

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Caracterização molecular de *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em
animais de produção de propriedades rurais da microrregião de Uberlândia,
Minas Gerais, Brasil

Camila Oliveira Silva Barbosa

Uberlândia - MG

2019

Camila Oliveira Silva Barbosa

Caracterização molecular de *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em animais de produção de propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Cristina Cury
Coorientadora: Dr^a Maria Júlia Rodrigues da Cunha
Coorientadora: Prof^a Dr^a Karine Rezende de Oliveira

Uberlândia - MG

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B238
2019 Barbosa, Camila Oliveira Silva, 1983-
Caracterização molecular de *Blastocystis* sp. e *Enterocytozoon*
bieneusi em animais de produção de propriedades rurais da
microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil [recurso
eletrônico] / Camila Oliveira Silva Barbosa. - 2019.

Orientadora: Dra Márcia Cristina Cury.

Coorientadora: Maria Júlia Rodrigues da Cunha.

Coorientadora: Karine Rezende de Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2480>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Cury, Dra Márcia Cristina, 1970-, (Orient.). II.
Cunha, Maria Júlia Rodrigues da, 1987-, (Coorient.). III. Oliveira,
Karine Rezende de, 1978-, (Coorient.). IV. Universidade Federal
de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas. V. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese Doutorado número 125 do PPIPA				
Data:	Vinte e um de novembro de dois mil e dezenove	Hora de início:	13 h e 30 min	Hora de encerramento:	18 h e 15 min
Matrícula do Discente:	11523IPA001				
Nome do Discente:	Camila Oliveira Silva Barbosa				
Título do Trabalho:	Caracterização molecular de <i>Blastocystis</i> sp. e <i>Enterocytozoon bienersi</i> em animais de produção de propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Helmintos e Protozoários de Interesse médico e Médico veterinário				

Reuniu-se no Bloco 2B, Sala 2B216, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Vagner Ricardo da Silva Fiuza - UFMS (Conferência web); Marlene Cabrine dos Santos Silva - UFTM; Vanessa da Silva Ribeiro - ICBIM/UFU; Natália de Melo Nasser Fava - USP e Márcia Cristina Cury - ICBIM/UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Sr(a). Márcia Cristina Cury, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao(a) discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Última a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1908044&infra_sistema=100000100&infra_unidade_atual=110000422&infra_hash=053c7... 1/2

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por Vagner Ricardo da Silva Fiuza, Usuário Externo, em 21/11/2019, às 18:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Vanessa da Silva Ribeiro, Biólogo(a), em 22/11/2019, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Marcia Cristina Cury, Professor(a) do Magistério Superior, em 22/11/2019, às 12:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Natália de Melo Nasser Fava, Usuário Externo, em 25/11/2019, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por MARLENE CABRINE DOS SANTOS SILVA, Usuário Externo, em 25/11/2019, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1684523 e o código CRC 1F1DFC17.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre ouvir minhas preces e estar ao meu lado, principalmente nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Edson Pereira e Ivania Oliveira, por tudo que sempre fizeram e ainda fazem por mim, por todo amor, carinho, dedicação, puxões de orelha e por todo apoio que sempre me deram para que eu buscasse meus sonhos. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu esposo Daniel, meu maior incentivador, que esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, e que sempre me fez acreditar que sou capaz, mesmo quando eu duvidava, essa conquista também é sua. Te amo.

À minha orientadora, Márcia Cristina Cury, com quem aprendi muito, não só no campo profissional mas também no pessoal. Obrigada pelos incentivos diários, por toda ajuda e principalmente, por confiar e acreditar em mim e me ajudar a tornar esse sonho realidade.

À minha co-orientadora e amiga Maria Júlia Rodrigues da Cunha, por me ensinar sobre biologia molecular, por toda ajuda na escrita e na execução do meu projeto, pelo ombro amigo nos momentos difíceis e principalmente por sua amizade.

À Dr^a Monica Santín, obrigada por ter realizado o sequenciamento das minhas amostras e por estar sempre disponível para tirar todas as minhas dúvidas.

Às minhas amigas Kelem Mota e Juliana Miranda, obrigada por todo apoio, incentivo, ajuda nos experimentos e pelo ombro amigo sempre que precisei. Vocês foram muito importantes durante minha jornada no doutorado e obrigada pela amizade de vocês.

Aos meus colegas do laboratório de Parasitologia, obrigada pelo apoio e incentivos diários, pelas conversas descontraídas que tornaram meus dias mais leves e alegres.

À Iasmim Araújo por toda ajuda ao longo dos anos, obrigada por estar sempre disposta a ajudar e ao Marco Miguel Oliveira obrigada por toda ajuda na estatística do meu trabalho.

Às técnicas do laboratório de Parasitologia, por toda presteza e auxílio.

Aos meus familiares e amigos, obrigada pelo apoio e palavras de incentivos e por fazerem parte da minha vida.

À banca examinadora, obrigada por aceitarem meu convite para defesa do meu doutorado.

*"Se você quer os acertos,
esteja preparado para os erros".*

(Carl Yastrzemski)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas morfológicas de *Blastocystis* spp. (microscopia ótica) *A)16

A forma vacuolar é esférica, com um grande vacúolo central (CV) e uma borda fina resultante do citoplasma periférico, com a presença de organelas, como o núcleo e estruturas semelhantes as mitocôndrias (seta). (B) A forma granular é geralmente maior que a forma vacuolar e contém numerosas inclusões granulares. (C) A forma amebóide, aqui visualizada sob microscopia de fluorescência, após coloração com laranja de acridina, é a forma irregular e contém uma ou mais projeções citoplasmáticas semelhantes a pseudópodes. (D) A forma de cisto é geralmente muito menor (4-6 μm) que as outras formas e é refratária à microscopia de contraste de fase. Barra = 10 μm (TAN, 2004).

Figura 2: Gel de agarose a 1,5% corado com GelRed, mostrando, fragmentos35

de aproximadamente 500 pb do gene SSU rDNA de *Blastocystis* spp., amplificado pela PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de animais procedentes de propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG, coletadas entre janeiro e julho de 2018. Colunas 1 a 5 e 7: Amostras positivas para *Blastocystis* spp.; Coluna 6: Controle negativo para *Blastocystis* spp.; Coluna 8: Controle positivo (*Blastocystis* spp.).

Figura 3: Gel de agarose 1,5% corado com GelRed, mostrando, fragmentos de38

390 pb do gene ITs de *Enterocytozoon bieneusi*, amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de animais das propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG, coletadas entre de janeiro a julho de 2018. Coluna 1: Amostra positiva para *E. bieneusi*; Coluna 2: Controle positivo (*E. bieneusi*); Coluna 3: controle negativo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Levantamento sobre estudos moleculares de <i>Blastocystis</i> spp. realizados em humanos e animais no Brasil, até o ano de 2019.	...19
Tabela 2: Levantamento de estudos moleculares de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> realizados em humanos e animais no Brasil, até o ano de 2019.	...23
Tabela 3: Local de coleta das amostras fecais, espécies animais e número de amostras por espécie de animal, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.	...34
Tabela 4: Positividade de <i>Blastocystis</i> spp. encontrada nas amostras fecais das diferentes espécies de animais, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.	...35
Tabela 5: Comparação da positividade de <i>Blastocystis</i> spp. entre as 14 propriedades rurais analisadas, localizadas na microrregião de Uberlândia, MG, cujas coletas foram realizadas entre janeiro e julho de 2018.	...35
Tabela 6: Subtipos de <i>Blastocystis</i> spp. encontrados nas amostras fecais das diferentes espécies de animais coletadas entre janeiro e julho 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.	...37
Tabela 7: Número de amostras fecais positivas e subtipos de <i>Blastocystis</i> spp. por espécie de animal, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.	...38
Tabela 8: Positividade de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> encontrada nas amostras fecais das diferentes espécies de animais, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.	...39
Tabela 9: Comparação da positividade de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> entre as 14 propriedades rurais analisadas, localizadas na microrregião de Uberlândia, MG, cujas coletas foram realizadas entre janeiro e julho de 2018.	...39
Tabela 10: Genótipos de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> encontrados nas amostras fecais das diferentes espécies de animais, coletadas entre janeiro e julho 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.	...40
Tabela 11: Número de amostras fecais positivas e genótipos de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> por espécie de animal, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.	...40
Tabela 12: Infecções concomitantes entre <i>Blastocystis</i> spp. e <i>Enterocytozoon bieneusi</i> em amostras fecais coletadas entre janeiro e julho de 2018, nas diferentes espécies de animais em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.	...41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem
°C - Grau Celsius
µg - Micrograma
µm - Micrometro
BSA - Albumina de Soro Bovino
CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais
CV - Vacúolo central
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
dNTP - Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl - Ácido clorídrico
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS - Espaçador Transcrito Interno
KCl - Cloreto de potássio
Km – Quilômetro
LSU rRNA - Subunidade maior do Ácido ribonucleico ribossômico
M - Molar
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
Min – Minuto
mL - Mililitro
mm - Milímetro
mM – Milimolar
n° - Número
OMS - Organização Mundial da Saúde
OTU - Unidade Taxonômica Operacional
OTUs - Unidades Taxonômicas Operacionais
Pb - Pares de base
PBS - Tampão Fosfato Salino
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
pmol - Picomol

RNA - Ácido Ribonucleico

s - Segundo

SNG - Sequenciamento de Nova Geração

SSU rRNA – Subunidade menor do Ácido Ribonucleico ribossômico

ST - Subtipo

STs - Subtipos

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

EUA - Estados Unidos da América

μL - Microlitro

μM - Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Blastocystis</i> spp.....	14
1.2 <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	20
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Comitê de ética.....	27
4.2 Área do estudo.....	27
4.3 Local do estudo.....	27
4.4 População do estudo.....	28
4.4.1 Galinhas.....	28
4.4.2 Porcos.....	28
4.4.3 Cavalos.....	28
4.4.4 Bovinos.....	28
4.5 Coleta das amostras fecais.....	28
4.6 Armazenamento das amostras fecais	29
4.7 Extração do DNA.....	29
4.8 Diagnóstico e caracterização molecular dos subtipos de <i>Blastocystis</i> spp...	30
4.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	30
4.8.2 Eletroforese.....	30
4.8.3 Sequenciamento e preparação da biblioteca no Illumina MiSeq.....	30
4.8.4 Análise da Bioinformática.....	31
4.9 Diagnóstico e caracterização molecular dos genótipos de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	32
4.9.1 Reação de nested-PCR.....	32
4.9.2 Eletroforese.....	32
4.9.3 Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	33
4.9.4 Avaliação, edição e alinhamento das sequências.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Amostras coletadas.....	34
5.2 <i>Blastocystis</i> spp.....	34
5.2.1 Positividade de <i>Blastocystis</i> spp.....	34
5.2.2 Identificação dos subtipos de <i>Blastocystis</i> spp.....	36
5.3 <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	38
5.3.1 Positividade de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	38
5.3.2 Identificação dos genótipos de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	39
5.4 Infecções concomitantes entre <i>Blastocystis</i> spp. e <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	41
5.5 Sequências de <i>Blastocystis</i> spp. e <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	41
6. DISCUSSÃO.....	42
6.1 <i>Blastocystis</i> spp.....	42
6.2 <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	46
6.3 Infecções concomitantes entre <i>Blastocystis</i> spp. e <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	48
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
8. CONCLUSÕES.....	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
Anexo A.....	73
Anexo B.....	74

RESUMO

Blastocystis spp. e *Enterocytozoon bieneusi* são parasitos do trato gastrointestinal de grande variedade de animais incluindo o homem. Estão presente em países desenvolvidos e nos em desenvolvimento e possuem potencial zoonótico. O objetivo desse estudo foi determinar a positividade e realizar caracterização molecular dos subtipos de *Blastocystis* spp. e genótipos de *E. bieneusi*, à partir de amostras fecais de animais de produção procedentes de propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG, Brasil. Foram coletadas fezes de 50 galinhas, 35 porcos, 11 cavalos e 57 bovinos em 14 propriedades rurais. O DNA foi submetido às reações de PCR e nested-PCR para amplificação de fragmentos do gene SSU rDNA de *Blastocystis* spp. e dos genes ITS de *E. bieneusi*. Do total das 153 amostras coletadas, 93 (60,8%) foram positivas para *Blastocystis* spp. e 25 (16,3%) para *E. bieneusi*. *Blastocystis* spp. foi identificado em todas as propriedades analisadas e *E. bieneusi*, em nove. Foi realizado sequenciamento de nova geração (SNG) nas amostras positivas para *Blastocystis* spp. com identificação de 13 subtipos previamente conhecidos (ST1, ST3 ao 7, ST10, ST14, ST21, ST23 ao 26) e um subtipo novo, destes, seis são zoonóticos (ST1, ST3 ao 7). As galinhas estavam infectadas pelos ST1, ST3 ao 7, ST10, ST14, ST15, ST21, ST23, ST25 e 26; os porcos por ST1, ST3 ao 5; o cavalo pelos subtipos ST10, ST21, ST23, ST5 e 26 e os bovinos por ST1, ST4, ST5, ST10, ST14, ST21, ST23 ao 26 e por um ST Novo. O sequenciamento das amostras positivas de *E. bieneusi*, identificou oito genótipos relatados anteriormente (D, EbpA, H, PigEb1, CS-1, Peru11, BEB8 e I), todos potencialmente zoonóticos. Os genótipos D, EbpA e H foram identificados em galinhas e porcos; PigEb1 e CS-1 em porcos; Peru11 em galinhas; BEB8 e I em bovinos. Infecções concomitantes entre *Blastocystis* spp. e *E. bieneusi* foram observadas em 23 amostras, sendo três em galinhas (13%), 16 em porcos (69,6%) e quatro em bovinos (17,4%). A identificação de subtipos e genótipos considerados zoonóticos, presentes nos animais dessa pesquisa, sugere a possibilidade de haver transmissão entre animais e o homem.

