



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Positividade de *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em animais de
produção da Microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil**

Aluno

Andrey Reis de Carvalho

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Cristina Cury

Uberlândia

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Positividade de *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em animais de
produção da Microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil**

Aluno

Andrey Reis de Carvalho

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª Márcia Cristina Cury

Coorientadora

MSc^ª. Camila Oliveira Silva Barbosa

Uberlândia,

2018

ANDREY REIS DE CARVALHO

Positividade de *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em animais de produção da Microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

Monografia apresentado à coordenação do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Cristina Cury

Uberlândia, 14 de dezembro de 2018.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Marcia Cristina Cury
Universidade Federal de Uberlândia

Dr^a. Maria Júlia Rodrigues da Cunha
Universidade Federal de Uberlândia

Msc. Douglas Alves Pereira

UBERLÂNDIA

2018

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais que não pouparam esforços para me verem formando.

A Deus por ter permitido e me dado forças para que eu chegasse até o final da minha graduação.

A minha família que sempre acreditou no meu potencial.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Marcia, por ter acreditado na minha capacidade e por todos os conhecimentos que me foi passado durante o todo o período de orientação e pela paciência.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado e que fizeram da minha graduação uma fase a ser recordada eternamente.

Agradecer a Dr^a Maria Júlia e ao Msc. Douglas, por terem aceitado o meu convite para participar da banca examinadora do meu TCC 2.

A todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 <i>Blastocystis</i> spp.	7
1.2 <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	10
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAL E MÉTODOS:	16
4.1 Comitê de Ética.....	16
4.2 Área do Estudo:	16
4.3 População do estudo:	16
4.4 - Instrumento de coleta de dados	17
4.5 Coleta das amostras fecais.....	17
4.6 Processamento do material fecal:	17
4.6.1 Extração do DNA das amostras fecais:.....	18
4.6.2.Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	18
4.6.3 Eletroforese em gel de agarose.....	18
4.6.4 Reação de nested-PCR.....	18
5. Análise Estatística	19
6.Resultado	20
7. Discussão	22
8. Conclusão	25
9. Referências Bibliográficas.....	26
10. Comprovante de submissão ao Comitê de Experimentação Animal (CEUAUFU).....	33
10.1 ANEXO 1.....	33

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos três maiores produtores e exportadores de alimentos do planeta. Porém, o mundo espera mais do nosso país, pois de acordo com a FAO, o Brasil precisa contribuir com 40% do objetivo de dobrar a produção de alimentos até 2050, para saciar a fome da população mundial, que terá 9,8 bilhões de pessoas. No caso da carne bovina, a meta é dobrar a produção de 9,5 milhões de toneladas para 19 milhões de toneladas. O Ministério da Agricultura projeta que, até 2021, o Brasil deve ser líder no fornecimento de alimentos no mundo, produzindo mais grãos, carnes, proteína vegetal e animal do que os demais países.

Médicos Veterinários e criadores tem como função dar subsídio para que os animais de produção consigam desempenhar potencial zootécnico. Dessa forma tem se melhor padrão genético dos animais e conseqüentemente, aumento da produtividade dos produtos de origem animal. O aumento em produtividade, também, se baseia em outros elementos importantes, tais como o aumento do ganho de peso dos animais, a diminuição na mortalidade, o aumento nas taxas de natalidade e também, na expressiva diminuição na idade ao abate, isso fara que haja melhora nos índices de desfrute do rebanho, que pode evoluir para até 25%.

As ações de manejo relacionado com a maior produtividade de animal tornam a exploração pecuária mais intensa como o aumento da densidade animal relativa, levando à maior incidência dos problemas sanitários.

Blastocystis spp. e *Enterocytozoon bieneusi* são parasitos ubíquos comuns do trato gastrointestinal de humanos e de outros animais (LEE, 2008). Porém, esses microrganismos são pouco conhecidos e informações como, taxonomia, ciclo de vida e transmissão para os hospedeiros não foram totalmente elucidados (BOREHAM e STENZEL 1996).

Muito do que se sabe sobre *Blastocystis* spp. foi mencionado por Zierdt nas décadas de 70 e 80, porém a descrição taxonômica do parasito somente foi realizada em 1991 com advento da microscopia eletrônica (TAN, 2004). A partir desse período vários estudos de prevalência foram realizados sendo o parasito observado em humanos e também, em animais de produção, aves silvestres, repteis e ratos (BOREHAM e STENZEL, 1996). A partir do desenvolvimento das técnicas moleculares a taxonomia e morfologia foram revistas evidenciando forte sugestão de ser organismo com potencial zoonótico (TAN, 2004).

Infecções por microsporídios estão associadas com vários sintomas clínicos em humanos entretanto, é pouco conhecido a ação nos animais. Esses patógenos são eucariotos unicelulares que formam esporos, sendo um grupo diverso de parasitos que infectam várias células eucariotas de numerosos hospedeiros invertebrados e vertebrados.. Dentre essas espécies duas são responsáveis por doenças gastrointestinais, *Enterocytozoon intestinalis* e *Encephalitozoon intestinalis* os quais são mais frequentemente envolvidos em infecção humana (DESPORTES et al., 1993; HARTSKEERL et al., 1995).

A presença de formas infectantes desses patógenos em fontes de água e alimento representa séria ameaça à saúde pública, podendo causar surtos de origem hídrica e alimentar. Descargas de águas residuais em água de superfície podem causar acúmulo de cistos e esporos em fontes de água potável. Além disso vários animais podem se infectar propagar e disseminar os parasitos no meio ambiente pelas fezes (CUNHA, 2017).

Apesar dos parasitos terem sido descritos há muitos anos as características relacionadas à patogenicidade, transmissão, epidemiologia e caráter zoonótico não estão bem elucidadas.

1.1 *Blastocystis* spp.

É um dos microrganismos mais comuns que infectam intestino de humanos e animais (STENZEL, BOREHAM, 1996; TAN, 2004; TAN, 2008). Está presente em países desenvolvidos e em desenvolvimento e, estudos têm demonstrado que apresenta potencial zoonótico (TAN, 2004; SANTÍN; FAYER, 2011). Este tem baixa especificidade de hospedeiros tendo sido isolado em uma variedade de animais como primatas não humanos, aves, anfíbios, bovinos, anfíbios, roedores e moscas.

