et al.* (1997) e Stensvold *et al.* (2007) (Tabela 2). O fragmento resultante deveria apresentar uma banda diagnóstica tamanho em torno de 550-590 pares de bases, conforme a literatura citada.

Tabela 2: Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para amplificar a região de genes do rRNA subunidade 16S do gene de *Blastocystis*.

<i>Primers</i>	Seqüência de nucleotídeos
F1	GGA GGT AGT GAC AAT AAA TC
BHCRseq3	TAA GAC TAC GAG GGT ATC TA

O ciclo de amplificação da PCR para os *primers* F1/BHCRseq3 apresentou a seguinte reação: uma desnaturação da enzima e ativação da enzima à 95°C por 5 minutos, 40 ciclos com 95°C por 1 minuto, 54°C por 40 segundos e 72°C por 1,5 minutos e finalizando com uma extensão de 72°C por 7 minutos.

Os fragmentos amplificados resultantes foram analisados em eletroforese com gel de agarose 1%, 0,5 X Tampão TBE (Tris Borato EDTA) e Brometo de Etídeo.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) (ANEXO A), bem como as amostras foram coletadas mediante a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por parte dos pacientes (ANEXO B).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PARASITISMO

Das 158 amostras fecais coletadas, 89 amostras (56,3%) foram positivas para algum tipo de parasito intestinal (Tabela 3).

Tabela 3. Relação das 158 amostras coletas com o sexo e o parasitismo.

Sexo	Nº de Amostras		Total
	Negativo	Positivo	
Feminino	48	61	109
Masculino	21	28	49
Total	69	89	158

Das 109 amostras dos pacientes do sexo feminino, 29 amostras apresentaram monoparasitismo (26,6%) e 32 amostras apresentaram poliparasitismo (29,4%) (Tabela 4).

Das 49 amostras dos pacientes do sexo masculino, 14 apresentaram monoparasitismo (28,6%) e 14 amostras apresentaram poliparasitismo (28,6%) (Tabela 4).

Tabela 4: Relação das 89 amostras positivas com sexo, monoparasitismo e poliparasitismo.

Sexo	Tipo		Total
	Monoparasitismo	Poliparasitismo	
Masculino	14	46	28
Feminino	29	32	61
Total	43	46	89

Não foi observado associação entre a frequência de amostras positivas e o sexo dos pacientes ($\chi^2 = 0,0465$ e $p = 0,8293$).

Das 89 amostras positivas para algum parasito intestinal, 28 amostras foram positivas para *D. fragilis* e 44 para *B. hominis* (Tabela 5).

Tabela 5: Relação entre o sexo e o parasitismo por *B. hominis* e *D. fragilis*.

Sexo	Parasito		Total
	<i>B. hominis</i>	<i>D. fragilis</i>	
Masculino	14	9	23
Feminino	30	19	49
Total	44	28	72

Não foi observada associação entre a frequência de amostras positivas para *D. fragilis* e *B. hominis* e o sexo dos pacientes ($\chi^2 = 0,005$ e $p = 0,9438$).

Os parasitos intestinais encontrados nas 89 amostras positivas, além do *D. fragilis* e *B. hominis* foram: *Endolimax nana*, presente em 29 amostras; *Entamoeba coli*, presente em 26 amostras; *Giardia lamblia*, em 9 amostras; *Iodamoeba butschlii*, em 31 amostras; e *Chilomastix*, em 2 amostras (Figura 3).

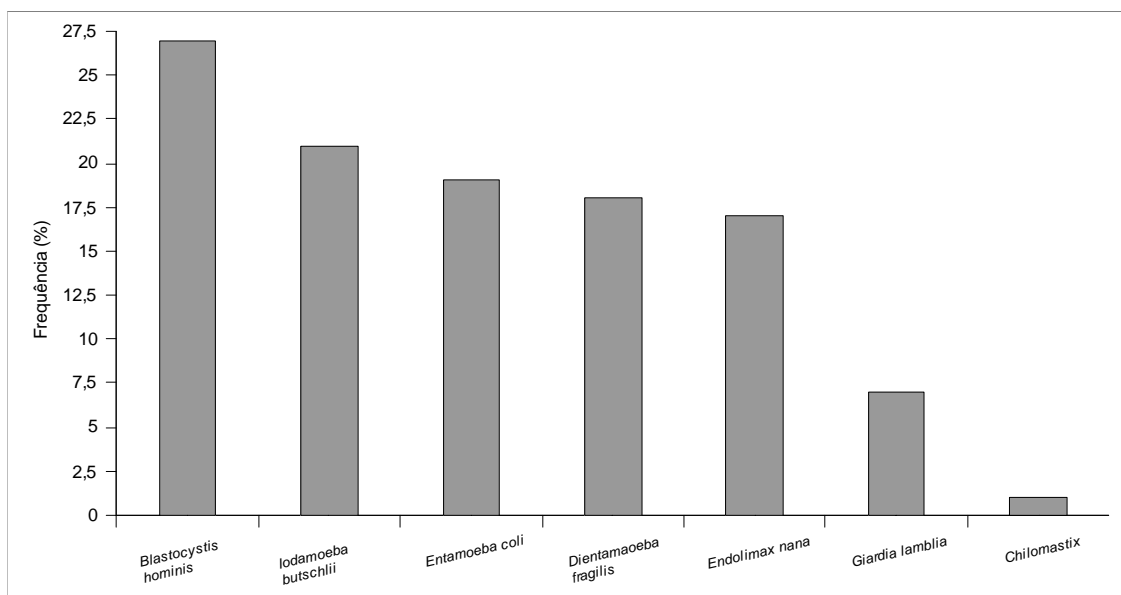


Figura 3: Frequência das espécies de protozoários encontradas nas amostras fecais em pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília.

Das 89 amostras positivas, verificou-se a ocorrência de poliparasitismo em 46 amostras positivas (51,7%). Destas amostras, 8 apresentaram associação entre *D. fragilis* e *B. hominis* (Tabela 6).

Tabela 6: Associações de parasitoses nas 46 amostras em que se verificou a ocorrência de poliparasitismo.

Poliparasitismo	Quantidade
<i>Blastocystis hominis</i> e <i>Dientamoeba fragilis</i>	8
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> e <i>Entamoeba coli</i>	2
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Entamoeba coli</i> e <i>Giardia lamblia</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Endolimax nana</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	2
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Giardia lamblia</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	2
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Endolimax nana</i> , <i>Entamoeba coli</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Chilomastix</i> , <i>Endolimax nana</i> , <i>Entamoeba coli</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i> e <i>Endolimax nana</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Endolimax nana</i> e <i>Entamoeba coli</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Endolimax nana</i> , <i>Iodamoeba butschlii</i>	5
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Entamoeba coli</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Dientamoeba fragilis</i> e <i>Endolimax nana</i>	3
<i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Endolimax nana</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Endolimax nana</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	3
<i>Endolimax nana</i> e <i>Entamoeba coli</i>	3
<i>Entamoeba coli</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
Total	46

Das 158 amostras, coletadas de pacientes atendidos no HUB, apenas 109 informaram a idade. Destes 109 pacientes, 57 pacientes foram positivos e 52 foram pacientes negativos. A média de idade dos 57 pacientes positivos foi de 36,8 anos (DP = 22,55).

Não foi observado associação entre a frequência de amostras positivas e a idade dos pacientes ($\chi^2 = 0,8534$ e $p = 0,6527$).

A média de idade das amostras positivas para *D. fragilis* foi de 31,2 anos (DP = 19,54) com idade mínima de 2 anos e máxima de 61 anos. A positividade foi mais frequente na idade de 9 anos, sendo que a faixa de idade mais frequente foi de 6 a 10 anos (Figura 4).

A média de idade das amostras positivas para *B. hominis* foi de 40,3 anos (DP = 21,14) com a idade mínima de 5 anos e máxima de 81 anos. A positividade das amostras foram mais frequentes nas idades de 9, 15 e 55 anos, sendo que a faixa de idade mais frequente foi de 51 a 55 anos (Figura 4).

Não foi observada associação entre a frequência de amostras positivas para *D. fragilis* e *B. hominis* e a idade dos pacientes ($\chi^2 = 2,5599$ e $p = 0,1096$).

Ademais, a faixa etária mais frequente das outras protozooses encontradas foi de 41 a 45 anos.

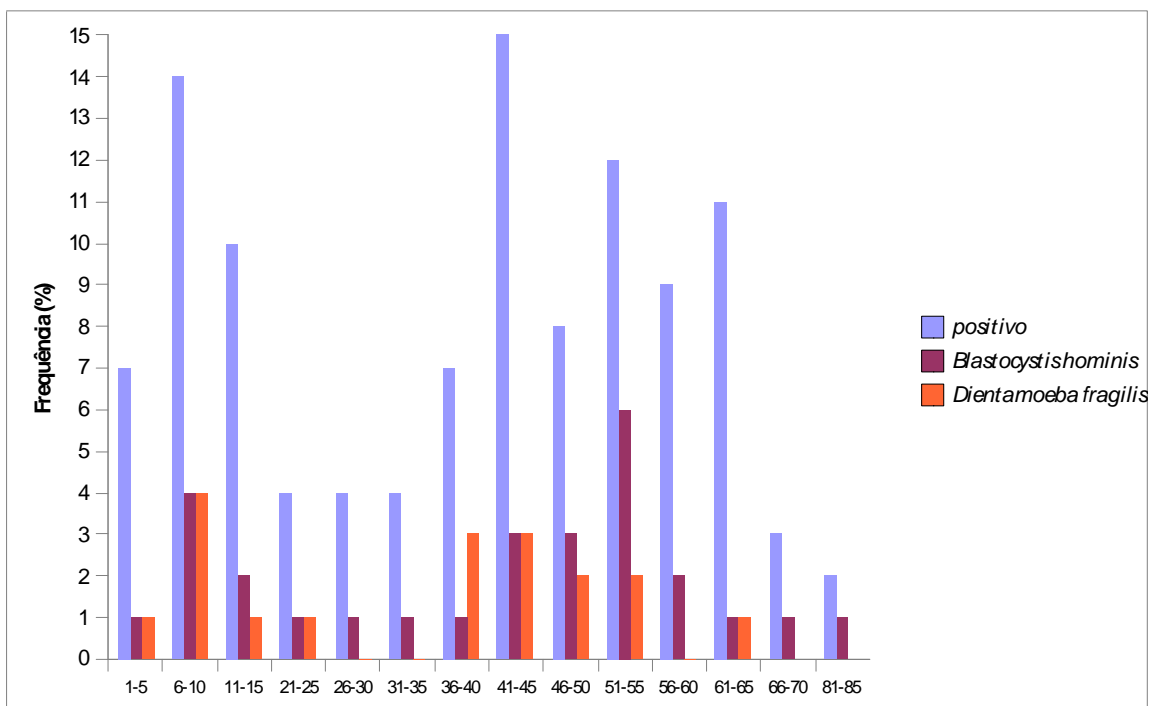


Figura 4: Frequência das idades encontradas nas amostras fecais de pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Dientamoeba fragilis*

A análise morfológica de *D. fragilis* evidenciou a existência de diferenças relativas às formas e ao tamanho deste parasita. Assim, verificou-se variações de tamanho que vão de 3 μm do menor diâmetro e 3 μm do maior diâmetro (3X3) a 10 μm do menor diâmetro a 17 μm do maior diâmetro (10X17). O tamanho mais frequente foi de 5 μm do menor diâmetro e 6 μm do maior diâmetro (5X6) (Figura 5).