Palavras-chave: Stramenopiles, Microsporídio, animais, PCR, sequenciamento

ABSTRACT

Blastocystis spp. and *Enterocytozoon bieneusi* are obligate intracellular parasites of the gastrointestinal tract of humans and a wide variety of animals. They are present in developed and developing countries and have zoonotic potential. The aim of this research was to determine the positivity and to perform molecular characterization of respectively *Blastocystis* spp. and *E. bieneusi* subtypes and genotypes in fecal samples from production animals from rural properties of microregion of Uberlândia, MG, Brazil. Feces from 50 chickens, 35 pigs, 11 horses and 57 cattle were collected from 14 rural properties. The DNA was extracted directly from feces and submitted to PCR and nested-PCR analysis for amplification of fragments of the SSU rDNA of *Blastocystis* spp. and of the ITS gene of *E. bieneusi*. Out of 153 samples collected, 93 (60,8%) were positive for *Blastocystis* spp. and 25 (16,3%) for *E. bieneusi*. *Blastocystis* spp. was identified in all properties and *E. bieneusi* in nine. Next generation sequencing (NGS) was performed on positive samples for *Blastocystis* spp. with identification of 13 subtypes previously identified (ST1, ST3 to 7, ST10, ST14, ST21, ST23 to 26) plus a new subtype; six are known to be zoonotic (ST1, ST3 to 7). Chickens were infected by ST1, ST3 to 7, ST10, ST14, ST21, ST23, ST25 and 26; pigs by ST1, ST3 to 5; the horse by ST10, ST21, ST23, ST25 to 26 and cattle by ST1, ST4 and 5, ST10, ST14, ST21, ST23 to 26 and a novel ST. Sequencing of *E. bieneusi* identified eight previously reported genotypes (D, EbpA, H, PigEb1, CS-1, Peru11, BEB8 and I), all potentially zoonotic. Genotypes D, EbpA and H were identified in chickens and pigs; PigEb and CS-1 in pigs; Peru11 in chickens and BEB8 and I in cattle. Concomitant parasite infections were observed in 23 samples, three from chickens (13%), 16 from pigs (69,6%) and four from cattle (17,4%). The identification of subtypes and genotypes considered zoonotic, present in the animals of this study, suggests the possibility of transmission between animals and humans.

Keywords: Stramenopiles, Microsporidia, animals, PCR, sequencing

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Blastocystis* spp.

Blastocystis spp. é parasito unicelular do trato gastrointestinal de humanos, outros mamíferos, aves, répteis, peixes, anfíbios e invertebrados (TAN, 2004; SANTIN *et al.*, 2011; SCANLAN, 2012, DENG *et al.*, 2019).

É encontrado em países desenvolvidos e principalmente em países em desenvolvimento, devido às precárias condições de saneamento básico e escassez de água potável (TAN, 2004; SANTIN *et al.*, 2011; SCANLAN, 2012; OSMAN *et al.*; 2016). É um dos parasitos mais comumente encontrados em estudos cropológicos humanos realizados mundialmente, estimando-se que um bilhão de pessoas em todo o mundo esteja parasitado por *Blastocystis* spp. (STENZEL; BOREHAM, 1996; MOURA *et al.*, 2018, MALONEY; MOLOKIN; SANTIN, 2019; VALÊNCIA-BARBOSA *et al.*, 2019).

Foi primeiramente descrito por Brumpt em 1912, como levedura fúngica encontrada em fezes humanas. Algumas décadas depois, estudos realizados por Zierdt e Tan em 1967, o classificaram como protozoário comensal do trato intestinal. Posteriormente, dados epidemiológicos sugeriram haver relação entre a presença do parasito e os sintomas clínicos, sendo assim considerado como agente patogênico (TAN, 2008).

A taxonomia de *Blastocystis* spp. sempre foi controversa, pois foi classificado como levedura, protozoário e esporozoário (BOREHAM; STENZEL, 1993; STENSVOLD; CLARK, 2016). Por meio de diversos estudos realizados com análises do gene SSU-rDNA de *Blastocystis* spp., atualmente, está inserido no Reino Protista, Filo Stramenopiles, classe Blastocystea, ordem Blastocystida, família Blastocystidae e gênero *Blastocystis* (ARISUE *et al.*, 2002). As espécies, inicialmente eram classificadas de acordo com o hospedeiro: se isolada de humanos era denominada de *Blastocystis hominis*; de roedores, *Blastocystis rattii* (STENSVOLD *et al.*, 2007b). Entretanto, com a evolução dos estudos, observou-se que não havia diferenças morfológicas entre as espécies, e sim grande diversidade genética (SKOTARCZAK, 2018).

Essas observações foram suficientes para que o gênero fosse classificado em subtipos (STs) e não em espécies (STENSVOLD *et al.*, 2007a; PARIJA; JEREMIAH, 2013).

O gênero atualmente é subdividido 26 subtipos baseados no polimorfismo da subunidade menor (SSU) do gene rDNA. Os ST1 ao ST8 e ST12 são encontrados em humanos e em algumas espécies de animais, sugerindo que a infecção humana pode ser resultado de transmissão zoonótica (DOGRUMAN-AL *et al.*, 2008; JONES *et al.*, 2009; STENSVOLD *et al.*, 2009; DENG *et al.*, 2019; MALONEY; MOLOKIN; SANTIN, 2019). O subtipo 9 é observado somente em humanos e os ST10 ao ST26 (com exceção do ST12) apenas em animais (MALONEY *et al.*, 2018; RAMÍREZ *et al.* 2016; MALONEY; MOLOKIN; SANTIN, 2019). Na Europa, os principais subtipos encontrados em humanos são do ST1 ao ST4 e na América do Sul, o ST1, ST2 e ST3 são mais relatados. Infecções mistas (com mais de um subtipo) no mesmo hospedeiro também podem ocorrer (DENG *et al.*, 2019; JIMÉNEZ; JAMES; RAMÍREZ, 2019).

Blastocystis spp. apresenta quatro formas morfológicas principais: amebóide, vacuolar, granular e cística (Figura 1). Todas com uma camada externa denominada fibrilar. A forma amebóide é irregular, medindo de 2,6 a 7,8 μm e é comumente isolada de pacientes que apresentam sintomas, sendo assim, associada a patogenia da doença (TAN; SURISH, 2006; SCANLAN, 2012). A forma mais observada do parasito é a vacuolar, a qual apresenta um grande vacúolo central, com borda fina e citoplasma periférico, com tamanho variando entre 2 a 200 μm (TAN; SINGH; YAP, 2002). A granular apresenta semelhanças com a vacuolar, porém com presença de grânulos no citoplasma ou no vacúolo central medindo cerca de 3 a 80 μm (SCANLAN, 2012). O cisto, de formato oval, mede entre 3 a 5 μm , possui de um a quatro núcleos, sendo a forma de resistência, principalmente, na água. Devido ao seu formato diminuto, pode ser confundido com detritos fecais, dificultando o diagnóstico (TAN, 2004; SCANLAN, 2012) (Figura 1). Há poucos dados sobre as transições de uma forma para a outra e a maioria das informações sobre a morfologia do parasito são baseadas nos estágios individuais (TAN; SURISH, 2006; TAN; SURESH; SMITH, 2008; KUMARASAMY *et al.*, 2018).

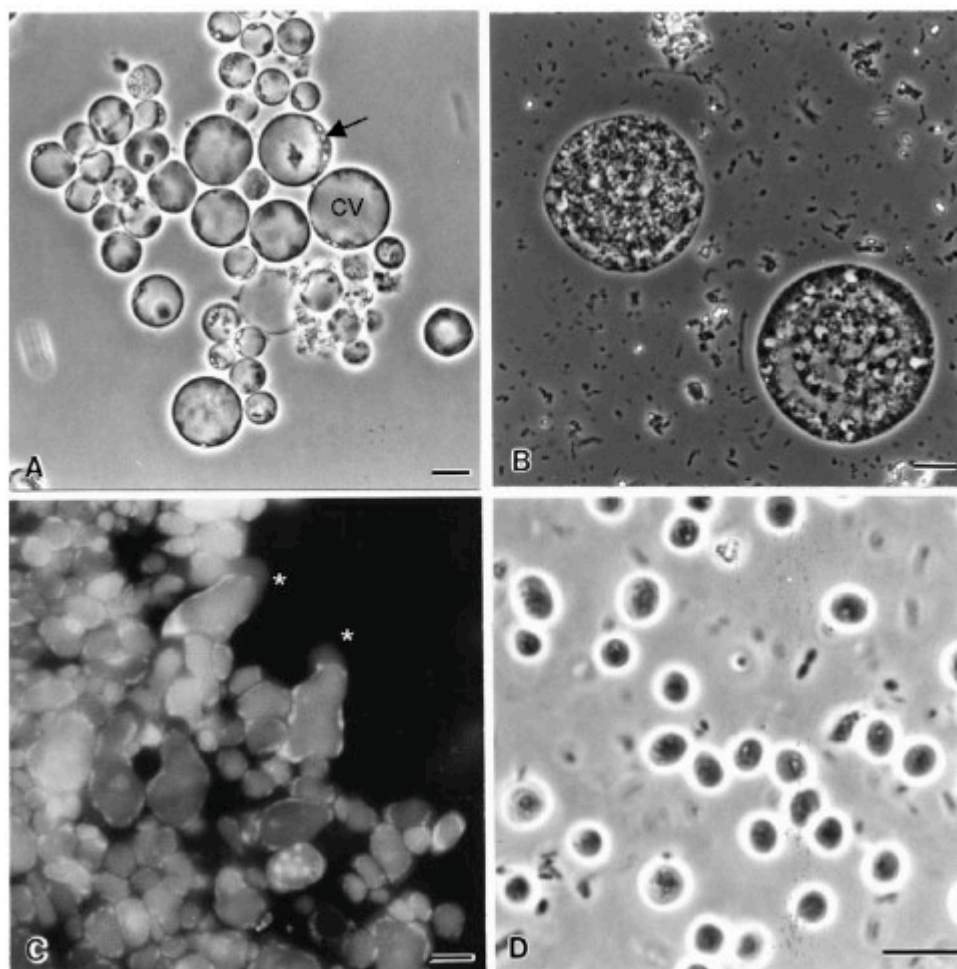


Figura 1: Formas morfológicas de *Blastocystis* spp. (microscopia ótica) *A) A forma vacuolar é esférica, com um grande vacúolo central (CV) e uma borda fina resultante do citoplasma periférico, com a presença de organelas, como o núcleo e estruturas semelhantes as mitocôndrias (seta). (B) A forma granular é geralmente maior que a forma vacuolar e contém numerosas inclusões granulares. (C) A forma amebóide, aqui visualizada sob microscopia de fluorescência, após coloração com laranja de acridina, é a forma irregular e contém uma ou mais projeções citoplasmáticas semelhantes a pseudópodes. (D) A forma de cisto é geralmente muito menor (4-6 μm) que as outras formas e é refratária à microscopia de contraste de fase. Barra = 10 μm (TAN, 2004).