Muitos pesquisadores tem dificuldade em classificar *Blastocystis* e erroneamente o descrevem como cistos de flagelado, material vegetal, leveduras e fungos. Zierdt(1991) o classificou como esporozoário, entretanto pesquisas moleculares observaram que o parasito não tinha afinidade com fungos, sarcodíneos ou esporozoários. Na mais recente Cavalier-Smith (1998) inseriu o parasito no Reino Chromista, Filo Opalinata, Classe Blastocystea, Ordem Blastocystida, Família Blastocystidae. Essa classificação marca o *Blastocystis* como o primeiro chromista conhecido parasitando humanos e animais.

O gênero é composto por duas espécies sendo *Blastocystis* spp. (syn. *B. hominis*) que parasitam intestino delgado e grosso de humanos e outros mamíferos e *Blastocystis* spp. (Syn e *Blastocystis gallinarium*) que parasitam o intestino grosso e ceco de galinhas e faisões. O

parasito apresenta pouca especificidade quanto ao hospedeiro, de modo que os nomes das espécies são considerados redundantes e são, denominados como subtipos (ST1-ST10)

Morfológicamente é microrganismo polimórfico sendo reconhecidas a forma vacular, granular, ameboide e cística, não havendo informações de como ocorre a transição de uma forma para a outra.. Até o momento, acredita-se que a transmissão seja por ingestão de água, alimentos contaminados por fezes de animais e pessoas infectadas com cistos, forma resistente (LEELAYOOVA et al., 2005; YOSHIKAWA et al., 2004).

Dados epidemiológicos mostraram a possível relação entre a presença de *Blastocystis* spp. e patógenos secundários sendo o parasito classificado como agente patogênico (TAN, 2008).

Apresenta morfologia pleomórfica a qual muda, durante o ciclo de vida, entre ameboide, vacuolar, granular e cística, sendo a identificação problemática (TAN, 2008).

Estudos em animais demonstraram que a forma cística do parasito, por ser resistente à água e a fatores ambientais, pode ser considerada a forma de transmissão (SURESH et al., 1993; MOE et al., 1997). A forma cística pode ser transmitida por alimentos, água e por contato direto entre pessoas (HOTEZ, 2000; TAN; SURESH; SMITH, 2008; FLETCHER, 2012).

O ciclo de vida (FIGURA 1) não está bem elucidado, devido a falta de modelo animal, adequado, para o estudo dos aspectos da biologia do parasito, entretanto existe consenso entre diferentes autores que, a forma infectante é o cisto.

Após os cistos serem ingeridos pelo hospedeiro, passam pelo processo de desencistamento no intestino grosso e, se desenvolve para a forma vacuolares as quais podem se dividir (divisão binária) e evoluírem para as formas ameboide ou granular. Em algumas formas granulares ocorre o encistamento durante a travessia pelo colón, antes da excreção nas fezes (TAN, 2008)

A transmissão para os hospedeiros não está bem clara, mas pode estar associada à rota fecal-oral, contato com animais infectados e com ingestão de alimentos e água contaminados os cistos do parasito (PARKAR et al., 2007).

A patogenicidade de *Blastocystis* spp. é controversa e estudos são necessários para a compreensão das infecções associadas aos diferentes subtipos bem como o potencial zoonótico, uma vez que as infecções em humanos são frequentemente associadas ao contato direto com animais infectados (YOSHIKAWA et al., 2008). Nos sintomáticos as manifestações clínicas são inespecíficas e incluem dor abdominal, náuseas, diarreia, síndrome do intestino irritável (IBS) e lesões cutâneas alérgicas (YAKOOB et al., 2010)

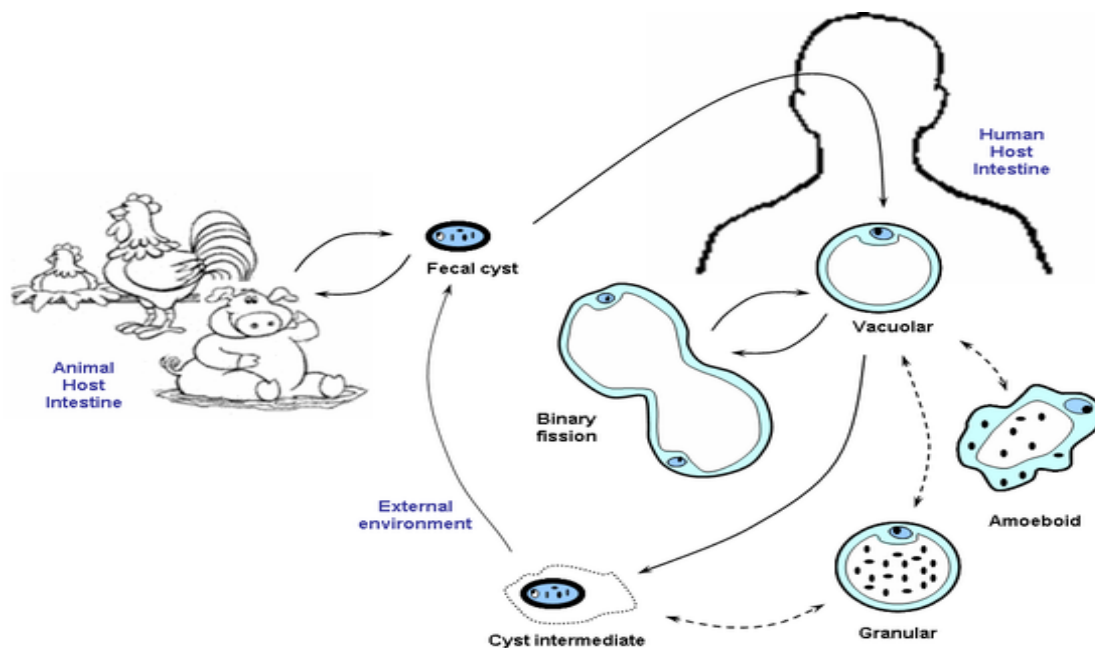
Alguns animais parecem exibir maior prevalência de *Blastocystis* tais como ratos de laboratório (60%), porcos (70 a 95%), aves (50 a 100%) e bovinos (95 a 100%)(TAN, 2004). Devido a isso esse grupo de animais é considerado fontes zoonóticas de transmissão para humanos. A prevalência em outros animais é variável sendo observado em cães domésticos e coelhos domésticos no Japão (TAN,2004). No Brasil, um estudo realizado em Uberaba demonstrou que porcos, ovelhas, bovinos e cães podem ter positividade (FRANCO MOURA et al.,2018). David et al. (2015), em São Paulo (SP), pela PCR, observaram que 53,13% dos humanos estavam positivos para *Blastocystis* sp. e os cães todos negativos.