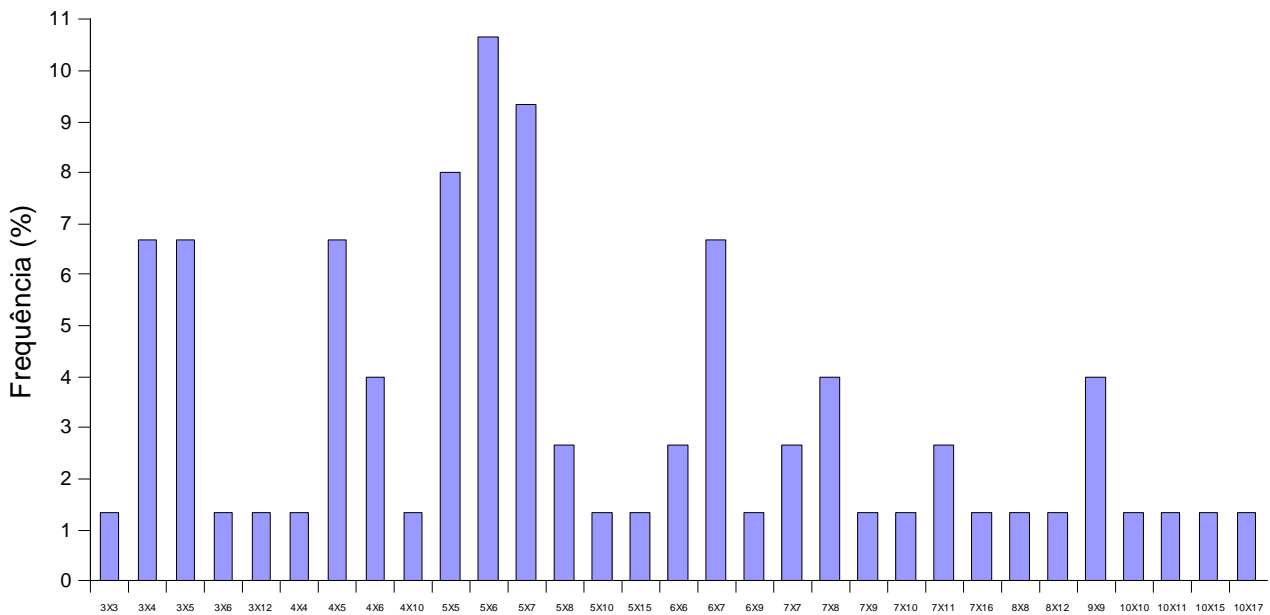


Figura 5: Frequência do maior e menor diâmetro das formas encontradas de *D. fragilis*.

Também foram encontradas formas mais arredondadas e ovaladas, além de formas com apenas um núcleo (3 das 28 amostras) e com dois núcleos (25 das 28 amostras) (Figura 6).

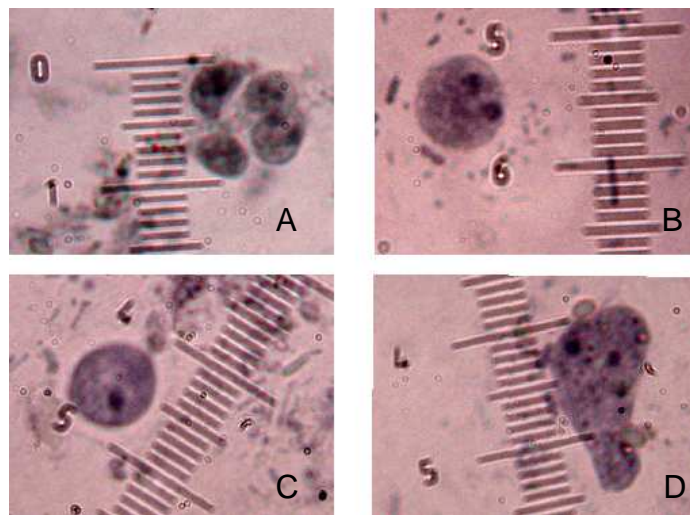


Figura 6: Caracterização morfológica de *D. fragilis* em lâminas, com coloração de Hematoxilina férrica, visualizadas em microscópio óptico em aumento 1000X. Em A: Formas arredondadas e alongadas com dois núcleos; B: Forma arredondada com dois núcleos permitindo observar os grânulos nucleares; C: Forma arredondada com apenas um núcleo; D: Forma alongada e amebóide com dois núcleos bem corados.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Blastocystis hominis*

Já com relação ao *B. hominis*, ocorreram variações de tamanho de 3 µm do menor diâmetro e 4 µm do maior diâmetro (3X4) até 12 µm do menor diâmetro e 12 µm do maior diâmetro (12X12). O tamanho mais frequente foi de 5 µm do menor diâmetro e 5 µm do maior diâmetro (5X5) (Figura 7).

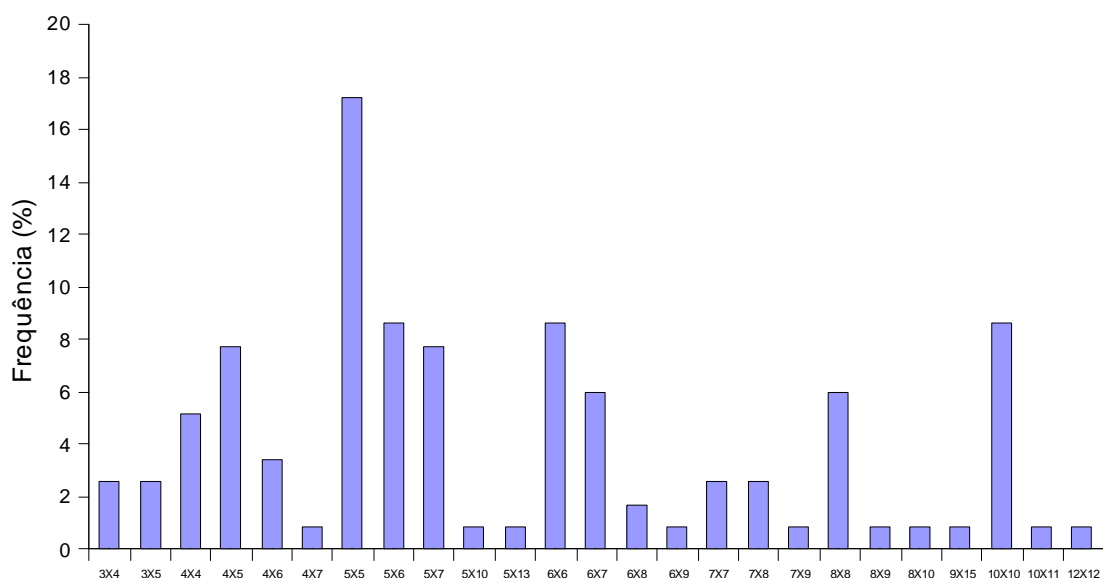


Figura 7: Frequência do maior e menor diâmetro das formas encontradas de *B. hominis*.

Nestas amostras, também, foram observadas formas diferentes para *B. hominis*, como a forma vacuolar e multivacuolar (Figura 8).

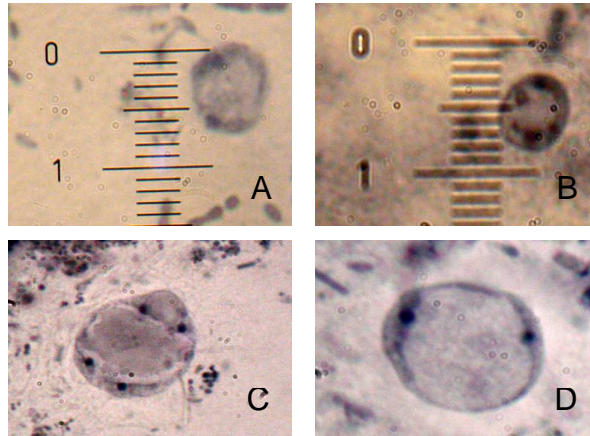


Figura 8: Caracterização morfológica de *B. hominis* em lâminas, com coloração de Hematoxilina férrica, visualizadas em microscópio óptico com aumento 1000X. Em A e B: Forma vacuolar com dois núcleos e vacúolo sem granulações; C: Forma vacuolar com quatro núcleos e vacúolo sem granulações; D: Forma vacuolar com dois núcleos e vacúolo sem granulações.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Dientamoeba fragilis*

Não foi possível amplificar DNA das amostras fecais positivas para *D. fragilis* identificadas em microscopia de luz, não obstante as várias tentativas realizadas com o objetivo de confirmar a presença deste parasita por intermédio da PCR.

Numerosos ensaios de PCR foram realizados modificando-se as temperaturas de anelamento, porém, não foram obtidos resultados satisfatórios e apenas houve a amplificação do controle positivo cedido pelo C. Graham Clark (Figura 9). Confirmando, portanto, que o sistema PCR/DNA operou corretamente.

Além disso, foram realizados procedimentos de sedimentação com isopropanol, conforme citado por Menghi *et al.* (2006), para ajudar na amplificação do DNA, porém com resultado negativo.

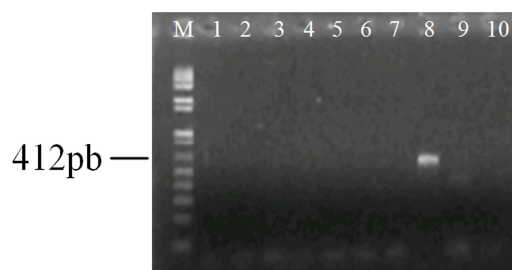


Figura 9: Gel de agarose 1% das 8 amostras positivas em lâminas coradas com Hematoxilina férrica para *D. fragilis*. M: Marcador molecular (Kb⁺); 1-7 e 9: amostras positivas em lâminas; 8: Controle Positivo cedido pelo C. Graham Clark, banda diagnóstica de 412pb; 10: Controle negativo.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Blastocystis hominis*

A caracterização molecular de *B. hominis* demonstrou que das 8 amostras positivas em lâminas, 6 foram confirmadas com a PCR (Figura 10). No gel de agarose 1% verificou-se a ocorrência de uma banda de 550-590 pb diagnóstica de *B.hominis*.

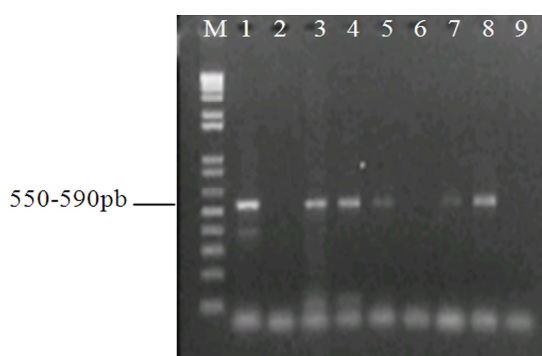


Figura 10: Gel de agarose 1 % das 8 amostras positivas em lâminas para *B. hominis*. M: Marcador molecular (Kb⁺); 1-8: amostra positivas em lâminas; 9: Controle negativo.

Ainda, das 5 amostras negativas em lâminas, duas foram positivas para *B. hominis* (Figura 11).

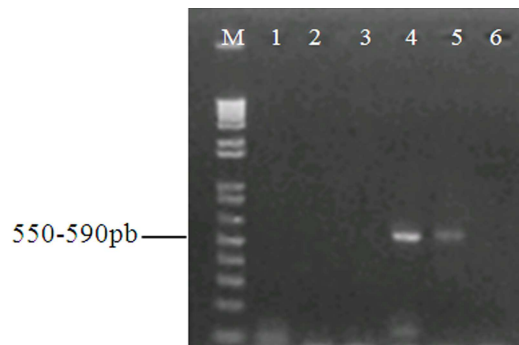


Figura 11: Caracterização molecular das 5 amostras negativas em lâminas coradas com Hematoxilina férrica para *B. hominis*. M: Marcador molecular (Kb^+); 1-5: amostras negativas em lâminas; 6: Controle negativo.