Devido à falta de modelo animal adequado, o ciclo de vida de *Blastocystis* spp. não está bem elucidado, entretanto, acredita-se que o cisto é a forma infectante do parasito (TAN, 2008). Esse, ao ser ingerido por animais e humanos em água e alimentos contaminados, chega ao intestino grosso, perdendo a camada fibrilar e desenvolvendo-se na forma vacuolar, que sofre diversas divisões binárias. Essa, dá origem à outras formas vacuolar, amebóide e multivacuolar. A multivacuolar da origem a um pré-cisto por meio de esquizogonia, podendo originar um cisto de parede fina (respon

sável pela auto-infecção no hospedeiro) (PARIJA; JEREMIAH, 2013) ou cisto de parece espessa, que será eliminado nas fezes dos hospedeiros infectados (TAN, 2008).

A transmissão aos hospedeiros está associada à rota fecal-oral, pelo contato direto com animais e humanos parasitados e pela ingestão de alimentos e água contaminados com cistos do parasito (TAN, 2004; PARKAR *et al.*, 2007; LEELAYOOVA *et al.*, 2008). *Blastocystis* spp. é, identificado em várias fontes de água, como irrigação, águas superficiais e esgoto, sendo importante veículo para transmissão do parasito para humanos e animais (KOLOREN, GULABI, KARANIS, 2018; MORENO *et al.*, 2018). Devido a este fator, a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2011, incluiu o parasito no programa de Água, Saneamento e Saúde que determina a qualidade da água potável (WHO, 2011).

A patogênese de *Blastocystis* spp. é dependente da carga parasitária e dos subtipos do parasito e condições do hospedeiro (BADPARVA; SANDRAEE; KHEIRANDISH, 2015). A maioria dos indivíduos são assintomáticos 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 (BOOROM *et al.*, 2008; TAN, 2008; NOEL *et al.*, 2005; SANTIN *et al.*, 2011; YOSHIKAWA *et al.*, 2009; MALONEY *et al.*, 2018). Nos indivíduos sintomáticos, as manifestações clínicas são inespecíficas e incluem dor abdominal, náuseas e diarreia, estando relacionada à síndrome do intestino irritável e lesões cutâneas alérgicas (YAKOOB *et al.*, 2010; AJJAMPUR; TAN, 2016, DENG *et al.*, 2019).

Os métodos de diagnóstico comumente utilizados para a detecção de *Blastocystis* spp. são: exames parasitológicos de fezes para identificação da morfologia das formas evolutivas do parasito, como exame direto, centrífugo-sedimentação em formol-éter (Ritchie), técnicas de coloração (tricromo de Masson, giemsa), cultura e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O diagnóstico pela microscopia convencional pode ter interferentes, como o observador, pois o parasito pode ser confundido com outros microrganismos e com detritos fecais. A cultura de fezes é método demorado e muitas vezes se torna inviável devido ao polimorfismo do parasito, levando a interpretações

errôneas (STENSVOLD *et al.*, 2007b; TAN, 2008). Devido a essas dificuldades, têm sido desenvolvidas várias abordagens utilizando métodos moleculares (PCR convencional, PCR em tempo real, sequenciamento) como ferramenta de diagnóstico. Na PCR, podem ser utilizadas fezes ou amostras da cultura das fezes (YOSHIKAWA *et al.*, 2004; STENSVOLD *et al.*, 2006; SANTIN *et al.*, 2011; DENG *et al.*, 2019). A PCR, como diagnóstico, apresenta maior especificidade e sensibilidade, além de ser possível identificar os subtipos (SKOTARCZAK, 2018).

Blastocystis spp. foi identificado em humanos e em animais em várias partes do mundo. Na América do Sul, os dados de ocorrência desse parasito são escassos e a maioria são relacionados a humanos. Na Colômbia, foi relatado positividade em humanos e animais (aves, macacos, bovinos, cachorros, ratos e gambás). No Equador, o parasito foi identificado em macacos e humanos. Na Argentina, Bolívia e Chile também foram observados humanos infectados (JIMÉNEZ; JAIMES; RAMÍREZ, 2019).

No Brasil, há poucos estudos sobre *Blastocystis* spp. e os existentes pouco utilizam a técnica molecular. Esses, são voltados para humanos e em relação aos animais pode se destacar três: David *et al.* (2015) em São Paulo, analisaram amostras fecais de humanos e cães e observaram positividade somente em humanos; em Minas Gerais, Moura *et al.* (2018), analisaram várias espécies de animais domésticos, os quais detectaram a presença do parasito em amostras de porcos, ovelhas e bovinos; Valença-Barbosa *et al.* (2019) realizaram estudo no Rio de Janeiro com animais selvagens e domésticos, nos quais foram observadas amostras positivas em primatas não-humano, roedores, guaxinim, tatu, aves, baratas, tartaruga, javali e marsupiais (cuica e gambá) (VALENÇA-BARBOSA *et al.*, 2019) (Tabela 1).

Tabela 1: Levantamento sobre estudos moleculares de *Blastocystis* spp. realizados em humanos e animais no Brasil, até o ano de 2019.

Local	Espécie Animal	Número de amostras testadas	Prevalência (%)	STs encontrados* (nº amostras)	Referência
Tapirapé (Amazônia)	Humano	80	82,5	ST1 (33), ST2 (27), ST3 (13)	Malheiros <i>et al.</i> , 2011
Porto Said e Santa Maria (São Paulo)	Humano	126	53,4	ST1 (23), ST2 (7), ST3 (29), ST6 (2), ST7 (4)	David <i>et al.</i> , 2015
	Cão	49	-	-	
Duque de Caxias (Rio de Janeiro)	Humano	180	30,5	ST1 (22), ST2 (4), ST3 (36), ST4 (1),	Valença-Barbosa <i>et al.</i> , 2017
Sumidouro (Rio de Janeiro)	Humano	294	55,8	ST1 (44), ST2 (44), ST3 (55), ST4 (5), ST8 (11)	Valença-Barbosa <i>et al.</i> , 2018
Uberaba (Minas Gerais)	Bovino	6	83,3	Não fez subtipagem	Moura <i>et al.</i> , 2018
	Porco	13	61,5	ST1 (3)	
	Ovelha	1	100	Não fez subtipagem	
Paranaguá (Paraná)	Humano	766	28,2	ST1 (37), ST2 (16), ST3 (42), ST4 (3), ST6 (1), ST8 (3)	Segui <i>et al.</i> , 2018
Niterói (Rio de Janeiro)	Primata não-humano	89	24,7	ST1 (2), ST2 (11), ST3 (3), ST8 (6)	Valença-Barbosa <i>et al.</i> , 2019
	Guaxinim	2	-	-	
	Roedor	11	18,2	ST3 (1), ST (1)	
	Marsupial	26	19,2	ST1 (4), ST8 (1)	
	Tatu	1	100	ST8	
	Ave	57	3,5	ST1 (1), ST5 (1)	
	Javali	39	48,7	ST1 (3), ST4 (1), ST5 (14), ST8 (1)	
	Barata	96	1,0	ST4	
	Réptil	13	-	-	

*ST: subtipos de *Blastocystis* spp.

1.2 *Enterocytozoon bieneusi*

O filo microsporidia é um grupo de parasitos intracelulares obrigatórios que infectam grande variedade de animais, possuindo mais de 1.500 espécies (DIDIER *et al.*, 2004; LI; FENG; SANTIN, 2019). A maioria é encontrada em animais, mas 17 são capazes de parasitar o homem (LI; FENG; SANTIN, 2019). As quatro principais espécies, que infecta humanos, são *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon intestinalis* (gênero *Encephalitozoon*) e *Enterocytozoon bieneusi*. Essa última, é considerada a mais frequente no homem, principalmente em pacientes imunocomprometidos e portadores de doenças crônicas (SANTIN; FAYER, 2011; KARIM *et al.*, 2014).

E. bieneusi foi primeiramente descrito no ano de 1985, a partir da identificação morfológica por microscopia eletrônica, como patógeno intestinal oportunista em pacientes com HIV, que apresentavam diarreia crônica (DESPORTES *et al.*, 1985). Em 1996, foram identificados esporos do parasito em fezes de porcos e em amostras de tecido intestinal de outros animais (MATHIS; WEBER; DEPLAZES, 2005).

Estudos têm relatado que *E. bieneusi* infecta mamíferos domésticos e silvestres, além de aves em todo o mundo. Esses dados sugerem que os animais estão diretamente envolvidos na epidemiologia do parasito, e que o mesmo possui potencial zoonótico (SANTIN; FAYER, 2011; KARIM *et al.*, 2014).

A fase infectante é o esporo, que possui forma oval e tamanho pequeno (0,5 x 1,5 µm). Possui parede espessa, composta de glicoproteína (o que confere ao esporo resistência no meio ambiente), membrana plasmática interna e no núcleo há o citoplasma, considerado o material infectante (esporoplasma) (WASSON; PEPER, 2000; KEELING; FAST, 2002). Os esporos são compostos por aparelho de extrusão contendo tubo polar ou filamento polar, disco de ancoragem e polaroplasto, que possibilitam o esporoplasma penetrar e infectar a célula hospedeira (RIJPSTRA *et al.*, 1988). Não possuem complexo de Golgi, mitocôndrias e peroxissomos (SANTIN, 2015). O tubo polar está presente apenas nos microsporídios, sendo considerado importante na invasão celular (LI; FENG; SANTIN, 2019).

O ciclo de vida inicia-se quando humanos e animais ingerem esporos do *E. bieneusi*. Após a ingestão, os esporos liberam o tubo polar no intestino delgado do hospedeiro e infectam as células injetando o esporoplasma. Em seguida, inicia-se o desenvolvimento intracelular do parasito, com crescimento, divisão celular e multiplicação, dando origem a esporos maduros. Quando há o aumento do número de esporos, ocorre a lise da célula hospedeira com liberação dos mesmos, que podem infectar outras células ou serem eliminados juntamente com as fezes dos indivíduos parasitados (AKIYOSHI *et al.*, 2009; LI; FENG; SANTIN, 2019).

A transmissão ocorre pela rota fecal-oral pelo contato com animais e humanos parasitados e/ou ingestão de água e alimentos contaminados com esporos do parasito (DIDIER *et al.*, 2004; GALVÁN-DIÁZ *et al.*, 2014). *E. bieneusi* foi encontrado em várias fontes de água, como de recreio, potável, em efluentes de estações de tratamento e águas de irrigação, sugerindo que essas fontes podem ser veículos de transmissão para o homem e animais (COTTE *et al.*, 1999). No Brasil, existe um único estudo, no qual detectou-se *E. bieneusi* no esgoto bruto e efluente tratado em Campinas, São Paulo (YAMASHIRO *et al.*, 2017).

As manifestações clínicas nos indivíduos sintomáticos estão associadas ao trato gastrointestinal, sendo a principal a diarreia (BOTTEREL *et al.*, 2002; SODQI *et al.*, 2004) e naqueles indivíduos com imunossupressão, pode causar síndrome de emaciação com perda de peso superior a 10% (MATOS *et al.*, 2012). O mecanismo de indução da diarreia não é claramente conhecido (SODQI *et al.*, 2004; BOTTEREL *et al.*, 2002).