O parasito está dividido em 17 subtipos (STs) nos quais humanos podem se infectar por nove, sendo ST3 e ST9 encontrados apenas em humanos. Os subtipos 1, 2, 5 e 8 podem ser encontrados em humanos e animais (primata, suínos, bovinos), o ST4 em roedores e o ST6, 7 e 8 em aves. Os subtipos 10 a 17 são exclusivamente encontrados em animais, sendo o ST10 e 15 em *Artiodactyla* e primatas não humanos; ST11 em *Proboscidea*; ST12 em *Artiodactylae* marsupiais; ST13 em primatas não humanos e marsupiais; ST14 em *Artiodactyla*;ST16 em marsupiais e ST17 em roedores (WAWRZYNIAK et al., 2013). Estudos realizados na Europa, África, Ásia, Oceania e Oriente Médio demonstraram que o subtipo mais encontrado em infecções humanas é o ST3(WAWRZYNIAK et al., 2013).

Pesquisas sobre as seqüência de genes desse parasito em relação a transmissão cruzada entre animais e humanos, sugere que os STs de origem animal possuem potencial zoonótico e, provavelmente, são capazes de infectar humanos (WAWRZYNIAK et al., 2013). No Brasil até o momento observou-se a predominância do subtipo 1 (FRANCO MOURA et al.,2018).

As formas de diagnóstico de variam entre técnicas de coloração, exame direto das fezes, cultura, flutuação em formol-éter e mais recentemente, por reação em cadeia de polimerase (PCR). Devido à diversidade morfológica do parasito a utilização de microscopia de luz não é problema, pois pode ser confundido com outros microrganismos (STENSVOLD et al., 2007). Novos protocolos de PCR têm sido desenvolvidos na tentativa de melhorar o diagnóstico de *Blastocystis* spp. (SANTIN et al.2011; ABE; KIMATA; ISEKI 2009; YOSHIKAWA et al., 2004).

Figura 1.



Fonte: Casavechia, Maria Teresa; 2013

1.2 Enterocytozoon bienewsi

O Filo Microsporídia consiste em mais de 140 gêneros e com mais de 1200 espécies, infecta animais invertebrados, vertebrados (DIDIER et al., 1995). Em humanos apenas oito gêneros e 14 espécies são responsáveis pela infecção. As espécies de microsporídias mais comuns em humanos são o bienewsi, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis* e *Encephalitozoon hellem*. Dessas *Enterocytozoon bienewsi* é frequentemente diagnosticado do

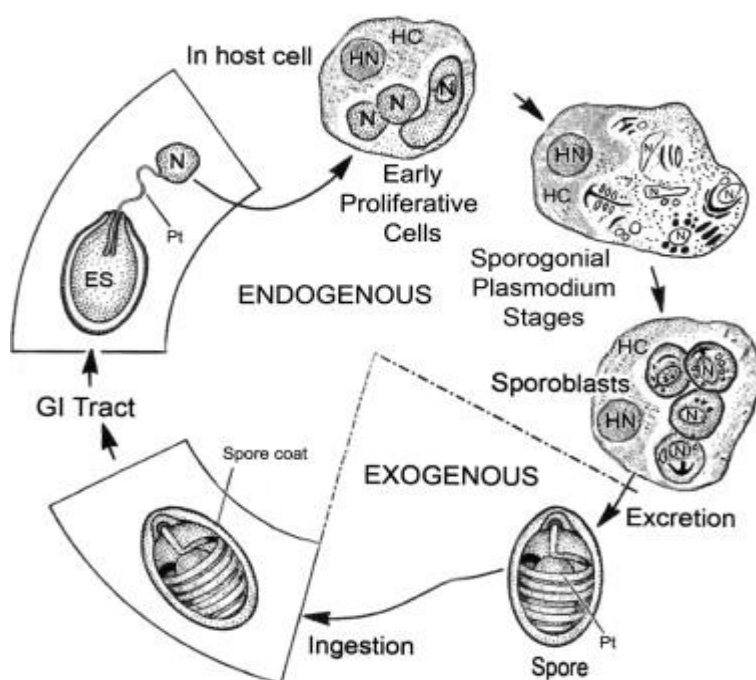
mundo é considerado patógeno oportunista em humanos imunocomprometidos, animais silvestre e domésticos. Historicamente esse parasito foi reconhecido como um dos patógenos na indústria animal no ano de 1857 (THELLIER e BRETON,2008). Entretanto a descrição completa foi realizada nos anos 80 pela microscopia eletrônica, sendo o parasito considerado como microrganismo oportunista que acometia pacientes com AIDS, causando diarreia crônica (DESPORTESI et al., 1985).

O esporo é a fase infectante, sendo a única encontrada fora da célula hospedeira. Possui forma oval, são pequenos (0,5 x 1,5 μm) e envolvidos por uma camada de glicoproteína. Possui membrana plasmática interna e dentro dessa, há o citoplasma que é o material infectante, com um único núcleo (KEELING.,FAST, 2002). Apresentam um aparelho de extrusão composto por um tubo polar e cloroplasto, permitindo que o esporo penetre e infecte a célula hospedeira. Os esporos do parasito são eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados e são resistentes no meio ambiente(SANTIN, 2010).

A transmissão ocorre por via fecal-oral por contato com animais e humanos infectados, por água e alimentos contaminados com esporos do parasito. (DIDIER et al., 1995; SANTÍN, 2011; GALVÁN-DÍAZ et al., 2014). Tem sido encontrado em várias fontes de água, potável, em efluentes de estações de tratamento e águas de irrigação, sugerindo que essas fontes podem ser veículos para a transmissão do parasito para o homem e animais (FIUZA et al., 2016).

O ciclo de vida inicia com a ingestão dos esporos pelo hospedeiro (animal ou humano). Os esporos, pelos tubos polares, inoculam o citoplasma e o núcleo da célula hospedeira iniciando o crescimento e a divisão do parasito. Após a divisão, há o desenvolvimento do aparelho de extrusão. Núcleos individuais, com tubos polares amadurecem e transformam-se em esporoblastos que se desenvolvem em esporos maduros, os quais são excretados nas fezes podendo infectar outros hospedeiros. (Figura 2)

Figura 2.



Fonte: Santin e Fayer (2011).