5 DISCUSSÃO

Com relação as amostras fecais coletadas, 55,96% das amostras foram positivas para os pacientes do sexo feminino e 57,2% para os pacientes do sexo masculino.

O teste estatístico revelou que não é houve associação entre sexo e parasitismo. Isso deve-se ao fato de que apesar da grande diferença na amostragem de homens e mulheres, os dois sexos apresentaram quase a mesma frequência de pessoas parasitadas.

Apesar de a amostragem estudada neste trabalho não ser representativa da população em geral do Distrito Federal, 56,3% das amostras foram positivas para algum tipo de parasita intestinal. Resultado semelhante foi encontrado por Riedel *et al.* (1983) em Fortaleza (CE). Porém, vale ressaltar que no presente estudo foram utilizadas lâminas de colorações permanentes.

Com relação ao *D. fragilis*, foi encontrada uma frequência de 31,5% nas amostras positivas. Esta frequência foi elevada se considerarmos, por exemplo, estudos realizados no Brasil, podendo-se citar o de Lainson e Silva (1999), realizado com 34 pacientes HIV/AIDS positivos que apresentou uma frequência de 3% e de Riedel *et al.* (1987), realizado em Fortaleza, que encontrou uma frequência de 0,05%.

Em outros países, como na Austrália, observou-se a prevalência de 0,9% de *D. fragilis* (Stark *et al.*, 2005a). Já na Venezuela foi encontrada a prevalência de 0,5% (Valle *et al.*, 2006). Resultado diverso foi obtido em estudo com crianças, em que foi reportada a presença de *D. fragilis* em 82% dos casos (Preiss *et al.*, 1991).

Além disso, o resultado encontrado é compatível com o citado por Johnson *et al.* (2004) que variou entre 0% a 52%, dependendo da localidade pesquisada.

Verifica-se que, não obstante a frequência da infecção por *D. fragilis* encontrada por nosso estudo (31,5%), referente aos pacientes atendidos no HUB (DF), ser superior aos resultados encontrados, como por exemplo, na Austrália, na Venezuela e até mesmo em outros estudos realizados no Brasil, ainda assim, ela está dentro dos limites citados acima.

Os fatores que podem ter influenciado no resultado encontrado por este estudo, estão relacionados, principalmente, ao emprego de técnicas de diagnóstico

coprológicas apropriadas na coleta e processamento das amostras e à falta de bons hábitos de higiene da população pesquisada, saneamento básico e ao desconhecimento de técnicas adequadas de manuseios de alimentos dos indivíduos parasitados.

Ademais, não pode ser descartada a hipótese de que a elevada prevalência de *D. fragilis* no DF, conforme observado por este estudo, deve-se ao fato da utilização de meios adequados para identificação deste parasita, como, por exemplo, a utilização de preservador de fezes (SAF), a observância de métodos de concentração de fezes e a utilização de coloração de lâmina com Hematoxilina férrica.

O resultado obtido neste trabalho não é compatível com a realidade encontrada na maioria dos laboratórios de análises clínicas do Brasil. Verifica-se que muitos destes laboratórios possuem técnicos sem familiaridade com a morfologia do *D. fragilis*, outros não possuem infra-estrutura laboratorial para manter o organismo vivo (in vitro) ou, simplesmente, não realizam uma identificação adequada do *D. fragilis* (Lainson e Silva, 1999).

É importante ressaltar que a coloração de Hematoxilina férrica é a mais indicada para realização de lâminas permanentes para o parasita *D. fragilis*, já que a membrana nuclear deste protozoário é delicada e não apresenta cromatina periférica (Stark *et al.*, 2006b) e, portanto, alguns autores consideram seu uso obrigatório (Norberg *et al.*, 2003).

Outro ponto importante observado por este estudo, diz respeito à frequência de *D. fragilis* levando-se em conta o sexo dos pacientes contaminados.

Das 28 amostras positivas para *D. fragilis*, 19 foram do sexo feminino (67,9%) e 9 do sexo masculino (32,1%). De acordo com Yang e Scholten (1977), a infecção é maior em representantes do sexo feminino do que no sexo masculino. Isso não foi observado neste estudo já que o teste qui-quadrado verificou que não existe relação entre o sexo e parasitismo por *D. fragilis*.

A totalidade dos casos positivos para *D. fragilis* foram encontrados na faixa etária de 1 a 65 anos, sendo que a de maior frequência foi entre a faixa de 6 a 10 anos, corroborando os dados encontrados da literatura (Yang e Scholten, 1977; Norberg *et al.*, 2003; Girginkardesler *et al.*, 2008). Porém, de acordo com os dados estatísticos, não se pode afirmar que esta faixa etária apresenta uma significativa infecção causada pelo *D. fragilis*.

Os resultados foram variados no que se refere à forma e ao tamanho de *D. fragilis*. Em relação ao tamanho, o menor diâmetro encontrado foi entre 3 µm a 10 µm e o maior diâmetro foi de 3 µm a 17 µm. Considera-se o tamanho de *D. fragilis* entre a faixa de 3,5 (Johnson *et al.*, 2004) a 20 µm, sendo típicos entre 5-15 µm (Stark *et al.*, 2006b).

Em relação ao número de núcleos, verificou-se que os trofozoítos de *D. fragilis* são, geralmente, binucleares. Todavia, de 30 a 40% são mononucleados (Menghi *et al.*, 2005). Nas séries observadas foram identificadas 3 amostras com trofozoítos com apenas 1 núcleo.

A frequência de *B. hominis* neste estudo foi de 49,4% das amostras fecais positivas. Em estudos realizados no Brasil, foram observadas frequências mais baixas entre 2%, 15,1%, 16,7%, 34,7% e 37,8% (Moura *et al.*, 1989; Nascimento e Montinho, 2005; Martins *et al.*, 2007; Guimares e Sogayar, 1993; Kobayashi, 1995). Ainda no Brasil, foi encontrado um estudo no Rio de Janeiro com uma elevada frequência de 70%. Na Venezuela, em estudo sobre predomínio de *B. hominis*, foi de 47% (Valle *et al.*, 2006). Outro estudo revelou que a prevalência de *B. hominis* é superior a 50% nos países em desenvolvimento (Stenzel e Boreham, 1996).

A totalidade dos casos positivos para *B. hominis* está dentro da faixa etária de 1 a 81 anos, sendo que a faixa de idade mais frequente foi a de 51 a 55 anos. Porém, de acordo com os dados estatísticos, não se pode afirmar que esta faixa etária apresenta uma significativa infecção pelo *B. hominis*. Alguns autores reportaram as faixas etárias de 0 a 6 (Martins *et al.*, 2007) e a de 30 a 40 anos (Doyle *et al.*, 1990) como as mais frequentes.

Em *B. hominis*, a forma Vacuolar foi frequente em todas as amostras positivas. O tamanho observado variou de 3 µm a 12 µm do menor diâmetro e de 4 µm a 12 µm do maior diâmetro, sendo que o tamanho mais frequente foi de 5 µm do menor diâmetro e de 5 µm do maior diâmetro. O tamanho da forma Vacuolar pode variar significativamente entre 2 a 200 µm em diâmetro, com médias de 4 a 15 µm de diâmetro (Stenzel e Boreham, 1996).

A forma Multivacuolar foi encontrada em apenas uma amostra, seu diâmetro foi de 5 µm do menor diâmetro e de 5 µm do maior diâmetro. Geralmente esta forma apresenta seu tamanho entre 5 a 8 µm (Abe *et al.*, 2002).

O poliparasitismo ocorreu em 46 amostras (51,7%). Desta amostras, 17,4% apresentaram associação entre *D. fragilis* e *B. hominis*. Associações entre *D. fragilis*

e *B. hominis* também foram encontradas em outros estudos (Girginkardesler *et al.*, 2008; Sheehan *et al.*, 1986).

Ayadi e Barri (1999) investigaram 1.497 casos confirmados de *D. fragilis* e encontraram co-infecção em 40% dos casos com *Blastocystis hominis*; 24% com *Endolimax nana*; 6% com *Entamoeba coli*; 5,7% *Giardia lamblia*; e 5% com *E. vermicularis*.

Pode-se, portanto, inferir que a co-infecção entre *D. fragilis* e *B. hominis* é comum.

Ademais, a co-infecção entre *D. fragilis* pode ser acompanhada por outros protozoários. Entre eles, além de *B. hominis*, pode-se citar: *E. nana*, *G. lamblia*, *E. coli* e *I. bütschilii* (Stark *et al.*, 2005a). Estas mesmas co-infecções pôde ser observada neste estudo.

A caracterização molecular de *D. fragilis* foi mal sucedida. Apenas o controle positivo foi amplificado, mostrando a correspondente banda diagnóstica de 412 pb.

Várias hipóteses podem ser levantadas para justificar este resultado:

- A obtenção do resultado negativo pode estar associado à existência de grupos de *D. fragilis* geneticamente distintos, conforme estudo de análise baseado na sequência de genes do rRNA, pequena subunidade (16-S), no qual verificou-se a existência de dois grupos geneticamente distintos de *D. fragilis* (Johnson e Clark, 2000). Além disso, dentro destes dois grupos distintos, dependendo do país estudado, existe divergência de 2 a 4% no genótipo da subunidade 16S do rRNA (Jonhson e Clark, 2000; Peek *et al.*, 2004; Stark *et al.*, 2005b). Assim, os *primers* desenhados por Johnson e Clark (2000) e empregados também por Mengui *et al.* (2005) podem não ter funcionado para as amostras deste estudo; Ademais, Peek *et al.* (2004) não conseguiu amplificar o DNA de 9 das 11 amostras positivas em lâminas utilizando os *primers* desenhados por Johnson e Clark. Para este autor os *primers* não são específicos da espécie e, portanto, ineficientes para amplificação direta a partir de amostras fecais.
- Outra justificativa decorre do fato de que, apesar de as amostras serem positivas em microscopia óptica, poucos protozoários de *D. fragilis* foram encontrados em cada uma delas, o que pode ter influenciado na

quantidade de DNA extraído de cada amostra, não sendo possível, em razão da pouca quantidade, sua amplificação via PCR;

- O insucesso da ferramenta molecular, pode ter relação com o fato de as amostras fecais não terem sido fixadas. Assim, por não apresentar cisto, mas apenas trofozoíto, pode ter ocorrido uma rápida degeneração do DNA do protozoário;
- Pode-se, também, considerar a presença de inibidores de DNA nas amostras analisadas, mesmo com a utilização de BSA como bloqueador na PCR.

A caracterização molecular de *B. hominis* demonstrou que das 8 amostras positivas em lâminas, 6 foram confirmadas com a PCR.

A diferença entre o resultado de lâmina e molecular pode ter acontecido pelo fato de *B. hominis* apresentar uma extensiva diversidade genética (Stensvold *et al.*, 2007). Em análises moleculares baseadas na sequência de genes do rRNA, pequena subunidade (16-S), isolados de humanos, são geneticamente diversificados em 9 subgrupos (Özyurt *et al.*, 2008).

Portanto, os *primers* desenhados para identificação de *B. hominis* podem não ter funcionado nas 2 amostras positivas em lâminas, pois há a possibilidade de estas amostras serem geneticamente diferentes das outras 6 amostras positivas.