O diagnóstico das espécies de microsporídios é dificultado, devido ao tamanho pequeno dos esporos encontrado nas fezes (esporos com 0,5 x 1,5 µm). Portanto, o exame microscópico e os métodos de fluorescência são imprecisos e dependentes de examinador experiente (WEBER *et al.*, 1994) e os ensaios sorológicos não estão disponíveis comercialmente (SAK *et al.*, 2010). Desta forma, a PCR é utilizada para identificação do parasito, pois demonstra alta sensibilidade mesmo em níveis baixos de infecção (RINDER *et al.*, 1998; MUNGTHIN *et al.*, 2005). A biologia molecular tem auxiliado no entendimento da epidemiologia do parasito, embora, ainda, limitada. A técnica consegue identificar a espécie em humanos e animais envolvidos no

ciclo, pela comparação dos genótipos dos diferentes hospedeiros, possibilitando o reconhecimento de genótipos espécie-específicos e aqueles considerados zoonóticos (CAMA *et al.*, 2007; SANTIN; FAYER, 2011).

Para a genotipagem de *E. bieneusi*, é necessária caracterização molecular e o Espaçador Transcrito Interno Ribossômico (ITS) é a região de escolha (SANTIN, 2015). Estudos realizados em várias partes do mundo (pela análise do ITS), relatam existir diversidade genética do parasito em quase 500 genótipos. Esses, são divididos em 11 grupos filogenéticos, sendo os grupos 1 e 2 os maiores. O grupo 1 é subdivido em nove subgrupos com 314 genótipos; o 2 é constituído de três subgrupos e possui 94 genótipos, ambos são considerados zoonóticos. Os grupos 3 ao 11 são os menores e classificados como espécie-específicos (LI; FENG; SANTÍN, 2019).

De acordo com Li, Feng e Santín (2019) os animais podem servir de reservatórios para a infecção humana, pois o parasito foi identificado em várias espécies em todo o mundo. Em porcos, foram descritos a presença de genótipos zoonóticos nos EUA, Tailândia e China (BUCKHOLT *et al.*, 2002; LEEYOOVA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2014). Relatos sobre esse microsporídio em galinhas foram realizados na Alemanha, Peru, China e Brasil (REETZ *et al.*, 2002; FENG *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; CUNHA; CURY; SANTIN, 2016). Em cavalos, na Colômbia, República Tcheca, Argélia, EUA e China (SANTIN; VECINO; FAYER, 2010; WAGNEROVÁ *et al.*, 2012; LAATAMMA *et al.*, 2015; WAGNEROVÁ *et al.*, 2016; QI *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2016, ZHAO *et al.*, 2019). Os bovinos são considerados hospedeiros comuns do parasito, com prevalência mundial, variando entre 2,2 a 37,6% (LI; FENG; SANTIN, 2019). No Brasil, foram realizados onze estudos com caracterização molecular de *E. bieneusi* em humanos e animais (Tabela 2).

Tabela 2: Levantamento sobre estudos moleculares de *Enterocytozoon bieneusi* realizados em humanos e animais no Brasil, até o ano de 2019

Local	Hospedeiro	Nº de amostras testadas	Prevalência (%)	Genótipos encontrados (nº amostras)	Referência
Rio de Janeiro (Rio de Janeiro)	Humano	1	100	Não fez genotipagem	Brasil <i>et al.</i> , 1998
Rio de Janeiro (Rio de Janeiro)	Humano	40	15	Não fez genotipagem	Brasil <i>et al.</i> , 2000
Não especificado	Humano	3	100	WL12 (1), NIA1 (1), D (1)	Feng <i>et al.</i> , 2011
São Paulo (São Paulo)	Quati	60	6,7	Não fez genotipagem	Lallo; Calábria; Milanelo, 2012a
São Paulo (São Paulo)	Ave	196	5,5	EpbA (11)	Lallo; Calábria; Milanelo, 2012b
Campos dos Goytacazes e Itaperuna (Rio de Janeiro)	Suíno	91	59,3	CS-1 (7), EbpA (7), H (1), O (3), PigEb1 (5), PigEb2 (16), PigEb3 (2), PigEb4 (16), PigEb5 (1), PigEb7 (1), PigEb8 (1), PigEb9 (1), PigEb10 (1), PigEb11 (1), PigEb12 (1), PigEb13 (1), PigEb14 (1), PigEb15 (1), PigEb16 (1), PigEb17 (1)	Fiuza <i>et al.</i> , 2015
Estado do Rio de Janeiro	Bovino	452	17,5	I (33), BEB8 (19), BEB4 (5), BEB12 (5), D (4), BEB11 (3), BEB13 (2), EbpA (1), BEB8/BEB13 (1), BEB4/BEB16 (1), I/BEB13 (1), BEB8/BEB13/BEB15 (1), BEB4/I (1), BEB8/BEB13/BEB17 (1), BEB8/BEB13/BEB14 (1)	Fiuza <i>et al.</i> , 2016a
Carapebus, São João da Barra e São Francisco do Itabapoana (Rio de Janeiro)	Ovelha	125	19,2%	BEB6 (11), BEB7 (8), I (2), BEB18 (1), BEB19 (1), LW1 (1)	Fiuza <i>et al.</i> , 2016b

Continua.

Tabela 2: Continuação

Local	Hospedeiro	Nº de amostras testadas	Prevalência (%)	Genótipos encontrados (nº amostras)	Referência
Uberlândia e Belo Horizonte (Minas Gerais)	Galinha	151	15,9%	D (14), Type IV (1), Peru11 (8), Peru6 (1)	Cunha; Cury; Santin, 2016
Uberlândia e Belo Horizonte (Minas Gerais)	Aves	85	3,5	D (1), Peru6 (2)	Cunha; Cury; Santin, 2017
Campo Grande (Mato Grosso do Sul)	Gato	60	3,3	D (2)	Prado <i>et al.</i> , 2019

2. JUSTIFICATIVA

Os parasitos *Blastocystis* spp. e *E. bieneusi* estão presentes em países desenvolvidos e nos em desenvolvimento, sendo considerados zoonóticos e portanto, uma ameaça à saúde pública. Estão dentre os parasitos disseminados no ambiente pela rota fecal-oral e podem ser inseridos como causadores de possíveis surtos pela transmissão hídrica e alimentos contaminados.

Apesar destes terem sido descritos há muitos anos, os aspectos relacionados à patogenia, transmissão, epidemiologia e caráter zoonótico não estão bem elucidados. Os parasitos estão presentes em vários animais, entretanto, não há relatos sobre as principais alterações clínicas e possíveis impactos econômicos nos animais de produção. Em humanos, sabe-se que são oportunistas, e causam graves quadros de diarreia.

No Brasil, existem poucos levantamentos da ocorrência desses patógenos em humanos e animais domésticos nas diferentes regiões, bem como sobre quais são os subtipos e genótipos mais importantes que acometem os indivíduos. Na microrregião de Uberlândia, as informações sobre a presença desses parasitos são escassas, havendo dois únicos relatos de *E. bieneusi* em aves.

Desta forma, trabalhos que elucidem a real ocorrência desses microrganismos na região em animais, bem como o potencial zoonótico, são de extrema importância para o melhor entendimento do seu papel na dinâmica de transmissão, elucidando alguns aspectos epidemiológicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Determinar a positividade e realizar caracterização molecular de *Blastocystis* spp. e *E. bieneusi* presentes em amostras fecais de animais de produção, procedentes de propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar os subtipos de *Blastocystis* spp. encontrados nas amostras fecais dos animais por sequenciamento;
- Identificar os genótipos de *E. bieneusi* encontrados nas amostras fecais dos animais por sequenciamento;
- Verificar se os subtipos de *Blastocystis* spp. encontrados possuem potencial zoonótico;
- Verificar se os genótipos de *E. bieneusi* encontrados possuem potencial zoonótico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo número 101/17 (Anexo A).

4.2 Área do Estudo

A microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, é composta por dez municípios: Araguari, Araporã, Canápolis, Cascalho Rico, Centralina, Indianópolis, Monte Alegre de Minas, Prata, Tupaciguara e Uberlândia. Pertence a mesorregião do Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro com população estimada em 921.509 habitantes segundo censo do IBGE realizado em 2019 e área total de 18.790Km². Apresenta temperatura média de 23,1°C e índice pluviométrico de 1500 a 1600 mm.

A região é composta por diversas 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 um pólo agropecuário, muitas indústrias de alimentos de origem animal se instalaram na região, fazendo com que o efetivo das espécies de animais criados e dos produtos da pecuária passassem a ter grande importância para a economia regional e do Brasil.

4.3. Local do estudo

Foram contatados proprietários de 25 propriedades rurais em vários municípios da microrregião de Uberlândia, Minas Gerais. Destes, 14 concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). As propriedades rurais estão localizadas em sete municípios, sendo eles: Araguari (ARI) (18°38'50"S 48°11'14"W), Canápolis (CA) (18°43'25"S 49°10'5"W), Cascalho Rico (CR) (18°34'35"S 47°29'55"W), Monte Alegre de Minas (MA) (18°43'29"S 47°29'55"W), Prata (PR) (19°18'26"S 48°55'27"W), Tupaciguara (TUP) (18°35'32"S 48°42'18"W) e Uberlândia (UDI) (18°55'07"S 48°16'38"W).

4.4 População do estudo

Foram incluídos nesse estudo, galinhas, porcos, cavalos e bovinos das diferentes propriedades rurais, sendo esses de diferentes raças, aptidão, ambos os sexos e diferentes idades.

4.4.1 Galinhas

As galinhas eram criadas soltas nas propriedades e tinham contato com outros animais domésticos (cães, gatos, cavalos, bovinos). Eram alimentadas com ração, milho e restos de comida e criadas para o consumo de ovos e carne para uso próprio ou para venda em mercados locais.

4.4.2 Porcos

Os porcos eram criados em chiqueiros individuais em todas as propriedades rurais e eram alimentados com uma mistura de restos de comida (lavagem).

4.4.3 Cavalos

Os cavalos, assim como as galinhas, eram criados soltos nas propriedades e tinham contato com outros animais domésticos (cães, gatos, galinhas, cavalos, bovinos). Eram alimentados com feno e capim (do pasto) e usados como animais de tração.

4.4.4 Bovinos

Os bovinos do estudo eram de gado leiteiro, criados soltos no pasto e possuíam contato com outros animais domésticos (cães, gatos, galinhas, cavalos). Eram alimentados com capim (do pasto) e ração.

A água oferecida a todos os animais do estudo era de torneiras sem filtragem prévia. De acordo com os proprietários, nenhum animal do estudo recebeu qualquer tratamento antiparasitário nos últimos seis meses que antecederam a coleta das amostras das fezes.

4.5 Coleta das amostras fecais

As galinhas foram separadas individualmente, por alguns minutos, em gaiolas de ferro forradas com jornal até defecarem e, logo após, a coleta das

fezes foi realizada. Após cada coleta, o jornal era substituído por outro e a gaiola higienizada com álcool 70%. As amostras dos porcos, foram coletadas em chiqueiros individuais, diretamente do solo, tomando cuidado de coletar fezes frescas e da parte superior do bolo fecal. Todas as amostras das galinhas e dos porcos, foram armazenadas em tubos de poliestireno estéril de 80 mL identificados com os dados da propriedade, do animal e data da coleta.

As amostras fecais dos cavalos e bovinos foram coletadas diretamente da ampola retal e acondicionadas em sacos plásticos, identificados com os dados da propriedade, do animal e data da coleta.

As amostras coletadas de todos os animais, foram armazenadas em caixas térmicas contendo gelo e transportadas imediatamente ao Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos da Universidade Federal de Uberlândia, para processamento.

4.6 Armazenamento das amostras fecais

As fezes coletadas foram armazenadas sob refrigeração a -20°C (por até uma semana) até a extração de DNA, no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

4.7 Extração do DNA

O DNA das amostras fecais foi extraído diretamente das fezes com kit comercial de extração MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA), seguindo as instruções do fabricante, com pequenas modificações. Essas modificações, incluíram: antes do início da extração, foram acrescentados 0,3 gramas de pérolas de zircônia (Stratech Scientific, Luton, United Kingdom) à 0,2 gramas de fezes e 1,0 mL de PBS, com posterior agitação vigorosa por dois minutos, para facilitar a ruptura dos cistos de *Blastocystis* spp. e esporos de *E. bieneusi*. O DNA foi eluído em 100 µL do tampão de eluição do “kit” para aumentar a quantidade de DNA recuperado, e o mesmo foi mantido sobre refrigeração a -20°C, até a realização da PCR.