A prevalência é variável, mas em grande parte os países em desenvolvimento apresentam maior prevalência, do que países desenvolvidos. Este fato pode estar associado aos hábitos de higiene, a exposição dos animais ao parasito e o consumo de comida e água contaminados (DIDIER et al., 1995).

São reconhecidos até o momento 204 genótipos baseados na análise da região ITS, identificados em água e animais da zona rural e urbana, incluindo suínos, bovinos, cães, gatos, cabras e lhama (DENGIEL et al., 1996; SANTÍN et al., 2006). Uma variedade de genótipos zoonóticos (Exemplo: D, EbpC, IV, WL11) e alguns adaptados ao hospedeiro (predominantemente o PtEb IX discordante) contribuíram para infecções por *E. bieneusi* em

gatos e cães (Santin et al., 2006; Abe et al., 2009 , Zhang et al., 2011). Evidenciando que o papel de animais de estimação na transmissão zoonótica de microsporidiose pode ser mais comum do que se acredita atualmente.

E. bienersi foi confirmado por PCR e microscopia eletrônica como o único patógeno entérico encontrado em cinco dos 11 pacientes incluídos em um estudo de 40 indivíduos HIV + com diarreia crônica no estado do Rio de Janeiro (Brasil et al.,2000). Trabalhos como os de Lee(2008), Santin, Fayer, (2009), Santin(2010) determinaram a prevalência em bovinos, equinos em vários países do mundo.

Infecções por *E. bienersi* estão mais associadas ao trato gastrointestinal com diarreia crônica (MOLINA et al., 1993), podendo, também, causar danos ao trato respiratório, mais relatado em pacientes imunocomprometidos (BOTTEREL et al., 2002; SODGI et al., 2004).

Os métodos de diagnóstico como a microscopia de luz e eletrônica são dificultados devido ao pequeno tamanho dos esporos do parasito (0,5 x 1,5 μ m) e 'kits' comerciais para ensaio sorológico não estão disponíveis (SAK et al., 2008; WEBER et al., 1994). Devido a essas dificuldades, o diagnóstico molecular pela PCR tem sido utilizado para detectar *E. bienersi*, sendo metodologia de alta sensibilidade, com a possibilidade de identificar genótipos e espécies (MUNGTHIN , 2005; RINDER et al., 1998).

2. JUSTIFICATIVA

Blastocystis spp. e *E. bienewisi* são parasitos comuns do trato gastrointestinal de humanos e de outros animais, tanto em países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. Atualmente são considerados protozoários com potencial zoonótico, com possibilidades de gerar perdas econômicas de forma indireta para os animais.

A fácil disseminação ambiental desses parasitos pode levar a surtos epidêmicos de transmissão hídrica, fazendo com que animais e também humanos tenham importância epidemiológica na disseminação dos esporos. Apesar dos animais serem considerados potenciais desse parasito, porém poucos estudos descrevem o papel desses na cadeia de transmissão.

No Brasil existem poucos trabalhos associados a esses parasitos, não havendo grandes levantamentos epidemiológicos assim como, também, quais subtipos são os mais importantes. Nas microrregiões de Uberaba e de Uberlândia, existem apenas dois trabalhos envolvendo o *Blastocystis* spp. *E. bienewisi*, em animais de fazenda e domésticos respectivamente.

O setor pecuário brasileiro tem destaque econômico ampliando os sistemas produtivos nos quais é necessário o aumento da concentração de animais nos criadouros levando a maior possibilidade de dispersão e infecção de patógenos. Baseado nisso faz-se necessário estudos que deem maior conhecimento e atenção a esses parasitos e, conseqüentemente avalie os impactos que os mesmos promovem sobre os animais de produção.

3. OBJETIVOS

Geral:

Determinar a positividade de *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* pela PCR em amostras fecais de animais procedentes de propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, Minas Gerais.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Comitê de Ética

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo 089/15 (ANEXO 1).

4.2 Área do Estudo:

A área a ser estudada será a microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. A microrregião possui nove municípios: Araguari, Araporã, Campina Verde, Cascalho Rico, Indianópolis, Monte Alegre de Minas, Prata, Tupaciguara e Uberlândia, que representa 70% da demanda desta região. Pertence a mesorregião do Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro com população estimada em 838.094 habitantes, segundo censo do IBGE realizado em 2012, e área total de 18.790Km². Apresenta temperatura média de 23,1°C e índice pluviométrico de 1500 a 1600 mm³.

A microrregião é composta por várias propriedades rurais de pequeno, médio e grande porte, nas quais são criadas várias espécies de animais de produção como bovinos, suínos, equinos, aves, dentre outros. Por ser polo agropecuário, muitas indústrias de alimentos de origem animal se instalaram na região, fazendo com que o efetivo das espécies criadas e dos produtos da pecuária passassem a ter grande importância para a economia regional e do Brasil.

4.3 População do estudo:

As fazendas do estudo foram escolhidas a partir de cadastramento de Médicos veterinários da região. Sendo o único pré-requisito era a propriedade rural e fazer parte da microrregião de Uberlândia e possuir animais de produção tais como bovinos, suínos e galinhas.

Antes do início do trabalho os proprietários foram contatados e a equipe explicou os objetivos do mesmo. Após a concordância em participar foi entregue um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinatura.

4.4 - Instrumento de coleta de dados

A população do estudo consistiu de bovinos, suínos e galinhas independente de idade, raça, sexo e aptidão.

4.5 Coleta das amostras fecais

Para a coleta das amostras fecais os bovinos foram colocados em bretes de contenção, seguindo-se rigorosamente as técnicas de contenção semiológicas. Nestes a coleta foi realizada diretamente na ampola retal, sendo as mesmas coletadas em sacos plásticos identificados com o número da fazenda e data da coleta.

Para os suínos/porcos e galinhas presentes nas propriedades, as fezes foram colhidas do chão do recinto em forma de 'pool' (de quatro pontos do recinto) informando-se o número de animais presentes naquele local e, quando possível recolhida individualmente. No momento da coleta foi obtido o material da parte superior do bolo fecal, que não esteja em contato com o solo. As amostras foram colocadas em frasco coletor identificados com número da propriedade, dados do animal e data da coleta.

Todas as amostras coletadas foram armazenadas em caixas térmicas contendo gelo e transportadas ao Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos da Universidade Federal de Uberlândia para processamento.

4.6 Processamento do material fecal:

No laboratório as fezes foram aliquotadas e colocadas a temperatura de -3 °C até a realização do PCR e Nested-PCR em até 14 dias.