Das 5 amostras negativas em lâminas, duas foram positivas para *B. hominis*, fato que confirma a maior sensibilidade da ferramenta molecular. Outra justificativa encontrada pode estar relacionada com o fato de este parasito apresentar seis formas diferentes, o que dificulta sua identificação em lâmina (Abe *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que algumas formas de *B. hominis* podem ser facilmente confundidas com trofozoítos de *D. fragilis*, levando a erros de sua real prevalência nos inquéritos coprológicos.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo verificou-se que:

- 1- A frequência de *D. fragilis* e *B. hominis* encontra-se dentro dos parâmetros definidos pela literatura. É considerada alta, porém, se for comparado com estudos realizados no Brasil;
- 2- Não há diferença significativa, relativamente ao parasitismo de *D. fragilis*, *B. hominis* e outras parasitoses intestinais, entre os indivíduos do sexo masculino e feminino;
- 3- Com relação à idade dos pacientes parasitados por *D. fragilis*, a totalidade dos casos positivos foi encontrada na faixa etária de 1 a 65 anos, sendo que a de maior frequência foi a faixa de 6 a 10 anos. Porém, de acordo com dados estatísticos não se pode afirmar que essa faixa etária apresenta uma significativa infecção causada pelo *D. fragilis*;
- 4- Com relação à idade dos pacientes parasitados por *B. hominis*, a totalidade dos casos positivos foi encontrada na faixa etária de 1 a 81 anos, sendo a faixa mais frequente foi a de 51 a 55 anos. Também, de acordo com a análise estatística, não se pode afirmar que exista uma significativa infecção desta faixa etária;
- 5- Com relação aos demais parasitas, a faixa etária com a maior frequência foi de 41 a 45 anos. Novamente, não foi significativa a relação existente entre idade *versus* parasitismo;
- 6- Com relação à morfologia do *D. fragilis*, o menor diâmetro foi de 3 µm a 10 µm e o maior diâmetro foi de 3 µm a 17 µm, compatível, portanto, com os parâmetros citados pela literatura. Verificou-se, ainda, que os trofozoítos de *D. fragilis* são, geralmente, binucleados. Além disso, foram encontradas 3 amostras de trofozoítos mononucleados;
- 7- Com relação à morfologia do *B. hominis*, a forma Vacuolar foi verificada em todas as amostras positivas. O tamanho desta forma variou de 3 µm a 12 µm do menor diâmetro e 4 µm a 12 µm do maior diâmetro, sendo o tamanho mais frequente o de 5 µm do menor diâmetro e 5 µm do maior diâmetro. Dados compatíveis com os parâmetros definidos pela literatura;

- 8- Ainda com relação à morfologia do *B. hominis*, foi encontrada apenas uma amostra com a forma Multivacuolar, que apresentou 5 µm do menor diâmetro e 5 µm do maior diâmetro, compatível com os parâmetros citados na literatura revista;
- 9- O poliparasitismo ocorreu em 51,7% das amostras, sendo que em 17,4% verificou-se associação de *D. fragilis* e *B. hominis*. Tais dados também são compatíveis com a literatura;
- 10- Houve a ocorrência de co-infecção entre *D. fragilis*, *B. hominis* e outros protozoários;
- 11- A caracterização molecular de *D. fragilis* não foi bem sucedida. As hipóteses levantadas para o insucesso do experimento foram as seguintes:
 - a) variabilidade genética;
 - b) pequena quantidade de indivíduos em cada uma das amostras;
 - c) não fixação das amostras fecais, com rápida degeneração do DNA do protozoário;
 - d) presença de inibidores de DNA;
- 12- A caracterização molecular do *B. hominis*, ao contrário do que verificado com *D. fragilis*, foi bem sucedida. Das 8 amostras positivas em lâminas, 6 foram confirmadas via PCR. Ademais, dentre as amostras negativas em microscopia, 2 foram positivas para *B. hominis* via PCR;
- 13- Os resultados encontrados na caracterização molecular, bem como na análise de microscopia, podem ser justificados pela grande variabilidade genética e morfológica de *B. hominis*.

Conclui-se que a maioria dos laboratórios de diagnóstico clínico não sabem identificar ou não utilizam técnicas adequadas de coloração de lâminas permanentes para diagnosticar estes parasitos. Verificou-se, ainda, que, não obstante o insucesso com relação ao *D. fragilis* neste estudo, as ferramentas moleculares em conjunto com diagnóstico em lâminas de colorações permanentes são os melhores meios para confirmação destas protozooses.

O diagnóstico por meio de lâminas coradas com Hematoxilina férrica conseguiu viabilizar o objetivo deste trabalho que foi a eficaz identificação destes parasitos.

Por fim, cabe esclarecer que estudos moleculares com *D. fragilis* continuam a ser realizados em nosso laboratório, para um melhor diagnóstico e caracterização deste parasito.

7 REFERÊNCIAS

Abe N, Nagoshi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa H. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol.* 2002; 106: 203-212.

Ayadi A, Barri I. *Dientamoeba fragilis*: flagelle pathogene. *Bull Soc Pathol Exot.* 1999; 5: 299-301.

Böhm-Gloning B, Knobloch J, Waldrich B. Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like DNA. *Trop Med Int Health.* 1997; 2:711-778.

Brites C, Baberino MG, Basto MA, Sá MS, Silva N. *Blastocystis hominis* as a potential cause of diarrhea in AIDS patients: a report of six cases in Bahia, Brazil. *Braz J Infec Dis.* 1997; 1: 91-94.

Brumpt E. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. *Bull Soc Pathol Exot.* 1912; 5: 725-730.

Burrows RB, Swerdlow MA. *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*. *Am J Trop Med.* 1956; 5: 258-265.

Chan FTH, Guan MX, Mackenzie MR. Application of indirect immunofluorescence to detection of *Dientamoeba fragilis* trophozoites in fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(7):1710-1714.

Chan FTH, Guan MX, Mackenzie MR, Diaz-Mitoma F. ATCC 30948 with iodoquinol, paromomycin, tetracycline, and metronidazole. *Antimicrobiol Agents and Chemothep.* 1994; 38(5): 1157-1160.

Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G. Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *Eur J Epidemiol.* 1999; 15: 389-33.

Clark, CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. Mol Biochem Parasitol. 1997; 87: 79-83.

Da Silva, AA. Incidência de *Blastocystis hominis* na população da cidade do Rio de Janeiro. NewLabs. 2006; 76: 86 - 96.

De Carli GA. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas. 2^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2007.

De Wit MAS, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Van Leeuwen NJ, Vinje J, Van Duynhoven YTHP. Etiology of gastroenteritis in sentinel general practises in the Netherlands. Clin Infect Dis. 2001; 33:280–288.

Dobell C. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. X. The life of *Dientamoeba fragilis*: observations, experiments and speculations. Parasitol. 1940; 32: 417-461.

Doyle WP, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1990; 28(1): 116-121.

Gerbod D, Edgcomb VP, Noel C, Zenner L, Wintjens L, Delgado-Viscogliosi P, Holder ME, Sogin ML, Viscogliosi E. Phylogenetic position of the trichomonad parasite of turkeys, *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequence. J Eukaryot Microbiol. 2001; 48: 498-504.

Girginkardesler N, Kurt Ö, Kilimcioglu AA, Ok ÜZ. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: Evolution of the role of *Enterobius vermicularis*. Parasitol Int. 2008; 57: 72-75.

Guimarães S, Sogayar MIL. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo state, Brazil. Rev Inst Med Trop. 1995; 37: 501-506.

Guimarães S, Sogayar MIL. *Blastocystis hominis*: Occurrence in children and staff members of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo state, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993; 88(3): 427-429.

Hotez P. The other intestinal protozoa: Enteric infections caused by *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, and *Dientamoeba fragilis*. Pediatric Infec Dis. 2000; 11(3): 178-181.

Huggins D, Falabella PA, Oliveira RS de, Barbosa SP, Silva Filho VC da. Dientamebíase: relato de dois casos. Folha Méd. 1991; 102(6): 229-231.

Jepps MW, Dobell C. *Dientamoeba fragilis* n.g., n. sp., new intestinal amoeba from man. Parasitol. 1918; 10: 352-367.

Johnson J, Clark CG. Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. J Clin Microbiol. 2000; 38(12):4653–4654.

Johnson EH, Windor JJ, Clark CG. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(3): 553-570.

Jones TC. *Blastocystis hominis*: More than 70 years of debate regarding pathogenicity! The Brazilian J Infec Dis. 1997; 1:102-104.

Kobayashi J, Hasegaw H, Forli AA, Nishimura NF, Yamanaka A, Shimabukuro T, Sato Y. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1995; 37:13-18.

Lainson R, Silva BAM. 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; 94(5): 611-613.

Lagacé-Wiens PR, Vancaesele PG, Kosclik C. *Dientamoeba fragilis*: an emerging role in intestinal disease. CMAJ. 2006; 175(5): 468-469.

Lawrence DN, Neel JV, Abadie SH, Moore LL, Adams LJ, Healy RG, Kagan IG. Estudos epidemiológicos entre populações ameríndias da Amazônia III. Parasitoses intestinais em povoações recentemente contactadas e em aculturação. Acta Amazônica. 1983; 13(2): 393-407.

Martins LPA, Serapião AAPT, Valenciano RF, Pires JEC, Castanho REP. Frequência de *Blastocystis hominis* e outras enteroparasitoses em amostras fecais analisadas no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Marília - SP. Rev Patol Trop. 2007; 36(1): 47-53.

Menghi CI, Makiya R, Gatta CL, Méndez OC. *Dientamoeba fragilis*: Técnicas para dilucidar su modo de transmisión. Parasitol Latinoam. 2005; 60:25-31.

Menghi CI, Gatta CL, Makiya R, Méndez OC. Detección molecular de *Dientamoeba fragilis* em heces: eliminación de los inhibidores de la DNA polimerasa. Parasitol Latinoam. 2006; 61: 146-151.

Moura H, Fernandez O, Viola JPB, Silva SP, Passos RH, Lima DB. Enteric parasites and HIV infection: Occurrence in AIDS patient in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84:527-533.

Nascimento SA, Montinho MLR. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga city, Paraná State, Brazil. Rev Inst Med Trop. 2005; 47(4): 213-217.

Neto VA, Alarcón RSR, Gakiya E, Ferreira CS, Bezerra RC, Santos AG dos. Elevada porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo, SP. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37:354-356.

Neves, D.P. Parasitologia humana. 10ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000.

Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb V, Viscogliosi PD, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. J Clin Microbiol. 2005; 43: 348-355.

Norberg A, Nord CE & Evengard B. *Dientamoeba fragilis* - a protozoal infection which may cause severe bowel distress. Clin Microbiol Infect. 2003; 9:65-8.

Ockert G, Schmidt T. Zur epidemiologie von *Dientamoeba fragilis* in Enterobius eirn mit hilfe von IEP-bestimmungen J Hyg Epidemiol Microl Immunol. 1976; 20: 76-81.

Özyurt M, Kurt O, Molbak K, Nielsen H V, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. Parasitol Int. 2008; 57: 300-306.

Preiss U, Ockert G, Bromme S, Otto A. On the clinical importance of *Dientamoeba fragilis* infection in childhood. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1991; 35(1): 27-34.

Peek R, Reedeker FR, Van Gool T. Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. J Clin Microbiol. 2004; 42(2):631–635.

Qadri SM, al-Okaili GA, al-Daylel F. Clinical significance of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1989; 27(11): 2407-2409.

Riedel OO, Noronha MCC, Sampaio EM, Moreira TF, Maia MJC, Barbosa CS. Enteroparasitas detectados em amostras de fezes provindas de pacientes de Hospital Universidade em Fortaleza, Ceara, Brasil: I - protozoarios amebianos Rev Med Univ Fed Ceará. 1987; 27(2):29-33.

Silberman JD, Clark CG, Sogin ML. *Dientamoeba fragilis* shares a recent common history with the trichomonads evolutionary. Mol Bioche Parasitol. 1996; 76: 311- 314.

Sheehan DJ, Raucher BG, Mckitrick JC. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of humans disease. J Clin Microbiol. 1986; 24: 548-550.

Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. J Clin Microbiol. 2005a; 43(6):2718-2723.

Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. Int J Parasitol. 2005b; 35: 57-62.

Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Evaluation of three diagnostic methods, including Real-Time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. J Clin Microbiol. 2006a; 44(1): 232-235.

Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Dientamoebiasis: clinical importance and recent advances. Trends Parasitol. 2006b; 22(2): 92-96.

Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 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.

Stark D, Phillips O, Peckett D, Munro U, Marriott D, Harkness J, Ellis J. Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: An update on the cycle and host distribution. Vet Parasitol. 2008; 151: 21-26.

Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson A, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG. Terminology of *Blastocystis* subtypes – a consensus. Trends Parasitol. 2006; 23(3): 93-96.

Stensvold CR, Arendrup MC, Jespergaard C, Molbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA- based methods: a comparative study. Diagnostic Microbiol Infect Dis. 2007; 59: 303-307.

Stensvold CR, Nielsen HV, Molbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. Trends Parasitol. 2008; 30(10): 1-7.

Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev. 1996; 9: 563-584.

Sukanhaketu S. The presence of *Dientamoeba fragilis* in the *Ascaris lumbricoides* ova: the first report from Thailand. J Med Asso Thail. 1977; 60: 256-258.

Tan KSW. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern technologies. Vet Parasitol. 2004; 126: 121-144.

Tan KSW, Nasirudeen AMA. Protozoan programmed cell death – insights from *Blastocystis* deathstyles. Trends Parasitol. 2005; 21: 547-550.

Valle LET, Mieses MT, Agobian G. Predominio de *Blastocystis hominis* sobre otros enteroparásitos en pacientes del municipio Palavecino, estado Lara, Venezuela. Rev Cubana Med Trop. 2006; 58(1):

Zaman V. The diagnosis of *Blastocystis hominis* cysts in human faeces. J Infect. 1996; 33: 15-16.

Zaman V, Howe J. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. Parasitol Res. 1995; 81:465–469.

Zierdt CH. *Blastocystis hominis* – past and future. Clin Microbiol Rev. 1991; 4:61-79.

Yang J e Scholten TH. *Dientamoeba fragilis*: A review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission, and diagnosis. Am J Trop Med Hyg. 1977; 26(1):16-22.

Wawrzyniak I, Roussel M, Diogion M, Couloux A, Texier C, TAN KSW, Vivares CP, Delbac F, Wincker P, Alaoui HE. Complete circular DNA in mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. Inter J Parasitol. 2008; 38: 1377-1382.

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Título: Identificação fenotípica de *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis* em pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília: Caracterização molecular preliminar de isolados diagnosticados.

Autores: Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi* César Augusto Cuba Cuba*

* Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Área de Patologia Faculdade de Medicina - UnB .

+ Endereço para correspondência: Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Área de Patologia, Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília - UnB. Brasília - DF. CEP 70910-900. E-mail: thaistam@yahoo.com.br

Resumo:

Dientamoeba fragilis e *Blastocystis hominis* são parasitas do trato gastrointestinal de humanos que podem estar associados a infecções intestinais e diarreias, porém são negligenciados nos testes de diagnóstico hospitalar. Amostras fecais foram coletadas de pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário de Brasília (HUB), durante o período de maio de 2008 a janeiro de 2009, com objetivo de identificar a presença de protozoários parasitas com ênfases em *D. fragilis* e *B. hominis*. Exames coprológicos, auxiliados com técnicas de concentração, de preparação de lâminas permanentes coradas com Hematoxilina férrica e biometria de trofozoítos de *D. fragilis* e cistos e trofozoítos de *B. hominis*, foram realizados para sua caracterização fenotípica. A técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi utilizada com *primers* específicos e otimizada com sucesso somente para *B. hominis*. Das 158 amostras fecais coletadas, 69% foram do sexo feminino e 31% do sexo masculino. Destas, 56,3% das amostras (n = 89) foram positivas para algum parasita intestinal, sendo que 28 amostras foram positivas para *D. fragilis* e 44 para *B. hominis*. Ainda, 51,7% das amostras apresentaram mais de um parasita, verificando-se associação entre *D. fragilis* e *B. hominis* em 8 amostras. Estudos moleculares confirmaram a presença de *B. hominis* em 6 das 8 amostras positivas em microscopia de luz e em 2 das 5 amostras negativas. Estes resultados

evidenciam o que a literatura especializada relata: Um desconhecimento real da prevalência destes protozoários, tanto pela falta do uso de técnicas adequadas de coloração, quanto pela não utilização de ferramentas moleculares complementares.

Palavras-Chaves: *Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis hominis*, identificação morfológica-molecular, Distrito Federal, Brasil.

Abstract

Phenotypic identification of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis hominis* in patients assisted at the University Hospital of Brasília: Molecular characterization of primary samples isolates.

A high prevalence of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis hominis* are reported on faecal samples collected from patients attending the ambulatory service of the University of Brasilia teaching hospital in Brasilia, Federal District, Brazil. Samples were collected directly into sodium acetate–acetic acid–formalin (SAF) and also as unfixed specimens. During a period of may 2008 and january 2009 a *D. fragilis* frequency of 31.5% (n = 89) among positive parasites samples and *B. hominis* 49.4% (n = 89), respectively, was recorded. From 46 individuals an association of *D. fragilis* and *B. hominis* were identified in 8 patients. Attempts of molecular identification were done and succesful results only achieved with the PCR/DNA of *B. hominis*. These results confirm a high frequency of both intestinal protozoa among a selected outpatient population. Of note, the higher presence of *D. fragilis* infections recorded is probably related to the diagnostic methods used, which are rarely followed in laboratories for the diagnosis of intestinal parasites. Clinical information was only available for a few of the patients with *D. fragilis*. For further work on its pathogenic role and prevalence among patients with gastrointestinal symptoms, immediate collection of fixed and unfixed specimens followed by staining routine procedures should be the mandatory procedures into diagnostic laboratories. The authors emphasize also the importance and need of Ferric haematoxylin staining assays on smears of faecal samples, on the basis of previous good direct microscopic observations of faecal specimens, for correct and accurate diagnosis of intestinal infections of these protozoan.

Introdução

Dientamoeba fragilis é um parasita trichomonadideo do trato gastrointestinal de humanos que pode estar associado a infecções intestinais e diarréias^{1,2}, além de ser um agente causador de enterite severa em pessoas imunossuprimidas (especialmente em pacientes HIV positivos)³.

O diagnóstico de *D. fragilis* pode ser feito por meio da análise de fezes frescas ou fezes conservadas⁴. Para um diagnóstico definitivo torna-se necessária a fixação e preparação de lâminas permanentes. A identificação deste parasita não é tarefa das mais fáceis, em razão de sua semelhança com outros protozoários patogênicos ou não⁵, como, por exemplo, o *Endolimax nana*, *Blastocystis hominis* e *Trichomonas hominis*⁶. Ademais, sua dificuldade de sobrevivência no meio ambiente ou em meios de cultura por tempo prolongado é outro fator que dificulta sua identificação⁷.

No Brasil há estudos que comprovam a ocorrência do parasita *D. fragilis* em portadores do vírus HIV/AIDS³ e em populações indígenas⁸. Em Fortaleza (CE), há um único estudo relatando a presença do *D. fragilis* com outras enteroparasitoses⁹. No DF não foi encontrado na literatura revista nenhum estudo sobre este parasita.

O outro objeto deste estudo é o enteroparasita denominado *Blastocystis hominis*.

B. hominis é provavelmente o protozoário mais comum encontrado no intestino humano¹⁰. Tal parasita também pode ser encontrado em uma gama de animais como porcos, aves e anfíbios^{11, 12}.

Não existe consenso sobre o potencial patogênico deste organismo. Atualmente, assim como acontece com o *D. fragilis*, considera-se mais prudente considerá-lo como patogênico^{13,14}. Ademais, os sintomas da infecção por *B. hominis* são semelhantes àqueles causados pelo *D. fragilis*.

No Brasil, alguns estudos de frequência e prevalência foram realizados em São Paulo, Bahia e Paraná¹⁵⁻¹⁸. Nenhum estudo, porém, foi encontrado no DF.

De fato, a falta de informação e de pesquisas relacionadas com o diagnóstico laboratorial de *D. fragilis* e *B. hominis* contribuem para a ocorrência de inexplicáveis casos de diarreia crônica, dor abdominal, fadiga, flatulência, e tantos outros sintomas.

Justifica-se, nesse ponto, o objetivo principal deste trabalho, qual seja, estabelecer no Laboratório de Parasitologia da UnB a capacidade de diagnóstico fenotípico e molecular de ambos os protozoários.

Material e Métodos

158 amostras fecais foram obtidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB), na seção de parasitologia, durante o período maio de 2008 a janeiro de 2009. As fezes ainda frescas foram levadas para o Laboratório de Parasitologia da Universidade de Brasília (UnB) onde foram analisadas.

Aproximadamente, 2 g de fezes, de cada paciente, foram fixadas em SAF (acetato de sódio, ácido acético e formol) e guardadas em temperatura ambiente para posterior técnica de sedimentação espontânea de Hoffman, Pons e Jenner, ligeiramente modificada.

Os sedimentos de fezes, fixadas em SAF, foram utilizadas para preparação de lâminas permanentes coradas com Hematoxilina férrica, com o intuito de proceder a identificação de *D. fragilis*, *B. hominis* e outros protozoários, por meio da visualização por microscópio binocular óptico com lentes de 1000X.

Para definir os tamanhos aproximados das formas coradas de *D. fragilis* e *B. hominis*, foram realizadas medições em micrômetros (μm) do maior e menor diâmetro utilizando-se um microscópio calibrado (Leitz binocular) com uma ocular micrométrica.

Análises estatísticas, por intermédio do programa SPSS, versão 17, foram realizadas para verificar se há uma associação entre a frequência de protozooses, sexo e idade. Portanto, para verificar a existência de associação entre a frequência das protozooses e do sexo foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2). Para a associação entre a frequência de protozooses e da idade foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Outros 2g de fezes, dos mesmos indivíduos, foram diretamente sedimentadas utilizando-se a técnica modificada de Hoffman, Pons e Jenner e congeladas a -20°C em tubos de eppendorf 1,5 mL, com 400 μl de fezes sedimentada sem re-suspender. Este material foi utilizado para os ensaios moleculares.

Das 158 amostras, 8 positivas e 5 negativas para *D. fragilis* e *B. hominis*, congeladas a - 20°C, foram escolhidas para extração do DNA utilizando-se o *kit de extração* de DNA em fezes da INVETEK (PSP Spin Stool DNA Kit – Invetec - USA). A extração de DNA seguiu o protocolo do *kit* e cada amostra extraída obteve um volume final de 150µl.

Após a extração de DNA, o material foi amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se a enzima *Taq polimerase* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Para a amplificação do DNA de *D. fragilis* utilizou-se o *nested-PCR*. Portanto, foram desenhados *primers* específicos para ampliar somente a região de genes *Trichomonadidae* do rRNA subunidade 16S. Estes *primers* foram chamados de TRD3 e TRD5¹⁹. O fragmento resultante deveria apresentar tamanho em torno de 1700 pares de bases.

Uma segunda amplificação do DNA, por intermédio da PCR, foi realizada utilizando os *primers* DF3 e DF5²⁰. O segundo fragmento deveria apresentar tamanho em torno de 412 pares de bases.

O DNA de *D. fragilis* usado como controle positivo foi gentilmente cedido pelo Dr. C. Graham Clark (London School of Hygiene & Tropical Medicine, Londres, Inglaterra).

O ciclo de amplificação da PCR para os *primers* TRD3/TRD5 apresentou a seguinte reação: uma desnaturação e ativação da enzima à 95°C por 5 minutos, 40 ciclos com 95°C por 1 minuto, 52°C por 40 segundos e 72°C por 1,5 minutos e finalmente, com uma extensão de 72°C por 7 minutos.