4.8 Diagnóstico e caracterização molecular dos subtipos de *Blastocystis* spp.

4.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foi realizada PCR para amplificação de fragmento de 479 pb do gene SSU rDNA de *Blastocystis* spp., seguindo protocolo previamente descrito por Santin *et al.* (2011), com a utilização dos 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')

A PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo tampão 1x com 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2,5 U de Taq DNA Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2,5 µL BSA (0.1 g/10 mL), e 1 µM de cada primer. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 4 min; com total de 35 ciclos (desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 54°C por 30s e extensão a 72°C por 30s), seguida de extensão final a 72°C por 5 min. Controles negativo (água livre de Dnase e Rnase) e positivo (amostra de DNA positiva testada por PCR e confirmada por sequenciamento em estudo anterior) foram utilizados em todas as reações.

4.8.2 Eletroforese

Todos os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) [1M Tris-HCl (ph 8.0), 0,83M ácido bórico, 20 mM EDTA] e revelados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. O gel foi observado em transiluminador ultravioleta, para visualização dos produtos amplificados e os fragmentos de DNA foram analisados, comparativamente, com marcadores de DNA de 100 pares de base.

4.8.3 Sequenciamento e preparação da biblioteca no Illumina MiSeq

As amostras de DNA positivas na PCR para *Blastocystis* spp. foram enviadas ao “Environmental Microbial and Food Safety Laboratory” -

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA - Beltsville, Maryland), para realização do sequenciamento.

O sequenciamento das amostras positivas foi realizado por Sequenciamento de Nova Geração (SNG) na plataforma Illumina Miseq, com metodologia previamente descrita por Maloney, Molokin e Santin (2019).

Foi realizada PCR utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente, com exceção de que os primers foram modificados com o acréscimo de sequências adaptadoras do Illumina no primer forward ILMN_Blast505_532F 5' TCGTCGGCAGCGTAGATGTGTATAAGAGACAGGGAGGTAGTGACAAT AAATC-3' e reverse ILMN_Blast998_101R 5' GRCCGRGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGCTTTGCACTTGTTTCATC3' (as sequências dos adaptadores estão sublinhadas).

Para construção da biblioteca foi utilizado protocolo de Preparação da Biblioteca de Sequenciamento Metagenômico 16s da Plataforma Illumina (Part#15044223 Rev. B). Uma estratégia de indexação dupla foi utilizada durante a preparação das sequências da biblioteca. Isso ativou a multiplexação das amostras e garantiu que cada biblioteca tivesse um conjunto exclusivo de índices pelos quais pudessem ser identificados pela bioinformática. Para a quantificação das bibliotecas finais foi utilizado fluorômetro Qubit (Invitrogen, EUA). Uma concentração final da biblioteca combinada de 8 pM com 20% de controle Phix foi sequenciado no Illumina Miseq utilizando kit MiSeq Reagent v.3 de 600 ciclos (Illumina, USA), seguindo instruções do fabricante.

4.8.4 Análise de Bioinformática

Os arquivos bcl (Illumina) brutos foram desmultiplexados com o programa Illumina Miseq Reporter. As leituras finais emparelhadas foram processadas e analisadas utilizando-se os pacotes BBTools v38.22 (BUSHNELL, 2014), VSEARCH v2.8.0 (ROGNES et al., 2016) e BLAST + 2.7.1. Após a remoção dos “singletons”, o agrupamento e as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram realizadas em cada amostra, com limite de identidade de 98%. Somente as OTUs com mínimo de 100 sequências foram mantidas. Todos os arquivos *fasta* brutos foram comparados com sequências depositadas no GenBank para determinar o subtipo presente em cada amostra.

4.9 Diagnóstico e caracterização molecular dos genótipos de *Enterocytozoon bieneusi*

4.9.1 Reação de nested-PCR

Foi utilizado protocolo de nested-PCR previamente descrito por Buckholt et al. (2002), para amplificação de fragmentos dos genes SSU rRNA, ITS e LSU rRNA de *E. bieneusi*, com os primers:

- Externos: EBITS3 (5' GGTCATAGGGATGAAGAG 3') e EBITS4 (5' TTC-GAGTTCTTTTCGCGCTC 3')
- Internos: EBITS1 (5' GCTCTGAATATCTATGGCT 3') e EBITS2.4 (5' ATCGCCGACGGATC-CAAGTG 3').

A PCR foi executada em volume final de 25 µL, com 1x tampão (50mM KCL, 20 mM Tris-HCl), 1.5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 2,5 U de Taq DNA Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2,5 µL BSA (0.1 g/10 mL), e 2 µM de cada primer. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por 3 min; com total de 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s e extensão a 72°C por 40s) seguida de extensão final a 72°C por 10 min. A segunda PCR foi realizada igual a primeira, com exceção de que foram utilizados 30 ciclos e a temperatura de anelamento foi de 55°C. Controles negativo (água livre de Dnase e Rnase) e positivo (amostra de DNA positiva testada por PCR e confirmada por sequenciamento em estudo anterior) foram utilizados em todas as reações.

4.9.2 Eletroforese

Todos os produtos da nested-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) [1M Tris-HCl (ph 8.0), 0,83M ácido bórico, 20 mM EDTA) e revelados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) de acordo com instruções do fabricante. O gel foi observado em transiluminador ultravioleta, para visualização dos produtos amplificados e os fragmentos de DNA foram

analisados, comparativamente, com marcadores de DNA de 100 pares de base.

As amostras de DNA positivas na PCR foram enviadas ao “Environmental Microbial and Food Safety Laboratory” - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA - Beltsville, Maryland), para realização do sequenciamento.

4.9.3 Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento de *Enterocytozoon bieneusi*

Os produtos de todas as amostras positivas foram purificados com a enzima ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH). As reações de sequenciamento foram realizadas nas duas direções (método Sanger), em volume final de 10 µL, utilizando-se os mesmos primers da segunda PCR e reagente *BigDye terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit*. Para o sequenciamento utilizou-se o analisador de ácidos nucleicos ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.9.4 Avaliação, edição e alinhamento das sequências

As sequências de nucleotídeos obtidas nos dois sentidos (*forward* e *reverse*) foram alinhadas, examinadas e comparadas utilizando-se o software SeqMan™ (DNASTarInc., Madison, Wisconsin). O programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) foi utilizado para comparar a similaridade das sequências encontradas com aquelas disponíveis no GenBank, para identificar os genótipos de *E. bieneusi* encontrados.

5. RESULTADOS

5.1 Amostras coletadas

Entre janeiro e julho de 2018, foram coletadas 153 amostras fecais de animais, sendo estas, 50 de galinhas, 35 de porcos, 11 de cavalos e 57 de bovinos em 14 propriedades rurais de sete municípios da microrregião de Uberlândia, Minas Gerais (Tabela 3).

Tabela 3: Local de coleta das amostras fecais, espécies animais e número de amostras por espécie de animal, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.

Local		Espécies animais (n)	Nº total de amostras / propriedade
ARI	Propriedade 1	Bovino (22)	22
	Propriedade 2	Bovino (10), Cavalo (1)	11
	Propriedade 3	Galinha (3), Porco (2)	5
	Propriedade 4	Galinha (3)	3
CA	Propriedade 5	Galinha (2), Porco (1), Cavalo (1), Bovino (1)	5
CR	Propriedade 6	Galinha (1), Bovino (24)	25
MA	Propriedade 7	Galinha (10), Porco (12)	22
PR	Propriedade 8	Galinha (2), Porco (4)	6
TUP	Propriedade 9	Porco (3), Cavalo (9)	12
	Propriedade 10	Galinha (4), Porco (7)	11
UDI	Propriedade 11	Galinha (17)	17
	Propriedade 12	Galinha (8)	8
	Propriedade 13	Porco (3)	3
	Propriedade 14	Porco (3)	3
Total		-	153

ARI = Araguari; CA = Canápolis; CR = Cascalho Rico; MA = Monte Alegre de Minas, PR = Prata; TUP = Tupaciguara; UDI = Uberlândia

5.2 *Blastocystis* spp.

5.2.1 Positividade de *Blastocystis* spp.

Das 153 amostras fecais avaliadas, 93 (60,8%) foram positivas para *Blastocystis* spp. na PCR (Figura 2 e Tabela 4). Das 50 amostras de galinhas, 18 (36%) estavam positivas; das 34 de porcos, 31 (91,2%) apresentaram positividade; dentre as 11 amostras de cavalos, apenas uma (9%) estava positiva e das 57 de bovinos, 43 (75,4%) apresentaram positividade (Tabela 4). O parasito foi encontrado em todas as propriedades rurais, com prevalência variando entre 12,5 a 100% nas amostras fecais (Tabela 5).

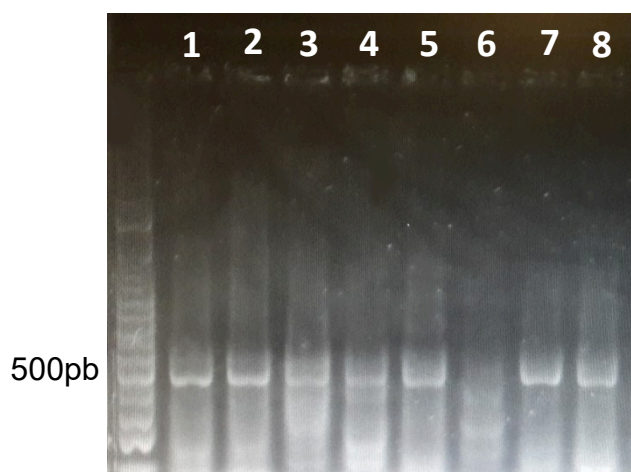


Figura 2: Gel de agarose a 1,5% corado com GelRed, mostrando, fragmentos de aproximadamente 500 pb do gene SSU rDNA de *Blastocystis* spp., amplificado pela PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de animais procedentes de propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG, coletadas entre janeiro e julho de 2018. Colunas 1 a 5 e 7: Amostras positivas para *Blastocystis* spp.; Coluna 6: Controle negativo para *Blastocystis* spp.; Coluna 8: Controle positivo (*Blastocystis* spp.).

Tabela 4: Positividade de *Blastocystis* spp. encontrada nas amostras fecais das diferentes espécies de animais, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.

Espécie Animal	Total de amostras	Nº amostras positivas	Prevalência (%)
Galinha	50	18	36,0
Porco	35	31	88,6
Cavalo	11	1	9,0
Bovino	57	43	75,4
Total	153	93	60,8

Tabela 5: Comparação da positividade de *Blastocystis* spp. entre as 14 propriedades rurais analisadas, localizadas na microrregião de Uberlândia, MG, cujas coletas fecais foram realizadas entre janeiro e julho de 2018.

Local		Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)
ARI	Propriedade 1	22	17	77,3
	Propriedade 2	11	9	81,8
	Propriedade 3	5	1	20,0
	Propriedade 4	3	2	66,7
CA	Propriedade 5	5	3	60,0
CR	Propriedade 6	25	17	68,0
MA	Propriedade 7	22	17	77,3
PR	Propriedade 8	6	6	100
TUP	Propriedade 9	12	3	25,0
	Propriedade 10	11	8	72,7
UDI	Propriedade 11	17	4	23,5
	Propriedade 12	8	1	12,5
	Propriedade 13	3	2	66,7
	Propriedade 14	3	3	100,0
Total		153	93	60,8

ARI = Araguari; CA = Canápolis; CR = Cascalho Rico; MA = Monte Alegre de Minas, PR = Prata; TUP = Tupaciguara; UDI = Uberlândia

5.2.2 Identificação dos subtipos de *Blastocystis* spp.

As 93 amostras positivas de *Blastocystis* spp. gerou um total de 25.408.574 leituras finais emparelhadas no Illumina Miseq. Após o corte final, filtragem de qualidade e fusão dos pares, 5.258.382 leituras permaneceram. A remoção de sequências quiméricas, gerou um total de 4.536.567 leituras mescladas que foram utilizadas para a geração da unidade taxonômica operacional (OTU). O agrupamento gerou 827 OTUs entre as 93 amostras positivas e destas, 139 foram sequências únicas. Foram identificados 14 subtipos distintos de *Blastocystis* spp., sendo 13 identificados e relatados por outros autores (ST1, ST3 ao ST7, ST10, ST14, ST21, ST23 ao ST26) e um ST novo (Tabela 6). Um subtipo é considerado novo, quando há divergência de 5% na sequência do gene SSU-rDNA em relação as sequências previamente depositadas no GenBank (CLARK, *et al.*, 2013). Esse subtipo será nomeado de acordo com nomenclatura proposta por Stensvold *et al.* (2007a).