4.6.1 Extração do DNA das amostras fecais:

O DNA das amostras fecais será extraído utilizando o kit de extração QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen™, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído será armazenado sobre refrigeração a -20°C até a realização da PCR.

4.6.2. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Fragmentsos de 479 pb do gene SSU rDNA foram amplificados, de acordo com a metodologia previamente descrita por Satín et al. (2011) utilizando os seguintes primers:

Forward – Blast 505–532 (5' GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3')

Reverse – Blast 998–1017 (5' TGC TTT CGC ACT TGT TCATC 3')

4.6.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) [1M Tris-HCl (pH 8.0), 0,83M ácido bórico, 20mM EDTA] e revelados com Brometo de Etídio (0,5µg/mL). O gel foi observado em transluminador ultravioleta, para a visualização dos produtos amplificados e os fragmentos de DNA foram analisados, comparativamente, com marcadores de DNA de 100 pares de base.

4.6.4 Reação de nested-PCR

A nested-PCR será realizada primeiramente para amplificar um fragmento de 243 pares de bases (pb) das subunidades ribossômicas do gene rRNA de *Enterocytozoon bienersi*, utilizando os primers, externos: EBITS3 (5' GGTCATAGGGATGAAGAG 3') e EBITS4 (5' TTC-GAGTTCTTTTCGCGCTC 3') e internos: EBITS1 (5' GCTCTGAATATCTATGGCT 3') e EBITS2.4 (5'ATCGCCGACGGATC-CAAGTG 3'), seguindo protocolo de Fiuza et al., 2015. A reação será realizada com 50 µl de volume final contendo, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 2,0 mM Tris-HCl (pH = 9), 0,2 mM dNTPs, 50 pmol de cada um dos quatro primers, 2,5 U de Taq e 2,5 µl of BSA (0,1 g/10 ml). A desnaturação inicial será realizada a 94°C por 3 minutos e 35

ciclos para desnaturação a 94°C por 30 segundos, e extensão a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos, com extensão final de 72°C por 10 minutos. A segunda reação será realizada nas mesmas condições da primeira, exceto na extensão que será realizada com 30 ciclos a 55°C. Em todas as reações serão utilizados controles positivos e negativos.

4.6.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados por coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL). O gel será observado em transluminador ultravioleta, para a visualização dos produtos amplificados e os fragmentos de DNA foram analisados, comparativamente, com marcadores de DNA.

5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa Graph Pad Prism 6, entre os positivos e negativos, por teste de Wilcoxon, não paramétricos para amostras independentes de 2 grupos. Que mostrou um $P=0.3333$, mostrando que não há diferença significativa entre as amostras testadas por baixo N.

E os demais dados sendo analisados de forma descritiva.

6.Resultado

Foram analisadas 44 amostras fecais 24 bovinos, 11 galinheiros e 9 pool de amostras de suínos, os quais foram procedentes de seis propriedades rurais.

Do total 39 (88,6%) amostras apresentaram positividade (Tabela 1) para algum tipo de parasito em estudo, sendo 29 (74,35%) positivos para *Blastocystis* spp. e 12 (30,76%) positivos para *Enterocytozoon bieneusi*.

Tabela 1. Positividade de *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* de amostras fecais de animais procedentes da microrregião de Uberlândia de abril a dezembro de 2017, utilizando-se PCR e Nested-PCR

Tabela 1.

	Nº de amostras avaliadas	Nºde amostras infectadas	%	Infeções concomitantes de <i>Blastocystis</i> spp. e <i>Enterocytozoon bieneusi</i>
Bovinos	24	21	87,5%	3
Suínos	9	9	100%	2
Galinhas	11	9	81,8%	1
TOTAL	44	39	88,6%	6

Tabela 2.

	<i>Blastocystis</i> spp.	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>
Bovinos	16 (41,02%)	5 (12,8%)
Suínos	9 (23,07%)	2 (5%)
Galinhas	4 (10,2%)	5 (12,8%)

As espécies positivas para *Blastocystis* spp. foram 16 bovinos(41,02%), 4 pool de galinhas(10,2%) e 9 pool de suínos (23,07%) (Figura 3) e, para *Enterocitoozon bieneusi* foram 5 bovinos(12,8%), 5 pool de galinheiros(12,8%) e 2 pools de suínos(5%) (Figura 4).

Nas propriedades avaliadas N=6, pelo menos um animal foi positivo para os parasitos pesquisados.

Figura 3.