E a PCR para os *primers* DF3/DF5 apresentou a seguinte reação: uma desnaturação e ativação da enzima à 95°C por 5 minutos, 40 ciclos com 95°C por 1 minuto, 54°C por 40 segundos e 72°C por 1,5 minutos e finalizando com uma extensão de 72°C por 5 minutos.

Na PCR que foi utilizada para confirmar a presença de *B. hominis*, utilizou-se os *primers* desenhados especificamente para ampliar a região de genes do rRNA subunidade (SSU) 16S do gene de *Blastocystis*. Estes *primers* foram chamados de F1²¹ e BHCRseq3⁸. O fragmento resultante deveria apresentar tamanho em torno de 550-590 pares de bases.

O ciclo de amplificação da PCR para os *primers* F1/BHCRseq3 apresentou a seguinte reação: uma desnaturação da enzima e ativação da enzima à 95 °C por 5

minutos, 40 ciclos com 95°C por 1 minuto, 54°C por 40 segundos e 72°C por 1,5 minutos e finalizando com uma extensão de 72°C por 7 minutos.

Os fragmentos amplificados resultantes foram analisados em eletroforese com gel de agarose 1%, 0,5 X Tampão TBE (Tris Borato EDTA) e Brometo de Etídeo.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB).

Resultados

Caracterização do parasitismo

Das 158 amostras fecais coletadas, 109 foram do sexo feminino (69%) e 49 foram do sexo masculino (31%). Não foi observado associação entre a frequência de amostras positivas e a sexo dos pacientes ($\chi^2 = 0,0465$ e $p = 0,8293$).

Das 89 amostras positivas para algum parasita intestinal, 44 amostras foram positivas para *B. hominis*, sendo que 30 foram do sexo feminino e 14 do sexo masculino. Já para *D. fragilis*, 28 amostras foram positivas. Destas, 19 do sexo feminino e 9 do sexo masculino. Ademais, foram encontrados outros protozoários parasitas intestinais além do *D. fragilis* e *B. hominis* (Figura 1).

Das 89 amostras positivas, verificou-se a ocorrência de poliparasitismo em 46 amostras (51,7%). Destas amostras, 8 apresentaram associação entre *D. fragilis* e *B. hominis* (Tabela 1)

Das 158 amostras coletadas, apenas 109 informaram a idade (57 pacientes positivos e 52 pacientes negativos indicaram a idade) (Figura 2). Não foi observado associação entre a frequência de amostras positivas e a idade dos pacientes ($\chi^2 = 0,8534$ e $p = 0,6527$).

Caracterização morfológica de Dientamoeba fragilis

A análise morfológica de *D. fragilis* evidenciou a existência de diferenças relativas às formas e ao tamanho deste parasita. Assim, verificou-se variações de tamanho que vão de 3 μm do menor diâmetro e 3 μm do maior diâmetro (3X3) a 10

µm do menor diâmetro ao 17 µm do maior diâmetro (10X17). O tamanho mais frequente foi de 5 µm do menor diâmetro e 6 µm do maior diâmetro (5X6).

Também foram encontradas formas mais arredondadas e ovaladas, além de formas com apenas um núcleo (3 das 28 amostras) e com dois núcleos (25 das 28 amostras) (Figura 3).

Caracterização morfológica de Blastocystis hominis

Já com relação ao *B. hominis*, ocorreram variações de tamanho de 3 µm do menor diâmetro e 4 µm do maior diâmetro (3X4) até 12 µm do menor diâmetro e 12µm do maior diâmetro (12X12). O tamanho mais frequente foi de 5 µm do menor diâmetro e 5 µm do maior diâmetro (5X5). Nestas amostras, também, foram observadas formas diferentes para *B. hominis*, como a forma vacuolar e multivacuolar.

A forma vacuolar foi a mais frequente, estando presente em todas as amostras positivas. Já a forma multivacuolar foi encontrada em apenas uma amostra (Figura 4).

Caracterização molecular de Dientamoeba fragilis

Não foi possível amplificar as amostras fecais positivas para *D. fragilis* identificadas em microscopia de luz, não obstante as várias tentativas realizadas com o objetivo de confirmar a presença deste parasita por intermédio da PCR.

Numerosos ensaios de PCR foram realizados modificando-se as temperaturas de anelamento, porém, não foram obtidos resultados satisfatórios e apenas houve a amplificação do controle positivo cedido pelo C. Graham Clark (Figura 5).

Além disso, foram realizados procedimentos de sedimentação com isopropanol, conforme citado por MENGHI *et al.* (2006)⁷, para ajudar na amplificação do DNA, porém com resultado negativo.

Caracterização molecular de Blastocystis hominis

A caracterização molecular de *B. hominis* demonstra que das 8 amostras positivas em lâminas, 6 foram confirmadas com a PCR (Figura 6). No gel de agarose 1% verificou-se a ocorrência de uma banda de 550-590 pb diagnóstica de *B. hominis*. Ainda, das 5 amostras negativas em lâminas, duas foram positivas para *B. hominis* (Figura 7).

Discussão

Embora a amostragem estudada neste trabalho não seja representativa da população em geral do Distrito Federal, a frequência de *D. fragilis* encontrada neste estudo, 31,5% das amostras, foi considerada elevada.

O resultado encontrado é compatível com o citado por JOHNSON *et al.* (2004)²³ que variou entre 0% a 52%, dependendo da localidade pesquisada.

No Brasil, existem outros estudos que se enquadram nos referidos valores podendo-se citar o de LAINSON & SILVA (1999)³, realizado com pacientes HIV/AIDS positivos que apresentou uma frequência de 3%.

Em outros países, como na Austrália, observou-se a prevalência de 0,9% de *D. fragilis*. Já na Venezuela foi encontrada a prevalência de 0,5%²⁴. Resultado diverso foi obtido em estudo com crianças, em que foi reportada a presença de *D. fragilis* em 82% dos casos²⁵.

Verifica-se que, não obstante a frequência da infecção por *D. fragilis* encontrada por nosso estudo (31,5%), referente aos pacientes atendidos no HUB (DF), ser superior aos resultados encontrados, como por exemplo, na Austrália, na Venezuela e até mesmo em outros estudos realizados no Brasil, ainda assim, ela está dentro dos limites citados acima.

Os fatores que podem ter influenciado no resultado encontrado por este estudo, estão relacionados, principalmente, ao emprego de técnicas de diagnóstico coprológicas apropriadas na coleta e processamento das amostras e à falta de bons hábitos de higiene da população pesquisada, falta de saneamento básico e ao desconhecimento de técnicas adequadas de manuseios de alimentos dos indivíduos parasitados.

O resultado obtido neste trabalho não é compatível com a realidade encontrada na maioria dos laboratórios de análises clínicas do Brasil. Verifica-se que muitos destes laboratórios possuem técnicos sem familiaridade com a morfologia do *D. fragilis*, outros não possuem infra-estrutura laboratorial para manter o organismo vivo (in vitro) ou, simplesmente, não realizam uma identificação adequada do *D. fragilis*³.

É importante ressaltar que a coloração de Hematoxilina férrica é a mais indicada para realização de lâminas permanentes para o parasita *D. fragilis*, já que a membrana nuclear deste protozoário é delicada e não apresenta cromatina periférica²⁶ e, portanto, alguns autores consideram seu uso obrigatório²².

Outro ponto importante observado por este estudo, diz respeito à frequência de *D. fragilis* levando-se em conta o sexo dos pacientes contaminados.

Das 28 amostras positivas para *D. fragilis*, 19 foram do sexo feminino (67,9%) e 9 do sexo masculino (32,1%). De acordo com YANG & SCHOLTEN (1977)⁶, a infecção é maior em representantes do sexo feminino do que no sexo masculino, isso também foi observado neste estudo.

A totalidade dos casos positivos para *D. fragilis* foram encontrados na faixa etária de 1 a 65 anos, sendo que a de maior frequência foi entre a faixa de 6 a 10 anos, corroborando os dados encontrados da literatura^{6, 22, 27}.

Os resultados foram variados no que se refere à forma e ao tamanho de *D. fragilis*. Em relação ao tamanho, o menor diâmetro encontrado foi entre 3µm a 10 µm e o maior diâmetro foi de 3µm a 17µm. Considera-se o tamanho de *D. fragilis* entre a faixa de 3,5²³ a 20 µm, sendo típicos entre 5-15 µm²⁶.

Em relação ao número de núcleos, verificou-se que os trofozoítos de *D. fragilis* são, geralmente, binucleares. Todavia, de 30 a 40% são mononucleados²⁰. Nas séries observadas foram identificadas 3 amostras com trofozoítos com apenas 1 núcleo.

A frequência de *B. hominis* neste estudo foi de 49,4% das amostras fecais positivas. Em estudos realizados no Brasil, foram observadas frequências mais baixas entre 15,1% e 16,7%^{17,18}. Na Venezuela, em estudo sobre predomínio de *B. hominis*, foi de 47%²⁴. Outro estudo revelou que a prevalência de *B. hominis* é superior a 50% nos países em desenvolvimento¹⁴.

A totalidade dos casos positivos para *B. hominis* está dentro da faixa etária de 1 a 81 anos, sendo que a faixa de idade mais frequente foi a de 51 a 55 anos.

Alguns autores reportaram as faixas etárias de 0 a 6¹⁸ e a de 30 a 40²⁸ anos como as mais freqüentes.

Em *B. hominis*, a forma vacuolar foi frequente em todas as amostras positivas. O tamanho observado variou de 3µm a 12 µm do menor diâmetro e 4µm a 12 µm do maior diâmetro, sendo que o tamanho mais frequente foi 5µm do menor diâmetro e 5µm do maior diâmetro. O tamanho da forma vacuolar pode variar significativamente entre 2 a 200 µm em diâmetro, com médias de 4 a 15 µm de diâmetro¹⁴.

A forma multivacuolar foi encontrada em apenas uma amostra, seu diâmetro foi de 5 µm do menor diâmetro e 5µm do maior diâmetro. Geralmente esta forma apresenta seu tamanho entre 5 a 8 µm¹¹.

O poliparasitismo ocorreu em 46 amostras (51,7%). Desta amostras, 17,4% apresentaram associação entre *D. fragilis* e *B. hominis*. Associações entre *D. fragilis* e *B. hominis* também foram encontradas em outros estudos^{27,29,30}. Pode-se, portanto, inferir que a co-infecção entre *D. fragilis* e *B. hominis* é comum.

A caracterização molecular de *D. fragilis* foi mal sucedida. Apenas o controle positivo foi amplificado, mostrando a correspondente banda diagnóstica de 412 pb.

Várias hipóteses podem ser levantadas para justificar este resultado:

1) A obtenção do resultado negativo pode estar associado à existência de grupos de *D. fragilis* geneticamente distintos, conforme estudo de análise baseado na sequência de genes do rRNA, pequena subunidade (16-S), no qual verificou-se a existência de grupos geneticamente distintos de *D. fragilis*¹⁹.

Assim, as amostras estudadas podem ser geneticamente diferentes de outras regiões. De modo que os *primers* desenhados por JOHNSON & CLARK (2000)¹⁹ e empregados também por MENGUI *et al.* (2005)²⁰ podem não ter funcionado para as amostras deste estudo;

Ademais, PEEK *et al.* (2004)⁴ não conseguiu amplificar o DNA de 9 das 11 amostras positivas em lâminas utilizando os *primers* desenhados por JOHNSON & CLARK¹⁹. Para este autor os *primers* não são específicos da espécie e ineficientes para amplificação direta a partir de amostras fecais.