Todas as sequências de *Blastocystis* spp. obtidas nesse estudo, apresentaram 100% de similaridade com as depositadas no GenBank, exceto o subtipo 6 que apresentou 99,37% e o subtipo novo que apresentou 93% de similaridade com o ST14.

Infecções mistas, foram observadas em 81,7% (76/93) das amostras positivas. As galinhas, apresentaram 88,9% de infecção mista e a principal combinação foi entre os ST1 e ST5 (3/16); nos porcos, 54,8%, sendo a co-infecção entre os ST1, ST3 e ST5 (10/17) a mais comum. A única amostra positiva de cavalo, apresentou co-infecção entre os ST10, ST21, ST23, ST25 e ST26. Das 43 amostras positivas de bovinos, apenas em uma amostra não foi observado infecção mista. A combinação entre os ST10, ST14, ST21, ST23, ST24, ST25 e ST26 (5/42) foi a mais observadas (Tabela 6).

Dos subtipos encontrados, seis são considerados zoonóticos (ST1, ST3 ao ST7), sendo o ST5 o que apresentou maior prevalência (44,1%), estando presente em 11 propriedades rurais em todas as espécies de animais, exceto na amostra de cavalo (Tabela 6). Esse subtipo foi prevalente em 55,6% das amostras de galinhas; 93,5% dos porcos e em 4,6% dos bovinos (Tabela 7).

Tabela 6: Subtipos de *Blastocystis* spp. encontrados nas amostras fecais das diferentes espécies de animais coletadas entre janeiro e julho 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.

Local		Espécie animal	Nº total de amostras	Nº de amostras positivas	Subtipos de <i>Blastocystis</i> spp.
ARI	Propriedade 1	Bovino	22	17	ST1/ST5/ST24 (1), ST4 (2), ST10 (17), ST14 (3), ST21 (9), ST23 (5), ST25 (16), ST26 (17), ST Novo (2)
	Propriedade 2	Bovino	10	8	ST1 (2), ST10 (7), ST14/ST23/ST Novo (1), ST21 (5), ST25 (8), ST26 (6)
		Cavalo	1	1	ST10, ST21, ST23, ST25, ST26
	Propriedade 3	Porco	2	1	ST5
		Galinha	3	0	-
	Propriedade 4	Galinha	3	2	ST1/ST4/ST6/ST7 (1), ST5 (2)
CA	Propriedade 5	Porco	1	0	-
		Galinha	2	2	ST1/ST3/ST5/ST14/ST21/ST23/ST25 (1), ST10 (2)
		Bovino	1	1	ST10, ST14, ST26
		Cavalo	1	0	-
CR	Propriedade 6	Galinha	1	0	-
		Bovino	24	17	ST4/ST5/ST Novo (1), ST10 (17), ST14 (8), ST21 (15), ST23 (8), ST24 (12), ST25 (15), ST26 (16)
MA	Propriedade 7	Porco	12	12	ST1 (4), ST3 (3), ST5 (12)
		Galinha	10	5	ST1/ST5 (4), ST3/ST6/ST7/ST10/ST14/ST21/ST23 (1), ST25 (2)
PR	Propriedade 8	Porco	4	4	ST1 (4), ST3/ST5 (3)
		Galinha	2	2	ST1/ST3/ST5/ST26 (1), ST10 (2)
TUP	Propriedade 9	Cavalo	9	0	-
		Porco	3	3	ST1/ST5 (3), ST4 (2)
	Propriedade 10	Porco	7	6	ST1/ST3 (5), ST5 (6)
		Galinha	4	2	ST1/ST3/ST15 (1), ST5 (2)
UDI	Propriedade 11	Galinha	17	4	ST6 (2), ST7 (4), ST26 (1)
	Propriedade 12	Galinha	8	1	ST10, ST25, ST26
	Propriedade 13	Porco	3	2	ST1/ST5 (1)
	Propriedade 14	Porco	3	3	ST3 (1), ST5 (3)
Total			153	93	

ARI = Araguari; CA = Canápolis; CR = Cascalho Rico; MA = Monte Alegre de Minas, PR = Prata; TUP = Tupaciguara; UDI = Uberlândia

Tabela 7: Número de amostras fecais positivas e subtipos de *Blastocystis* spp. por espécie de animal, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.

Espécie Animal	Nº de amostras positivas	Subtipos de <i>Blastocystis</i> spp. (n)
Porco	31	ST1(17), ST3 (12), ST4 (2), ST5 (29)
Galinha	18	ST1(8), ST3/ST6/ST25 (4), ST4/ST15 (1), ST5 (10), ST7/ST10 (6), ST14/ST21/ST23 (2), ST26 (3)
Bovino	43	ST1/ST4 (3), ST5 (2), ST10 (42), ST14/ST24 (13), ST21 (29), ST23 (14), ST25 (39), ST26 (40), ST Novo (4)
Cavalo	1	ST10, ST21, ST23, ST25, ST26
Total	93	ST1(28), ST3 (16), ST4 (6), ST5 (41), ST6 (4), ST7 (6), ST10 (49), ST14 (15), ST21 (32), ST23 (17), ST24 (13), ST25 (44), ST26 (44), ST Novo (4)

5.3 *Enterocytozoon bieneusi*

5.3.1 Positividade de *Enterocytozoon bieneusi*

Do total das 153 amostras, 25 (16,3%) foram positivas para *E. bieneusi* após análise pela nested-PCR (Figura 3 e Tabela 8). Das 50 amostras de galinhas, cinco (10%) estavam positivas; das 34 de porcos, 16 (47%) apresentaram positividade; dentre as 11 amostras de cavalo, nenhuma estava positiva e das 57 amostras de bovinos, quatro (7%) apresentaram positividade (Tabela 8). Amostras positivas foram identificadas em 10 propriedades rurais, com prevalência variando entre 0 a 83,3% nas amostras fecais (Tabela 9).

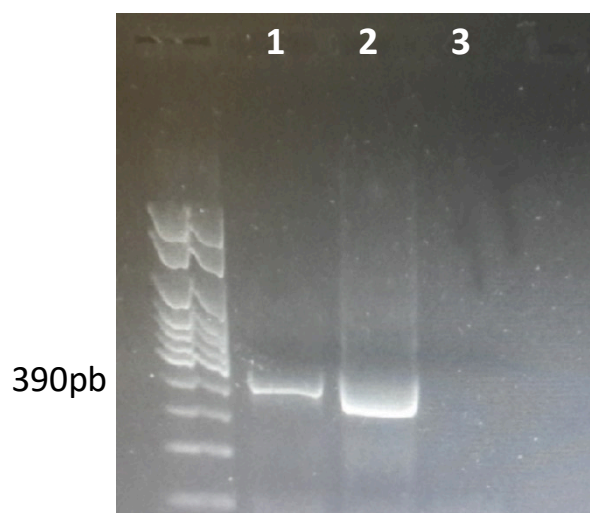


Figura 3: Gel de agarose 1,5% corado com GelRed, mostrando, fragmentos de 390 pb do gene ITS de *Enterocytozoon bieneusi*, amplificado pela nested-PCR, a partir do DNA obtido de amostras fecais de animais das propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG, coletadas entre de janeiro a julho de 2018. Coluna 1: Amostra positiva para *E. bieneusi*.; Coluna 2: Controle positivo (*E. bieneusi*); Coluna 3: controle negativo.

Tabela 8: Positividade de *Enterocytozoon bieneusi* encontrada nas amostras fecais das diferentes espécies de animais, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.

Espécie Animal	Total de amostras	Nº amostras positivas	Prevalência (%)
Galinha	50	5	10,0
Porco	34	16	47,0
Cavalo	11	0	0,0
Bovino	57	4	7,0
Total	153	25	16,3

Tabela 9: Comparação da positividade de *Enterocytozoon bieneusi* entre as 14 propriedades rurais analisadas, localizadas na microrregião de Uberlândia, MG, cujas coletas fecais foram realizadas entre janeiro e julho de 2018

Local		Total de amostras	Nº de amostras positivas	Positividade (%)
ARI	Propriedade 1	22	3	13,6
	Propriedade 2	11	0	0,0
	Propriedade 3	5	1	20,0
	Propriedade 4	3	0	0,0
CV	Propriedade 5	6	1	16,7
CR	Propriedade 6	25	1	4,0
MA	Propriedade 7	22	4	18,2
PR	Propriedade 8	6	5	83,3
TUP	Propriedade 9	12	1	8,3
	Propriedade 10	11	5	45,5
UDI	Propriedade 11	17	2	11,8
	Propriedade 12	8	0	0,0
	Propriedade 13	3	0	0,0
	Propriedade 14	3	2	66,7
Total		153	25	16,3

ARI = Araguari; CA = Canápolis; CR = Cascalho Rico; MA = Monte Alegre de Minas, PR = Prata; TUP = Tupaciguara; UDI = Uberlândia

5.3.2 Identificação dos genótipos de *Enterocytozoon bieneusi*

As 25 amostras positivas para *E. bieneusi* identificadas na nested-PCR foram sequenciadas com sucesso e as sequências do ITS foram comparadas com as encontradas no GenBank pela análise de BLAST. Oito genótipos relatados e considerados zoonóticos por outros autores foram identificados, PigEb1, H, BEB8, EbpA, D, CS-1, I, Peru11. Todas as sequências de *E. bieneusi* obtidas nesse estudo, apresentaram 100% de similaridade com sequências depositadas no GenBank.

O genótipo PigEb1 foi identificado em oito amostras de porcos; o H em três porcos e uma galinha; BEB8 foi identificado em três bovinos; EbpA em dois porcos e uma galinha; o genótipo D estava presente em um porco e duas galinhas; o CS-1 em dois porcos, o I em um bovino e Peru11 em uma amostra de galinha (Tabela 10).

Observou-se infecção mista em apenas uma amostra de porco, entre os genótipos H e PigEb1 (Tabela 10).

A maior prevalência observada foi do genótipo PigEb1 (9/25) seguido por, H (4/25), D (3/25), BEB8 (3/25), EbpA (3/25), CS-1 (2/25), I (1/25) e Peru11 (1/25) (Tabela 11).

Tabela 10: Genótipos de *Enterocytozoon bieneusi* encontrados nas amostras fecais das diferentes espécies de animais, coletadas entre janeiro e julho 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.

Local		Espécie animal	Nº total de amostras	Nº de amostras positivas	Genótipos de <i>E. bieneusi</i>
ARI	Propriedade 1	Bovino	22	3	BEB8
	Propriedade 2	Bovino	10	0	-
		Cavalo	1	0	-
	Propriedade 3	Porco	2	1	H / PigEb1
		Galinha	3	0	-
	Propriedade 4	Galinha	3	0	-
CA		Porco	1	0	-
	Propriedade 5	Galinha	2	1	Peru11
		Bovino	1	0	-
		Cavalo	1	0	-
CR	Propriedade 6	Galinha	1	0	-
		Bovino	24	1	I
MA	Propriedade 7	Porco	12	3	CS-1 (1), EbpA (2)
		Galinha	10	1	EbpA
PR	Propriedade 8	Porco	4	4	H (2), CS-1 / D (1)
		Galinha	2	1	H
TUP	Propriedade 9	Cavalo	9	0	-
		Porco	3	1	PigEb1
	Propriedade 10	Porco	7	5	PigEb1
		Galinha	4	0	-
UDI	Propriedade 11	Galinha	17	2	D
	Propriedade 12	Galinha	8	0	-
	Propriedade 13	Porco	3	0	-
	Propriedade 14	Porco	3	2	PigEb1
Total			153	25	

ARI = Araguari; CA = Canápolis; CR = Cascalho Rico; MA = Monte Alegre de Minas, PR = Prata; TUP = Tupaciguara; UDI = Uberlândia

Tabela 11: Número de amostras fecais positivas e genótipos de *Enterocytozoon bieneusi* por espécie de animal, coletadas entre janeiro e julho de 2018, em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.