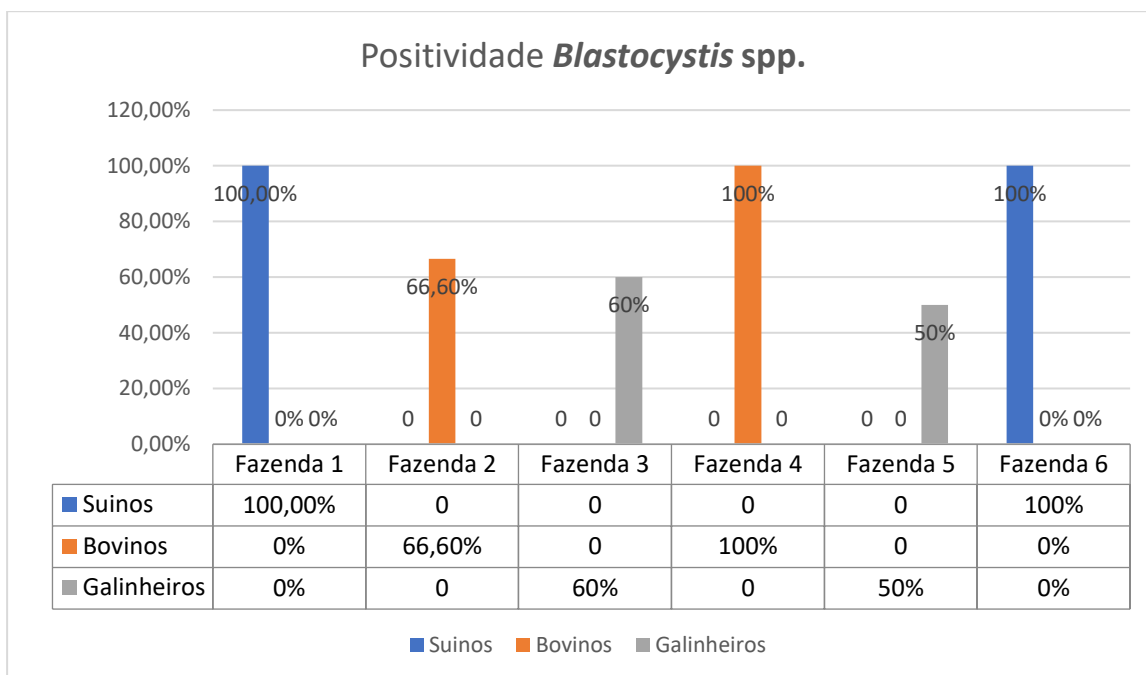
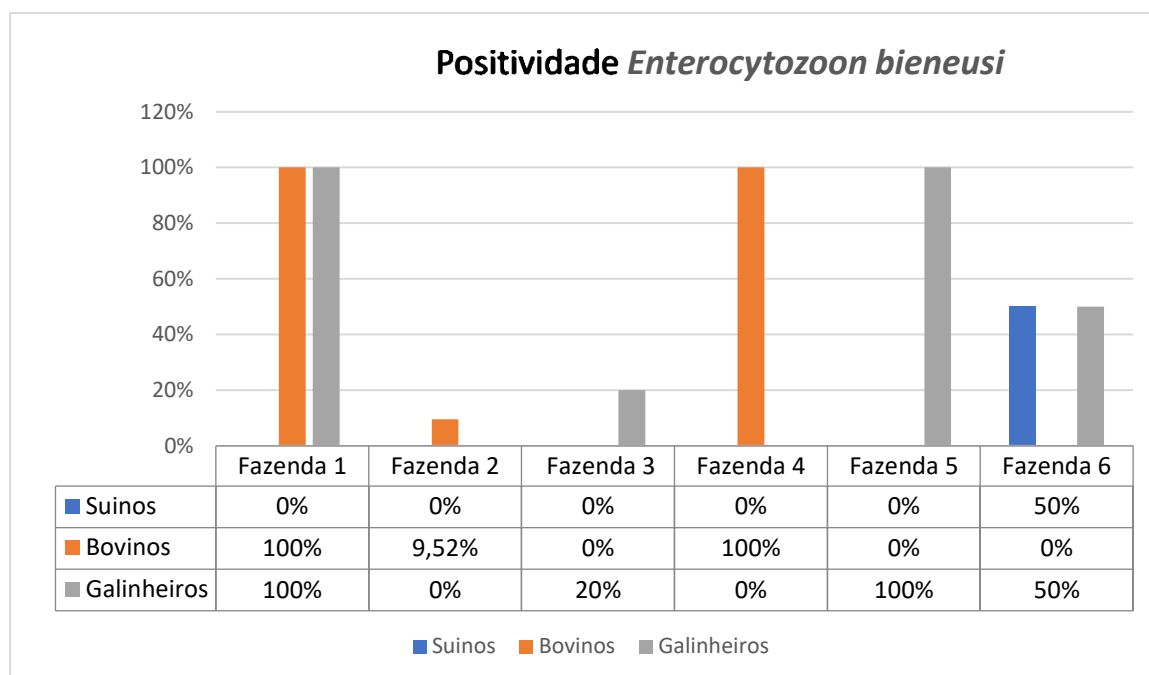


Figura 4.



7. Discussão

Os parasitos transmitidos por agua tem importância medica e medica veterinária. *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bienewisi* são talvez os menos compreendidos. Porém nos últimos anos tem surgido interesse dos pesquisadores por estes parasitos devido pela possível associação com desordens intestinais que podem levar a prejuízos econômicos em animais de produção.

Blastocystis spp. é um parasito extremamente comum com distribuição mundial, sendo o protozoário comumente observado em levantamentos parasitológicos em humanos e animais (Tan, 2004). Avaliação de *Blastocystis* spp. no Brasil é ainda pouco realizada principalmente em relação aos genótipos presentes. Nesse estudo a positividade observada demonstra a presença de *Blastocystis* spp. nos animais de produção da região. Estes resultados corroboram com os de Franco Moura et. al (2018) que observaram porcos, ovelhas, gatos, bovinos e cães com o parasito no triangulo mineiro.

Nesse presente estudo a positividade observada foi semelhante de Lee et al. (2018) na Tailândia o qual avaliou animais de produção pela PCR. Entretanto a taxa geral de infecção nesta pesquisa foi maior do que as relatadas por Zhu et al. (2017) na China e Badparva et al.,

2015) no Irã, Fayer et al., (2011) nos Estados Unidos, Alfellani et al., (2013) no Reino Unido, Moura Franco (2018) aqui no Triângulo Mineiro. A prevalência nos animais é variável, sendo um estudo realizado por um grupo japonês (Abe et al., 2002) revelou que as infecções por *Blastocystis* podem ser comuns em bovinos (71%) e baixos em cães domesticados (0%) enquanto outros observaram o contrário com uma prevalência de 1,8% para bovinos (Quilez et al., 1995) e 71% em cães (Duda et al., 1998). As diferenças de resultados podem estar associadas ao número amostral, a técnica empregada diferenças ambientais, fatores geográficos e de manejo dos animais. Mesmo na mesma espécie ou raça, a incidência pode variar pois estes fatores e que vão influenciar na presença ou não do parasito.

Nessa pesquisa demonstrou a positividade em bovinos(41,02%), galinhas (10,2%) e suínos(23,02%). A ocorrência do parasito foi maior em bovinos não estando de acordo com a literatura que demonstra maiores prevalências em suínos como Abe et al (2002) e Belleza et al. (2016). Em galinhas existem poucos trabalhos(Yamada et al. 1987; Belova e Kostenko, 1990) que mencionam a prevalência, entretanto essa prevalência indica ser alta e maior do que a encontrada nesse estudo.

Apesar de não ter realizado caracterização genotípica nesses animais, a alta prevalência em bovinos e suínos nesse estudo sugere que esses animais podem servir como fonte de infecção para outras espécies e para as pessoas que manejam os animais. Parkar et al.,(2007) demonstrou que tratadores de animais tinham o mesmo genótipo encontrado nos animais. Além disso esses animais são fonte de contaminação de água a qual pode ser usada para consumo e também para irrigação de plantas.

O nível de contaminação ambiental o tamanho e resistência dos cistos aos métodos de tratamento e pobre remoção de cisto no processo de filtração permitem a transmissão zoonótica.

E. bienersi é patógeno entérico emergente e oportunista, capaz de acometer várias espécies de vertebrados.

Nesse estudo foi observada a presença do parasito nas três espécies avaliadas, apesar da positividade ser menor quando comparada a *Blastocystis*. O valor encontrado nesse trabalho(30,76%) vem de encontro ao que descreve a literatura a qual varia entre 1% a 49% de prevalência.