2) Outra justificativa decorre do fato de que, apesar de as amostras serem positivas em microscopia óptica, poucos protozoários de *D. fragilis* foram encontrados em cada uma delas, o que pode ter influenciado na

quantidade de DNA extraído de cada amostra, não sendo possível, em razão da pouca quantidade, sua amplificação via PCR;

3) O insucesso da ferramenta molecular, pode ter relação com o fato de as amostras fecais não terem sido fixadas. Assim, por não apresentar cisto, mas apenas trofozoíto, pode ter ocorrido uma rápida degeneração do DNA do protozoário;

4) Pode-se, também, considerar a presença de inibidores de DNA nas amostras analisadas, mesmo com a utilização de BSA como bloqueador na PCR.

A caracterização molecular de *B. hominis* demonstrou que das 8 amostras positivas em lâminas, 6 foram confirmadas com a PCR.

A diferença entre o resultado de lâmina e molecular pode ter acontecido pelo fato de *B. hominis* apresentar uma extensiva diversidade genética³¹. Em análises moleculares baseadas na sequência de genes do rRNA (SSU), pequena subunidade (16-S), isolados de humanos, são geneticamente diversificados em 9 subgrupos³².

Portanto, os *primers* desenhados para identificação de *B. hominis* podem não ter funcionado nas 2 amostras positivas em lâminas, pois há a possibilidade de estas amostras serem geneticamente diferente das outras 6 amostras positivas.

Das 5 amostras negativas em lâminas, duas foram positivas para *B. hominis*, fato que confirma a maior sensibilidade da ferramenta molecular. Outra justificativa encontrada pode estar relacionada com o fato de este parasito apresentar seis formas diferentes, o que dificulta sua identificação em lâmina¹¹.

Vale ressaltar que algumas formas de *B. hominis* podem ser facilmente confundidas com trofozoítos de *D. fragilis* levando a erros de sua real prevalência nos inquéritos coprológicos.

Concluí-se que *B. hominis* e *D. fragilis* são parasitas intestinais de grande importância para a saúde pública e este estudo revela que estes parasitas estão sendo negligenciados, pois sua frequência é elevada e há escassez de estudos detalhados no Brasil.

Além disso, a maioria dos laboratórios de diagnóstico clínico não sabem identificar ou não utilizam técnicas adequadas de coloração e de lâminas permanentes para diagnosticar estes parasitas.

Por fim, cabe esclarecer que estudos moleculares com *D. fragilis* continuam a ser realizados em nosso laboratório, para um melhor diagnóstico e caracterização deste parasita.

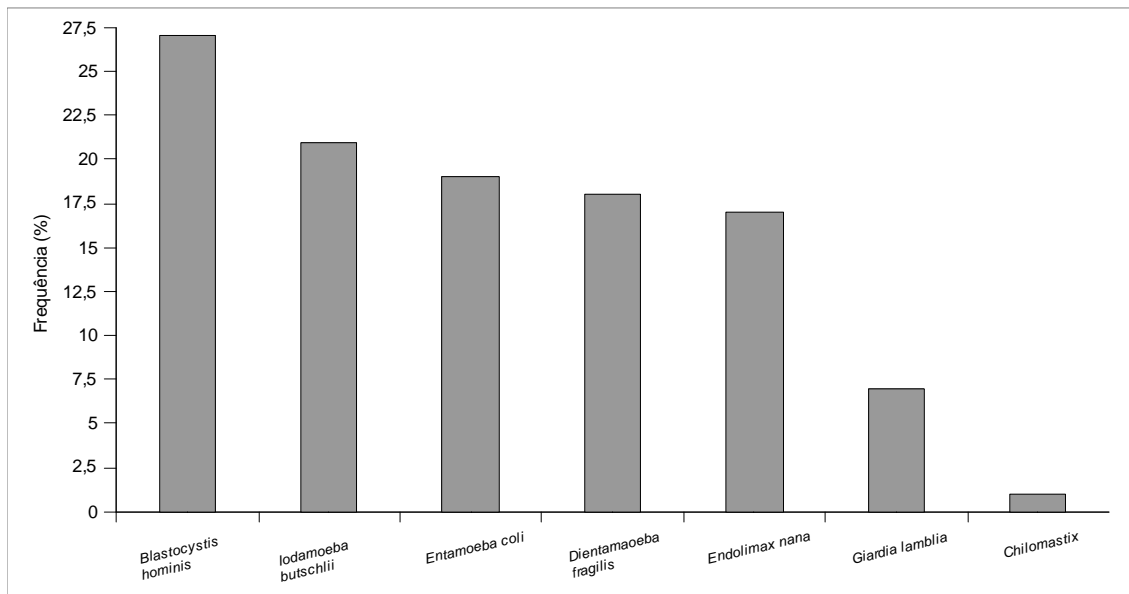


Figura 1: Gráfico relacionando as protozooses encontradas nas amostras fecais e sua frequência.

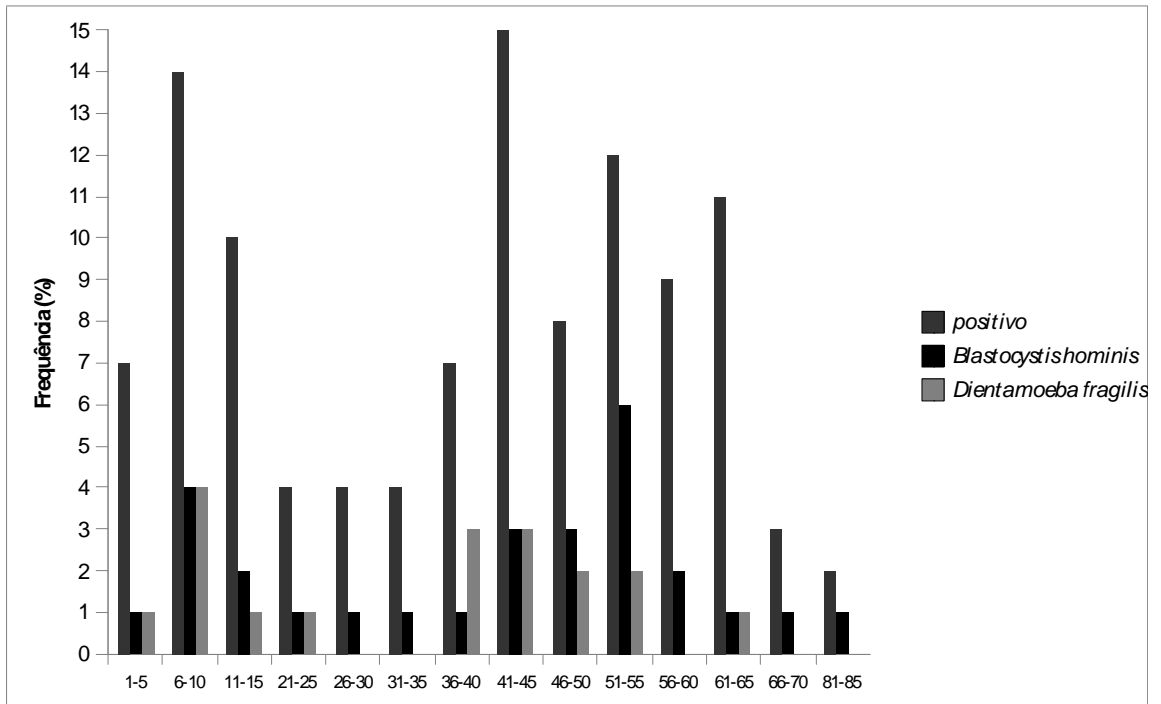


Figura 2: Gráfico relacionando a frequência das idades dos 89 pacientes positivos com as protozooses encontradas, *D. fragilis* e *B. hominis*.

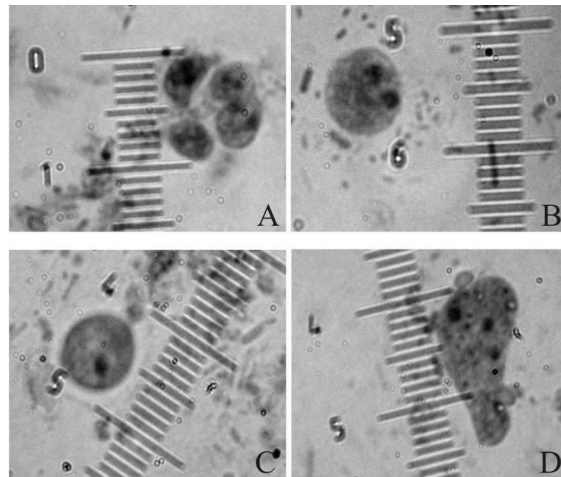


Figura 3: Caracterização morfológica de *D. fragilis* em lâminas, com coloração de Hematoxilina férrica, visualizadas em microscópio óptico em aumento 1000X. Em A: Formas arredondadas e alongadas com dois núcleos; B: Forma arredondada com dois núcleos permitindo observar os grânulos nucleares; C: Forma arredondada com apenas um núcleo; D: Forma alongada e ameboíde com dois núcleos bem corados.

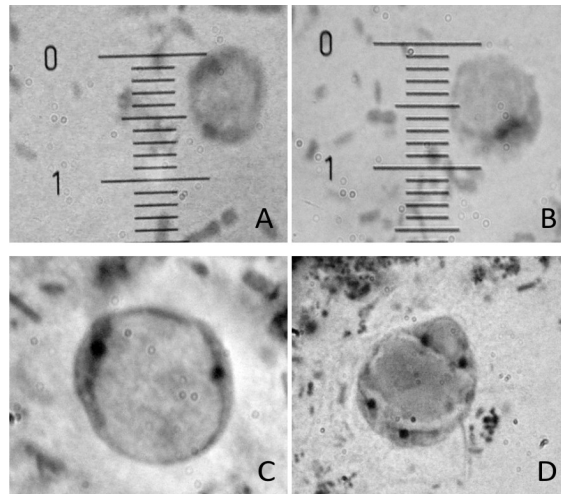


Figura 4: Caracterização morfológica de *B. hominis* em lâminas, com coloração de Hematoxilina férrica, visualizadas em microscópio óptico com aumento 1000X. Em A: Forma vacuolar com dois núcleos e vacúolo sem granuações; B: Forma multivacuolar com dois núcleos e vacúolo com granulações; C: Forma vacuolar com dois núcleos e vacúolo sem granulações; D: Forma vacuolar com quatro núcleos e vacúolo sem granulações.

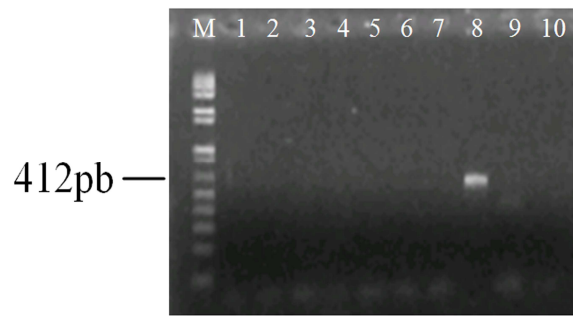


Figura 5 : Gel de agarose 1% das 8 amostras positivas em lâminas coradas com Hematoxilina férrica para *D. fragilis*. M: Marcador molecular (Kb⁺); 1-7 e 9: amostras positivas em lâminas; 8: Controle Positivo cedido pelo C. Graham Clark; 10: Controle negativo.

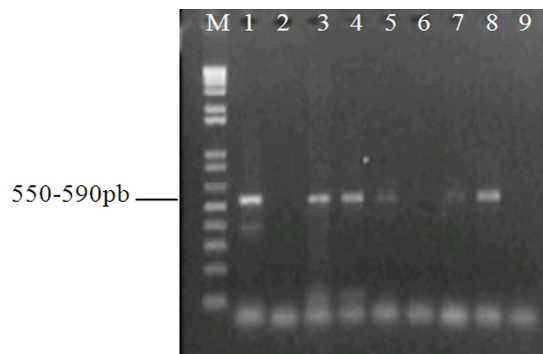


Figura 6: Gel de agarose 1 % das 8 amostras positivas em lâminas para *B. hominis*. M: Marcador molecular (Kb⁺); 1-8: amostra positivas em lâminas; 9: Controle negativo.