Espécie Animal	Nº de amostras positivas	Genótipos de <i>E. bieneusi</i> (n)
Porco	16	PigEb1 (9), H (3), CS-1 (2), EbpA (2), D (1)
Galinha	5	D (2), Peru11 (1), EbpA (1), H (1)
Bovino	4	BEB8 (3), I (1)
Cavalo	0	-
Total	25	PigEb1 (9), H (4), BEB8 (3), EpA (3), D (3), CS-1 (2), Peru11 (1), I (1)

5.4 Infecções concomitantes entre *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi*

Das 153 amostras analisadas, 23 apresentaram infecção concomitante entre *Blastocystis* spp. e *E. bieneusi*, sendo três em galinhas (13%), 16 em porcos (69,6%) e quatro em bovinos (17,4%) (Tabela 12).

Tabela 12: Infecções concomitantes entre *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em amostras fecais coletadas entre janeiro e julho de 2018, nas diferentes espécies de animais em 14 propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, MG.

Local		Espécie Animal	Nº de amostras positivas
ARI	Propriedade 1	Bovino	3
	Propriedade 3	Porco	1
CA	Propriedade 5	Galinha	1
CR	Propriedade 6	Bovino	1
MA	Propriedade 7	Porco	3
		Galinha	1
PR	Propriedade 8	Porco	4
		Galinha	1
TUP	Propriedade 9	Porco	1
	Propriedade 10	Porco	5
UDI	Propriedade 14	Porco	2
Total			23

ARI = Araguari; CA = Canápolis; CR = Cascalho Rico; MA = Monte Alegre de Minas, PR = Prata; TUP = Tupaciguara; UDI = Uberlândia

5.5 Sequências de *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi*

As sequências de *Blastocystis* spp. e *E. bieneusi* identificadas nessa pesquisa serão, posteriormente, depositadas no GenBank.

6. DISCUSSÃO

6.1 *Blastocystis* spp.

Blastocystis spp. é protista anaeróbico que infecta diferentes espécies de animais no mundo, incluindo o homem e comprometendo o trato gastrointestinal de aves, répteis, bovinos, suínos, cães, gatos, primatas não-humanos, dentre outros (SCANLAN, 2012; DENG *et al.*, 2019). A transmissão é por via fecal-oral e a capacidade que o parasito possui em se adaptar em diferentes hospedeiros pode explicar a distribuição em várias regiões do mundo (YOSHIKAWA *et al.*, 2004).

A técnica de diagnóstico utilizada para determinar os padrões de infecção é importante e pode influenciar na real prevalência desse patógeno (CLARK *et al.*, 2013). Por muitos anos, a microscopia convencional foi utilizada como principal ferramenta para detectar parasitos intestinais, incluindo *Blastocystis* spp. Entretanto, os métodos moleculares têm auxiliado, aumentando a especificidade e sensibilidade do diagnóstico, além de ser possível determinar os subtipos do parasito (SKOTARCZAK, 2018). Nesse estudo, tanto a detecção da positividade como a identificação dos subtipos foram realizados pela PCR convencional e pelo SNG, que torna o diagnóstico altamente confiável e relevante.

No presente trabalho, *Blastocystis* spp. foi observado em todas as propriedades rurais analisadas. Porém, apesar de ser um parasito comum, não existem na literatura relatos sobre a presença do mesmo na microrregião de Uberlândia, MG. Em Uberaba, município próximo mas pertencente a outra microrregião, Moura *et al.* (2018) observaram porcos, bovinos e ovelhas positivos. Em algumas regiões do Brasil, foi identificado no homem, em porcos, ovelhas, bovinos, primatas não-humanos, roedores, guaxinins, tatus, galinhas, patos, baratas, tartarugas, javalis e marsupiais (cuíca e gambá) (DAVID *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2018; VALENÇA-BARBOSA *et al.*, 2019).

O parasito foi detectado em 36% das amostras de galinhas nesse trabalho, sendo este resultado semelhante ao de Greige *et al.*, (2018) que detectaram positividade semelhante em amostras coletadas nesse hospedeiro em fazendas localizadas no norte e sul do Líbano. O resultado encontrado foi maior quando comparado aos estudos realizados na China (13%) e Austrália (4%) (ROBERTS *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2018). Essa diferença encontrada pode estar relacionada ao

número amostral, manejo dos animais e área geográfica. No Brasil, existem dois estudos relacionados a *Blastocystis* spp., os quais em um deles a positividade foi detectada pelo método tradicional de microscopia (BERGANO DO BONFIM; MACHADO DO COUTO, 2013) e o outro pela técnica de PCR (VALENÇA-BARBOSA *et al.*, 2019). Comparando os resultados encontrados nesse estudo e o de Valença-Barbosa *et al.* (2019), ambos utilizando a PCR, observou-se prevalência maior do que a relatada por esses autores.

Os porcos são considerados hospedeiros comuns de *Blastocystis* spp. (NAVARRO *et al.*, 2008). A positividade encontrada no presente trabalho (88,6%) corrobora com os achados de outros autores, também utilizando diagnóstico molecular (PCR), que observaram prevalência variando entre 8,8 a 77% (NAVARRO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; UDONSON *et al.*, 2018; PINTONG *et al.*, 2018; VALENÇA-BARBOSA *et al.*, 2019). Wang *et al.* (2014) identificaram *Blastocystis* spp. em amostras de porcos (76,7%) e dos seus tratadores (83,3%) em trabalho realizado na Austrália, sugerindo que os porcos tem papel importante na transmissão do parasito para o homem, uma vez que as infecções em humanos estão relacionadas ao contato direto com animais infectados (SKOTARCZAK, 2018). No Brasil há dois relatos, sendo o primeiro realizado em Uberaba por Moura *et al.* (2018) com prevalência de 61,5% e o segundo no Rio de Janeiro com 77% (VALENÇA-BARBOSA *et al.*, 2019).

Informações sobre a presença do parasito em cavalos são escassas na literatura. Thathaisong *et al.* (2003) analisando amostras dessa espécie de animal, observaram apenas uma positiva (12,5%), sendo esse resultado semelhante ao do presente estudo (9,0%).

A prevalência de *Blastocystis* spp. nas amostras fecais dos bovinos desse estudo (75,4%), corroborou com Moura *et al.* (2018) no Brasil, e com outras pesquisas em diversos países, tais como Colômbia, Líbano e Indonésia (RAMIREZ *et al.* 2014; GREIGE *et al.*, 2019; HASTUTIEK *et al.*, 2019). Entretanto, foi superior a observada no Iran (9,6%), China (9,5% e 10,3%), Coreia (6,7%), EUA (2,9%), Turquia (11,25%) e Emirados Árabe Unidos (22,7%) (BADPARVA; SANDRAEE; KHEIRANDISH, 2015; WANG *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2018; MALONEY *et al.*, 2018; AYNUR *et al.*, 2019; ABUODEH *et al.*, 2019). A diferença encontrada entre o presente estudo e os demais, pode ser explicada por múltiplos

fatores incluindo região geográfica estudada e número amostral. Assim como os porcos, os bovinos são considerados hospedeiros frequentes do parasito em várias regiões do mundo, podendo também servir como potenciais reservatórios para o homem (MALONEY *et al.*, 2018).

O sequenciamento parcial do gene SSU-RNAr de *Blastocystis* spp. revelou a presença de 14 subtipos, sendo 13 (ST1, ST3 ao ST7, ST10, ST14, ST21, ST23 ao ST26) identificados anteriormente. Desses, os ST1, ST3 ao ST7 são considerados zoonóticos e os demais espécie-específicos. Neste estudo, foi identificado nas amostras de bovinos um novo subtipo (que se aproxima do ST14), que será depositado posteriormente no GenBank.

No presente estudo, os subtipos mais detectados nas galinhas, porcos e bovinos foram os ST1, ST4 e ST5. Análises realizadas sobre os subtipos 1, 2, 3 e 4 demonstraram que esses não apresentam especificidade de hospedeiros e são de potencial zoonótico (ALFELLANI *et al.*, 2013). Assim como nos animais, esses subtipos são os mais reportados em humanos, representando 90% das infecções por *Blastocystis* spp. no homem (ALFELLANI *et al.*, 2013; CLARK *et al.*, 2013; SKOTARCZAK, 2018). O subtipo 4 também foi reportado em primatas não-humanos na Colômbia, em bovinos nos EUA, China e Líbano, em roedores na Indonésia e Emirados Árabes Unidos e em javalis e baratas no Brasil (RAMIREZ *et al.*, 2014; GREIGE *et al.*, 2018; MALONEY *et al.*, 2018; DENG *et al.*, 2019; YOSHIKAWA *et al.*, 2016; ABUODEH *et al.*, 2019; VALENÇA-BARBOSA *et al.*, 2019). Apesar de ser considerado zoonótico, ST5 aparece em maior proporção em porcos. Sendo esses animais, considerados hospedeiros naturais (WANG *et al.*, 2014). Na literatura existem relatos da identificação de outros subtipos, tais como ST1 e ST3 em porcos na Austrália, China e Tailândia (ROBERTS *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2017; PINTONG *et al.*, 2018; UDONSOM *et al.*, 2018). Em bovinos, os subtipos 1 e 5 foram encontrados na Colômbia e no Líbano, enquanto no Iran além do ST5, o ST3 foi mais prevalente (RAMÍREZ *et al.*, 2014; GREIGE *et al.*, 2019; BADPRAVA; SADRAEE; KHEIRANDISH, 2015). No Brasil, ST1 foi identificado em porcos por Moura *et al.* (2018) e ST5 em galinhas por Valença-Barbosa *et al.* (2019).

Os ST6 e ST7, foram identificados nas amostras de galinhas desse trabalho corroborando com Rivera *et al.*, (2008); Yoshikawa *et al.* (2016); D'Afonso *et al.* (2017); Wang *et al.* (2018); Greige *et al.* (2018). Esses STs são considerados

“subtipos aviários”, pois são frequentemente identificados em aves em estudos conduzidos em várias regiões do mundo (NOEL, *et al.*, 2005; STENSVOLD *et al.*, 2007b; WANG *et al.*, 2018; GREIGE, *et al.*, 2018). O subtipo 6 foi isolado de galinhas e dos tratadores desses animais no Líbano, sugerindo que as aves poderiam servir de reservatórios para a infecção humana, uma vez que são criadas em contato próximo ao homem (GREIGE *et al.*, 2018).

Nesse presente trabalho, ST10 foi observado nas amostras de bovinos, galinhas, e cavalos e o ST14 em galinhas e bovinos. Os bovinos são considerados hospedeiros naturais dos subtipos 10 e 14, devido a alta prevalência nesses animais (GREIGE *et al.*, 2019; ABUODEH *et al.*, 2019). Esses subtipos, foram isolados de bovinos por outros autores em vários países. Nos EUA por Maloney; Molokin; Santín (2019); na Líbia por Alfallani *et al.* (2013); no Japão por Masuda *et al.* (2018); Coréia do Sul por Lee *et al.* (2018); China por Zhu *et al.* (2017) e Wang *et al.* (2018) e no Líbano por Greige *et al.* (2019). Zhao *et al.* (2017) fizeram o primeiro relato da identificação do subtipo 10 em cavalos, vindo de encontro com os achados desse estudo.

A partir de 2017, outros subtipos foram identificados e nomeados, sendo o ST21 em antílope e os subtipos 23 ao 26 em bovinos (ZHAO *et al.*, 2017; MALONEY *et al.*, 2018; MALONEY; MOLOKIN; SANTIN, 2019). No presente estudo, também foram encontrados bovinos parasitados por esses subtipos.

Infecções mistas, com diferentes subtipos, foram identificadas na maioria das amostras de todos os animais desse estudo, assim como observado por outros autores (FAYER; SANTIN; MACARISIN, 2012; MALONEY *et al.*, 2018; AYNUR *et al.*, 2019). Estas infecções mistas, apesar de serem comuns, não são identificadas por PCR convencional e sequenciamento. Para essa identificação, é necessário realizar clonagem ou SNG (YOSHIKAWA *et al.*, 2004; SANTIN *et al.*, 2011, MALONEY; MOLOKIN; SANTIN, 2019). Porém, muitos estudos utilizam apenas as primeiras abordagens para identificar *Blastocystis* spp., subestimando assim, os reais resultados (WANG *et al.*, 2014; HELENBROOK *et al.*, 2015).