Em bovinos a presença desse parasito foi relatado em diversos países e continentes entre tanto no Brasil informações são escassas, havendo apenas o de Fiuza et al. (2016). Os autores encontraram 17,5% de prevalência sendo este resultado maior do que o encontrado

nesse estudo. No mundo foi relatado 14,2% na Argentina (Del Coco et al., 2014), 18% na África do Sul (Abu Samra et al., 2012) e 14,9% na Coréia (Lee, 2007). Porém, nos Estados Unidos 4,4% e 9,5% (Sulaiman et al., 2004) e na China 5% (Ma et al., 2015) foram menores que a presente pesquisa.

Pesquisas em suínos utilizando ,PCR, demonstram taxa entre 30% a 60% (BUCKHOLT et al. 2002; FIUZA et al. 2015.), valores maiores do que os apresentados neste presente trabalho.

Nas aves esse parasito foi reportado nas ordens galiformes, columbiformes, passeriformes dentre outras(CUNHA, 2017). No Brasil foi identificado em pombos, aves exóticas e em aves domesticas(LALLO et al. 2012; CUNHA,2017).

Os valores de positividade observados nessa pesquisa corroboram com os achados de vários autores e localidades no mundo os quais utilizaram a PCR, variando de 1,4 a 49% de prevalência. Dessa forma os resultados desse estudo encontram-se dentro da faixa de positividade presente na literatura.

Essa diferença entre as prevalências citadas no Brasil/mundo e deste estudo podem ser reflexo da região estudada, número amostral, variação sazonal, diferença entre as técnicas empregadas e presença de inibidores nas fezes(BUCKHOLT et al. 2002).

A transmissão zoonótica do *Enterocytozoon bienesi* e o *Blastocystis* spp. tem sido descrita em infecções humanas após a exposição a animais infectados. Entretanto, o papel dos animais na transmissão de infecções humanas requer maiores estudos. Baseado nisso, a presença destes parasitos em animais de produção deve ser mais investigada para que se possa determinar os genótipos presentes, o risco zoonótico e o possível impacto econômico gerado por estes.

8. Conclusão

Enterocytozoon bienesi e o *Blastocystis* spp. estão presentes na microrregião de Uberlândia em bovinos, suínos e aves domésticas sendo *Blastocystis* spp. que apresentou maior positividade.

9. Referências Bibliográficas

ABE, N.; KIMATA, L.; ISEKI, M. Molecular evidence of *Enterocytozoon bieneusi* in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, p. 217-219, 2009.

AKIYOSHI, E. E.; MORRISON, H. G.; LEI, S.; FENG, X.; ZHANG, Q.; CORRADI, N.; MAVANIA, H.; TUMWINE, J. K.; KEELING, P. J.; WEISS, L. M.; TZIPIRI, S. Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. **PLoS Pathogens**, v. 5, e1000261, 2009.

Badparva E, Sadraee J, Kheirandish F. Diversidade genética de *Blastocystis* isolados de gado em Khorramabad, Irã. **Jundishapur J Microbiol.** 2015; 8: e14810.

BOTTEREL, F.; MINOZZI, C.; VITTECOQ, D.; BOUREE, P. Pulmonary localization of *Enterocytozoon bieneusi* in an AIDS patient: Case report and review. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4800-4801, 2002.

BOOROM, K.; SMITH, H.; NIMRI, L.; VISCOGLIOSI, E.; SPANAKOS, G.; PARKAR, U.; LI, L.H. ; ZHOU, X. N.; OK, U. Z.; LEELAYOOVA, S.; JONES, M. S. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. **Parasites & Vectors**, v. 1. N. 40, 2008.

BRETON, L.; BART-DELABESSE, E.; BILIGUI, S.; CARBONE, A.; SEILLER, X.; OKOME-NKOUMOU, M.; NZAMBA, C.; KOMBILA, M.; ACCOCEBERRY, I.; THELLIER, M. New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2580-2589, 2007.

CUNHA, Maria Júlia Rodrigues da. **Diagnóstico e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em aves das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, Brasil.** 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

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

DENGIEL, B.; ZAHLER, M.; HERMANN, W.; HEINRITZI, K.; SPILLMANN, T.; THOMSCHKE, A.; LOSCHER, T.; GOTHE, R.; RINDER, H. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 4495-4499, 2001.

DEPLAZES P., MATHIS A., MÜLLER C., WEBER R. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. *J Eukaryot Microbiol*, v. 43, n. 5, p. 93, 1996.

DESपोर्टESI, LE CHARPENTIER Y, GALIAN A, BERNARD F, COCHANDPRIOLLET B, LAVERGNE A, RAVISSE P, MODIGLIANI R. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. **J Protozool**, v.32, n. 2, p. 250-4,1985.

DOGRUMAN-AL, F.; DAGCI, H.; YOSHIKAWA, H.; KURT, O.; DEMIREL, M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. **Parasitology Research**, v. 103, p. 685-689, 2008.

FLETCHER, S. M.; STARK, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n.3, p. 420-449, 2012.

Hartskeerl RA, van Gool T, Schuitema ARJ, Didier ES, Terpstra WJ. Caracterização genética e imunológica do microsporidio *Septata intestinalis* Cali, Kotler e Orenstein, 1993: reclassificação para *Encephalitozoon intestinalis* . **Parasitologia**. 1995; 110 : 277-285.

HOTEZ P. **The other intestinal protozoa: enteric infections caused by *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, and *Dientamoeba fragilis*. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v.11, p.178 –181, 2000.**

IL Lee , Tan TC , PC Tan , Nanthiney DR , MK Biraj , KM Surendra , *et al.* **Predominância de *Blastocystis* sp. subtipo 4 em comunidades rurais, Nepal** *Parasitol Res.* , 110 (4) (2012) , pp. 1553 - 1562

LEE, J. H. **Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 1664-1666, 2008.

LEELAYOOVA, S.; SUBRUNGRUANG, I.; RAINGSIN, R.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P.; WOROPONG, J.; NAAGLOR, T.; MUNGTHIN, M. **Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* genotype a in a Thai orphanage.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, p. 104107, 2005.

Maria Teresinha Gomes Casavechia, *Blastocystis hominis: que bicho é esse?*. Dissertação: **Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia**, Universidade Estadual de Maringá, 2013; 10p.