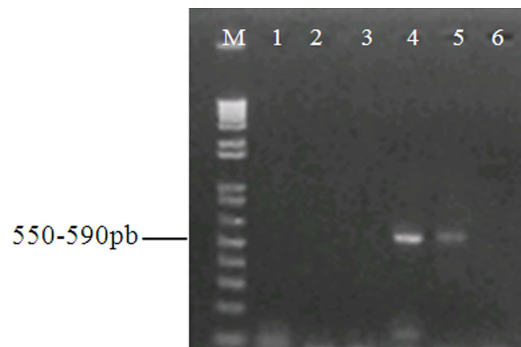


Figura 7: Caracterização molecular das 5 amostras negativas em lâminas corada com Hematoxilina férrica para *B. hominis*. M: Marcador molecular (Kb⁺); 1-5: amostras negativas em lâminas; 6: Controle negativo.

Tabela 1: Associações de parasitismo nas 46 amostras em que ocorreu mais de um protozoário.

Poliparasitismo	Quantidade
<i>Blastocystis hominis</i> e <i>Dientamoeba fragilis</i>	8
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> e <i>Entamoeba coli</i>	2
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Entamoeba coli</i> e <i>Giardia lamblia</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Endolimax nana</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	2
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Giardia lamblia</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	2
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Endolimax nana</i> , <i>Entamoeba coli</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Chilomastix</i> , <i>Endolimax nana</i> , <i>Entamoeba coli</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i> e <i>Endolimax nana</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Endolimax nana</i> e <i>Entamoeba coli</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Endolimax nana</i> , <i>Iodamoeba butschlii</i>	5
<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Entamoeba coli</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Dientamoeba fragilis</i> e <i>Endolimax nana</i>	3
<i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Endolimax nana</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Endolimax nana</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	3
<i>Endolimax nana</i> e <i>Entamoeba coli</i>	3
<i>Entamoeba coli</i> e <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
Total	46

Referência

- 1.- STARK D, BEEBE N, MARRIOTT D, ELLIS J, HARKNESS J. Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. J Clin Microbiol 2005; 43(6):2718-2723.
- 2.- STARK D, PHILLIPS O, PECKETT D, MUNRO U, MARRIOT D, HARKNESS J, ELLIS J. Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: An update on the cycle and host distribution. Vet Parasitol 2008; 151: 21-26.
- 3.- LAINSON R, SILVA B A M. 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; 94(5): 611-613.
- 4.- PEEK R, REEDEKER F R, VAN GOOL T. Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. J Clin Microbiol 2004; 42(2):631–635.
- 5.- STARK D, BEEBE N, MARRIOTT D, ELLIS J, HARKNESS J. Evaluation of three diagnostic methods, including Real-Time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. J Clin Microbiol 2006a; 44(1): 232-235.
- 6.- YANG J & SCHOLTEN T H. *Dientamoeba fragilis*: A review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission, and diagnosis. Am J Trop Med Hyg 1977; 26(1):16-22.
- 7.- MENGHI C I, GATTA C L, MAKIYA R, MÉNDEZ, O C. Detección molecular de *Dientamoeba fragilis* em heces: eliminación de los inhibidores de la DNA polimerasa. Parasitol Latinoam 2006; 61: 146-151.
- 8.- LAWRENCE D N, NEEL J V, ABADIE S H, MOORE L L, ADAMS L J, HEALY R G, KAGAN I G. Estudos epidemiológicos entre populações ameríndias da Amazônia III. Parasitoses intestinais em povoações recentemente contactadas e em aculturação. Acta Amazônica 1983; 13(2): 393-407.
- 9.- RIDEL O O, NORONHA M CC, SAMPAIO E M, MOREIRA T F, MAIA M J C, BARBOSA C S. Enteroparasitas detectados em amostras de fezes provindas de pacientes de Hospital Universidade em Fortaleza, Ceara, Brasil: I - protozoários amebianos Rev Med Univ Fed Ceará 1987; 27(2):29-33.

- 10.- CLARK, C. G. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. Mol Biochem Parasitol 1997; 87: 79-83.
- 11.- ABE N, NAGOSHI M, TAKAMI K, SAWANO Y, YOSHIKAWA H. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. Vet Parasitol 2002; 106: 203-212.
- 12.- STENSVOLD C R, SURESH G K, TAN K S W, THOMPSON A, TRAUB R J, VISCOGLIOSI E, YOSHIKAWA H, CLARK C G. Terminology of *Blastocystis* subtypes – a consensus. Trends in Parasitol 2006; 23(3): 93-96.
- 13.- ZAMAN V, HOWE J. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. Parasitol Res 1995; 81:465–469.
- 14.- STENZEL D J, BOREHAM P F L. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 563-584.
- 15.- BRITES C, BABERINO M G, BASTO M A, SÁ M S, SILVA N. *Blastocystis hominis* as a potencial cause of diarrhea in AIDS patients: a report of six cases in Bahia, Brazil. Braz J Infec Dis 1997; 1: 91-94.
- 16.- NETO V A, ALARCÓN R S R, GAKIYA E, FERREIRA C S, BEZERRA R C, SANTOS A G dos. Elevada porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo, SP. Rev Soc Bras Med Trop 2004; 37:354-356.
- 17.- NASCIMENTO S A, MONTINHO M L R. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga city, Paraná State, Brazil. Rev Inst Med Trop 2005; 47(4): 213-217.
- 18.- MARTINS L P A, SERAPIÃO A AP T B, VALENCIANO R F, PIRES J E C, CASTANHO R E P. Frequência de *Blastocystis hominis* e outras enteroparasitoses em amostras fecais analisadas no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Marília -SP. Rev Patol Trop 2007; 36(1): 47-53.
- 19.- JOHNSON J, CLARK C G. Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. J Clin Microbiol 2000; 38(12):4653–4654.
- 20.- MENGHI C I, MAKIYA R, GATTA C L, MÉNDEZ O C. *Dientamoeba fragilis*: Técnicas para dilucidar su modo de transmisión. Parasitol Latinoam 2005; 60:25-31.
- 21.- BÖHM-GLONING B, KNOBLOCH J, WALDRICH B. Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like DNA. Trop Med Int Health 1997; 2:711-778.

- 22.- NORBERG A, NORD C E, EVENGARD B. *Dientamoeba fragilis* - a protozoal infection which may cause severe bowel distress. Clin Microbiol Infect 2003; 9:65-68.
- 23.- 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): 553-570.
- 24.- VALLE L E T, MIESES M T, AGOBIAN G. Predominio de *Blastocystis hominis* sobre otros enteroparásitos en pacientes del municipio Palavecino, estado Lara, Venezuela Rev Cubana Med Trop 2006; 58(1):
25. PREISS U, OCKERT G, BROMME S, OTTO A. On the clinical importance of *Dientamoeba fragilis* infection in childhood. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1991; 35(1): 27-34.
- 26.- STARK D, BEEBE N, MARRIOTT D, ELLIS J, HARKNESS J. Dientamoebiasis: clinical importance and recent advances. Trends in Parasitol 2006b; 22(2): 92-96.
- 27.- GIRGINKARDESLER N, KURT Ö, KILIMCIOGLU A A, OK Ü Z. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: Evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. Parasitol Int 2008; 57: 72-75.
- 28.- DOYLE W P, HELGASON M M, MATHIAS R G, PROCTOR E M. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol 1990; 28(1): 116-121.
- 29.- SHEEHAN D J, RAUCHER B G, MCKITRICK J C. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. J Clin Microbiol 1986; 24: 548-550.
- 30.- AYADI A, BARRI I. *Dientamoeba fragilis*: flagelle pathogene. Bull. Soc. Pathol. Exot. 1999; 5: 299-301.
- 31.- STENSVOLD C R, ARENDRUP M C, JESPERGAARD C, MOLBAK K, NIELSEN H V. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA- based methods: a comparative study. Diagnostic Microbiol Infect Dis 2007; 59: 303-307.
- 32.- ÖZYURT M, KURT O, MOLBAK K, NIELSEN H V, HAZNEDAROGLU T, STENSVOLD C R. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. Parasitol Inter 2008; 57: 300-306.

9 ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 076/2007

Título: “Prevalência e Caracterização de Dientamoeba Fragilis (Protozoa : Trichomonadidae) em amostras fecais de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília”

Pesquisador responsável: César Augusto Cuba Cuba

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es).

Data de entrada: 20/12/2007

Proposição do(a) relator(a)

Aprovação

Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 18/03/2008

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 26/03/2008


PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** *ad referendum*, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;

2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 11 de Abril de 2008.


Prof.ª Maria Helena de Azevedo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina - UnB

10 ANEXO B – TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O projeto intitulado “**Prevalência e caracterização de *Dientamoeba fragilis* (Protozoa: Trichomonadidae) em amostras fecais de pacientes atendidos no hospital HUB no Distrito Federal**” visa a melhoria da qualidade de vida da população por meio da identificação de um parasito pouco conhecido entre os laboratórios de análises clínicas, o *Dientamoeba fragilis* (um protozoário parasito do trato gastrointestinal de humanos que é associado a infecções intestinais e diarreias).

Este trabalho tem por objetivo verificar a prevalência e caracterizar *D. fragilis* em amostras fecais de pacientes atendidos pelo HUB. Para esse fim, o material coletado no Departamento do Laboratório de Análises Clínicas, será analisado pela mestranda Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi.

Adverte-se que o material fecal coletado tem que estar fresco, ou seja, não pode estar fixado com nenhum preservador de fezes utilizados nos Laboratórios de Análises Clínicas, pois em razão de o *D. fragilis* não apresentar forma de cisto no seu ciclo de vida, fixadores comuns não conseguem preservar este parasito. O material fecal, portanto, após transportado para o Laboratório de Parasitologia da UnB será fixado com SAF (um fixador que consegue preservar o *D. fragilis*, mantendo suas formas intactas).

Pede-se, por meio deste TCLE, permissão para a análise de suas amostras fecais para os fins já explicitados.

Enfatiza-se que a adesão é voluntária e garante-se o sigilo total dos resultados, os quais estarão à disposição do paciente para consultas a qualquer momento.

Fica desde já assegurada, a qualquer momento, a possibilidade de desistência da participação no projeto.

Informa-se que todos os gastos financeiros deste projeto serão arcados pelo próprio projeto de pesquisa proposto.

Atenciosamente,

Eu li e compreendi todos os itens do Termo de Consentimento Livre Esclarecido e autorizo a coleta de minhas amostras fecais.

Nome do Paciente: _____

RG: _____

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura: _____

Pesquisador Responsável: Prof. César Augusto Cuba Cuba

Telefone de Contato: 3307-5529

e-mail: cuba@unb.br

Pesquisadora: Mestranda Thaís T. C. e S. Minuzzi

Telefone de Contato: 3307-2259

e-mail: thaistam@yahoo.com.br

Nome do arquivo: mono%20com%20paginas%20parte%20[1]
Pasta: E:\MESTRADO MONO\versão final
Modelo: C:\Documents and Settings\Rodrigo\Dados de aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dot
Título: 1 INTRODUÇÃO
Assunto:
Autor: Rodrigo
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 8/3/2010 19:26:00
Número de alterações:6
Última gravação: 11/3/2010 09:47:00
Salvo por: Rodrigo
Tempo total de edição: 42 Minutos
Última impressão: 11/3/2010 09:49:00
Como a última impressão
Número de páginas: 78
Número de palavras: 15.513 (aprox.)
Número de caracteres: 83.771 (aprox.)