MOE, K. T.; SINGH, M., HOWER J.; HO, L. C.; TAN, S. W.; CHEN, X. Q.; NG, G. C.; YAP, E. H. **Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice.** *Parasitology Research*, v. 83 (4), p. 319-325, 1997.

MOLINA, J. M.; SARFATI, C.; BEAUVAIS, B.; LÉMANN, M.; LESOURD, A.; FERCHAL, F.; CASIN, I.; LAGRANGE, P.; MODIGLIANI, R.; DEROUIN, F. **Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and biologic features.** *Journal of Infectious Diseases*, v. 167, p. 217-221, 1993.

MOURA, Renata Gregório Franco et al. **Occurrence of *Blastocystis* spp. in domestic animals in Triângulo Mineiro area of Brazil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 2018, vol.51, n.2, pp.240-243. ISSN 0037-8682. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0484-2016>.

MUNGTHIN, M. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* genotype a in a Thai orphanage. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 104-107, 2005.

RINDER, H.; JANITSCHKE, K.; ASPOCK, H.; Da SILVA, A. J.; DEPLAZES, P.; FEDORKO, D. P.; FRANZEN, C.; FUTH, U.; LEHMACHER, A.; MEYER, C. G.; MOLINA, J. M.; SANDFORT, J.; WEBER, R.; LOSCHER, T. Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of Microsporidia in stool specimens, **Journal of clinical microbiology**, v. 36, p. 1814-1818, 1998.

SAK, B.; KVEC, M. HANZLIKOVÁ, D.; ČAMA, V. First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v.153, p. 220-224, 2008.

SAMIEA, OBI CL, TZIPORI S, WEISS LM, GUERRANT RL. Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.101, n. 6, p. 547-54, 2007.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; VECINO, J. A.; DUBEY, P. J.; FAYER, R. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. **Veterinary Parasitology**, v.141, p. 334-339, 2006.

SANTÍN, M.; FAYER, R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 56 (1), p. 34-38, 2009.

SANTÍN, M.; VECINO, J. A.; FAYER, R. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bieneusi* in horses. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 157-161, 2010.

SANTÍN, M.; FAYER, R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 363-371, 2011.

SCICLUNA, S. M.; TAWARI, B.; CLARK, C. G. DNA Barcoding of *Blastocystis*. **Protist Journal**, v.157, p. 77-85, 2006.

SODGI, M.; BRASILLE, P.; GONZALEZ-CANALJ, G.; CORNET, M.; PIKETTY, C.; WEISS, L. Unusual pulmonary *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in an AIDS patient: Case report and review. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.36, p. 230-231, 2004.

STENZEL, D. J.; BOREHAM, P. F. L. *Blastocystis hominis* revisited. **Clinical Microbiology**, v. 9, p. 563-584, 1996.

STENSVOLD, R.; BRILLOWSKA-DABROWSKA, A.; NIELSEN, H. V.; ARENDRUP, M. C. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology**, v. 92, n.5, p. 1081–1087, 2006.

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 Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 303–307, 2007.

STENSVOLD, C. R.; LEWIS, H. C.; HAMMERUM, A. M.; PORSBO, L. J.; NIELSEN, S. S.; OLSEN, K. E. P.; ARENDRUP, M. C.; NIELSEN, H. V.; MOLBAK, K. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p.1655–1663, 2009.

SULAIMAN, I.; BERN, C.; GILMAN, R.; CAMA, V.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; TICOMA, E.; VIVAR, A.; XIAO, L. A molecular biologic study of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV-infected patients in Lima, Peru. **The Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 50, p. 591-596, 2003.

SURESH, K.; NG, G. C.; RAMACHANDRAN, N. P.; HO, L. C.; YAP, E.H.; SINGH, M. In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. **Parasitology Research**, v. 79 (6), p. 456-460, 1993.

TAN, K. S. W. Blastocystis in humans and animals: new insights using modern methodologies. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p.121-144, 2004.

TAN, K. S. W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of Blastocystis spp. **Clinical Microbiology**, v. 21, n. 4, p.639-665, 2008.

WAWRZYNIAK, I.; POIRIER, P.; VISCOGLIOSI, E.; DIONIGIA, M.; TEXIER, C.; DELBAC, F.; ALAOUI, H. E. Blastocystis, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 1, n. 5, p. 167-178, 2013.

WEBER, R.; BRYAN, R. T.; SCHWARTZ, D. A.; OWEN, R. L. Human microsporidial infections. **Clinical Microbiology Review**, v. 7, p. 426-461, 1994.

YOSHIKAWA, H.; WU, Z.; KIMATA, I.; ISEKI, M.; ALI, I. K.; HOSSAIN, M. B.; ZAMAN, Z.; HAQUE, R.; TAKAHASHI, Y. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* population isolated from different countries. **Parasitology Research**, v. 92, p.22-29, 2004.

TAN, T. C.; SURESH, K. G.; SMITH, H. V. Phenotypic and genotypic characterisation of Blastocystis hominis isolates implicates subtype 3 as subtype with pathogenic potential. **Parasitology Research**, v. 104, p. 85-93, 2008.

YAKOUB, J.; JAFRI, W.; BEG, M. A.; ABBAS, Z.; NAZ, S.; ISLAM, M.; KHAN, R. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of Blastocystis hominis. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1033-1038, 2010.

WAWRZYNIAK, I.; POIRIER, P.; VISCOGLIOSI, E.; DIONIGIA, M.; TEXIER, C.; DELBAC, F.; ALAOU, H. E. Blastocystis, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 1, n. 5, p. 167-178, 2013.

Zhu et al., 2017 W. Zhu, W. Tao, B. Gong, H. Yang, Y. Li, M. Song, Y. Lu, W. Li; First report of *Blastocystis* infections in cattle in China. **Vet. Parasitol.**, 246 (2017), pp. 38-42

10. Comprovante de submissão ao Comitê de Experimentação Animal (CEUAUFU)

10.1 ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia

CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais)

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Fone: Ramal (VoIP) 3423; e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

COMPROVANTE DE ENTREGA DO
Formulário de Entrega Procedimentos para Uso Científico de Animais
(uso exclusivo da CEUA)

Protocolo nº 089/15 (uso da CEUA)

Data de Entrega 17/08/2015 (uso da CEUA)

Rubrica Funcionário

Barbara Fleming Hostêncio

Observação: Na conclusão do projeto, deverá enviar o resumo e o abstract do projeto, por e-mail para arquivo da CEUA.