6.2 *Enterocytozoon bieneusi*

E. bieneusi foi identificado em aves e em vários hospedeiros mamíferos incluindo o homem, em diferentes regiões do mundo (SANTIN; FAYER, 2011; FENG *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; CUNHA; CURY; SANTIN, 2016; CUNHA; CURY; SANTIN, 2017). Os animais são considerados reservatórios sendo relevantes na epidemiologia do parasito e na saúde pública. As fontes e rotas de transmissão necessitam ser melhor elucidadas para entender o papel dos animais na transmissão.

Nesse estudo, foi observado *E. bieneusi* na maioria das propriedades avaliadas (71,4%), indicando que o parasito está presente na microrregião de Uberlândia, MG. Cunha; Cury; Santín (2016) relataram a presença do parasito em galinhas procedentes de comércios aviários no município de Uberlândia, que faz parte dessa microrregião, sendo esse o primeiro relato no Brasil, nessa espécie animal.

No mundo, a presença do microsporídio em galinhas foi relatada por Reetz *et al.* (2002), Feng *et al.* (2011) e Li *et al.* (2014), os quais observaram prevalência entre 14,28 a 25,0%. Os resultados encontrados nesse estudo (10%), foram inferiores aos relatados por esses autores. A discrepância entre os resultados pode ter ocorrido pela diferença entre o número amostral, manejo dos animais e nível de contaminação ambiental. Ressalta-se que todos os resultados foram realizados utilizando diagnóstico molecular.

Dos porcos avaliados, neste presente trabalho, 47% foram positivos para *E. bieneusi*, estando essa prevalência menor do que a observada por Fiuza *et al.* (2015) (59,3%) no Rio de Janeiro. Entretanto, ao se comparar esses resultados com outros pelo mundo, observa-se que esta porcentagem encontra-se dentro da taxa mundial de prevalência. Estudos nos EUA, República Tcheca, Alemanha, Japão, China e Tailândia, demonstram taxas entre 14,8 a 94,0% (BUCKHOLT; LEE; TZIPORI, 2002; SAK *et al.* 2008; REETZ *et al.*, 2009; ABE; KIMATA 2010; ZOU *et al.*, 2018; THATHAISONG *et al.*, 2019).

Nste trabalho, não houve nenhuma amostras positiva para *E. bieneusi* em cavalos.

Existem vários estudos determinando a prevalência de *E. bieneusi* em bovinos. Nesses animais a prevalência relatada varia entre 4,4 a 17,5% (FAYER; SANTIN; TROUT *et al.*, 2007; Del COCO *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2015; FIUZA *et al.*, 2015;

WANG *et al.*, 2018; FENG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019). A prevalência encontrada nesse trabalho, está dentro desta faixa citada por esses autores. Dos animais criados em propriedades rurais, os bovinos parecem ser os mais estudados. Fiuza *et al.* (2015) foram os primeiros a relatar o parasito em bovinos no Brasil, no qual os autores observaram maior positividade em animais de aptidão leiteira do que de corte. Apesar do impacto econômico desse microsporídio não estar bem elucidado, a presença do parasito nessa espécie animal, pode influenciar na produtividade, sendo preocupante, pois o Brasil é um grande exportador de produtos de origem animal.

Após análise das sequências de nucleotídeos da região ITS de *E. bienersi* foram identificados apenas genótipos já relatados anteriormente por outros autores (D, EbpA, I, BEB8, CS-1, Peru11, H e PigEb1), não sendo identificados novos genótipos. Desses, apenas o genótipo BEB8, está inserido grupo filogenético 2, estando os demais no grupo 1. Ressalta-se que os dois grupos apresentam potencial zoonótico.

O genótipo D foi encontrado em humanos e em diversas espécies de animais como primatas não-humanos, porcos, bovinos, cabras, ovelhas, cães, gatos, macacos, cavalos, raposas, leões, ratos, coelhos e aves no mundo todo (LI; FENG; SANTIN, 2019). No Brasil, foi previamente identificado em humanos, suínos, bovinos, galinhas e em aves de cativeiro (FENG *et al.*, 2011; FIUZA *et al.*, 2015; FIUZA *et al.*, 2016a; CUNHA; CURY; SANTIN, 2016; CUNHA; CURY; SANTIN, 2017). É considerado genótipo importante, pois é frequentemente associado com a infecção humana. Nesse estudo, este genótipo foi observado em galinhas e porcos.

O genótipo EbpA também apresenta ampla diversidade de hospedeiros. Nessa pesquisa foi detectado em galinhas e porcos. Em revisão realizada por Li; Feng; Santín (2019), os autores relataram a presença desse genótipo em porcos no Brasil, China, República Tcheca, Alemanha, Japão, Polónia, Suíça, Tailândia e EUA e aves no Brasil, China e República Tcheca.

Na América do Sul, o genótipo I foi identificado na Argentina em bovinos (del COCO *et al.*, 2014) e no Brasil em bovinos e ovelhas (FIUZA *et al.*, 2016a; FIUZA *et al.*, 2016b), corroborando com os achados desse estudo, que identificou esse genótipo em bovinos.

Os genótipos Peru11, BEB8, CS-1, H e PigEb1 parecem ser limitados em relação a diversidade de hospedeiros. No presente trabalho, foram encontrados

esses genótipos nas espécies avaliadas. Esse genótipo também foi identificado anteriormente em humanos, primatas não-humanos, guaxinins, roedores e galinhas (BERN *et al.*, 2005; LEELAYOOVA *et al.*, 2006; YE *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2014; CUNHA; CURY; SANTIN, 2016).

BEB8 foi identificado em bovinos nesse estudo, assim como relatado por outros autores nessa mesma espécie animal (SANTIN; DARGATZ; FAYER, 2012; FIUZA *et al.*, 2016a; LI *et al.*, 2016). Nesse trabalho, CS-1 foi detectado em porcos corroborando com os resultados encontrados na China e no Brasil (LI *et al.*, 2014; FIUZA *et al.*, 2015; WAN *et al.*, 2016).

Nessa pesquisa, encontrou-se o genótipo H em porcos, corroborando com os achados de Rinder *et al.* (2000) na Alemanha, Jeong *et al.* (2007) na Coreia do Sul, Leelayoova *et al.* (2009) no Japão, Li *et al.* (2014) na China, Fiuza *et al.* (2015) no Brasil e por Prasertbun *et al.* (2017) na Tailândia, nesse mesmo hospedeiro. O genótipo PigEb1 foi identificado nesse estudo e por Fiuza *et al.* (2015) no Brasil, não havendo outro relato desse genótipo em outros países.

6.3 Infecções concomitantes entre *Blastocystis* spp. e *Enterocytozoon bieneusi*

Infecções concomitantes entre *Blastocystis* spp. e *E. bieneusi* foram identificadas em algumas amostras de galinhas, porcos e bovinos avaliados nesse trabalho, corroborando com os achados de Fayer; Santin; Macarisin (2012) que observaram a presença desses microrganismos em bovinos. Infecções concomitantes de diferentes espécies de parasitos, podem ser comuns, uma vez que a via de transmissão é a mesma (fecal-oral).

Apesar de não ter sido objetivo dessa pesquisa avaliar a dinâmica de transmissão, ressalta-se que os animais de diferentes espécies de algumas propriedades rurais estavam infectados pelos mesmos subtipos de *Blastocystis* spp. e genótipos de *E. bieneusi*, podendo-se inferir a transmissão animal-animal.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação dos subtipos e dos genótipos considerados zoonóticos e que, estiveram presentes nos animais dessa pesquisa, sugere a possibilidade de haver transmissão entre seres humanos e animais. São patógenos, cujos estudos são recentes, havendo lacunas a serem elucidadas em relação aos reais reservatórios e

ao modo de transmissão. Deve-se enfatizar, que uma das grandes dificuldades em relação a esses parasitos está relacionado ao diagnóstico, pois são patógenos que apresentam polimorfismo das formas evolutivas, tamanho diminuto e diversidade de subtipos e genótipos. Talvez por isso, estudos de casos controle para identificar fatores de risco, tais como o contato com certos animais e o impacto deste patógeno na economia e na saúde pública, ainda, são escassos.

Baseado nisso, estudos mais amplos devem ser realizados, pois o encontro de subtipos e genótipos zoonóticos desses parasitos na microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, representa um risco para infecções em seres humanos que, inclusive, já podem estar ocorrendo atualmente. Estes, devem ter maior número amostral, envolver dinâmica de transmissão entre animais e o homem e ser realizado com hospedeiros de diferentes procedências, faixas etárias e sexo. Tudo isso, na tentativa de aprofundar o conhecimento sobre esses parasitos e avaliar eventuais impactos econômicos e sociais da sua presença.

8. CONCLUSÕES

- ✓ *Blastocystis* spp. e *E. bieneusi* estão presentes em galinhas, porcos, bovinos e cavalos (somente *Blastocystis* spp.) em propriedades rurais na microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil;
- ✓ Foi identificado um subtipo novo de *Blastocystis* spp. em bovinos e outros subtipos previamente relatados em várias partes do mundo, sendo alguns zoonóticos;
- ✓ Nas amostras das galinhas e dos porcos, o subtipo ST5 (zoonótico) foi o mais prevalente, enquanto nos bovinos foi o ST10 (ainda não relatado em humanos);
- ✓ Infecções mistas por subtipos de *Blastocystis* spp. foram identificadas em várias amostras de todas as espécies animais analisadas;
- ✓ Todos os oito genótipos *E. bieneusi* encontrados possuem potencial zoonótico;
- ✓ Os genótipos D, PigEb1 e BEB8 de *E. bieneusi* foram mais prevalentes nas galinhas, porcos e bovinos, respectivamente;
- ✓ A infecção mista por genótipos de *E. bieneusi* ocorreu em menor proporção quando comparado às infecções mistas por subtipos de *Blastocystis* spp.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N.; KIMATA, L.; ISEKI, M. Molecular survey of *Enterocytozoon bieneusi* in a Japanese porcine population. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 10 (4), p. 425-427, 2010. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0039>

ABUODEH, R.; Ezzedine, S.; Madkour, M.; Stensvold, C. R.; Samie, A.; Nasrallah, G.; AlAbsi, E.; ElBakri, A. Molecular Subtyping of *Blastocystis* from Diverse Animals in the United Arab Emirates. **Journal Pre-Proof**, v. 170 (5), 2019. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2019.125679>

AJJAMPUR, S. S. R.; TAN, K. S. W. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. – Interpreting results from in vitro and in vivo studies. **Parasitology International**, v. 66(6), p. 772-779, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.007>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000261>

ALFELLANI, M. A.; TANER-MULLA, D.; JACOB, A. S.; IMEED, C. A.; YOSHIKAWA, H.; STENSVOLD, C. R.; CLARK, C. G. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. **Protist**, v. 164, p. 497–509, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.003>

ARISUE, N.; HASHIMOTO, T.; YOSHIKAWA, H.; NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, G.; NAKAMURA, F.; YANO, T.; HASEGAWA, M. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of Stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 42–53, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00339.x>

AYNUR, Z. E.; GOÇLU, O.; YILDIZ, I.; AYNUR, H.; ERTABAKLAR, H.; BOZDOĞAN, B.; ERTUG, S. Molecular characterization of *Blastocystis* in cattle in Turkey.

Parasitology Research, v. 118 (3), p. 1055-1059, 2019. doi: 10.1007/s00436-019-06243-8. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06243-8>

BADPARVA, E.; SADRAEE, J.; KHEIRANDISH, F. Genetic Diversity of *Blastocystis* Isolated From Cattle in Khorramabad, Iran. **Jundishapur Microbiology journal** 8(3):e14810, 2015. <https://doi.org/10.5812/jjm.14810>

BERGAMO DO BONFIM, T. C.; MACHADO DO COUTO, M. C. Morphological diagnosis and occurrence of *Blastocystis* spp. obtained from the stool samples of domestic bird species commercialized in municipal markets. **Journal of Parasitology and Vector Biology**, v. 5, p. 20-26, 2013.

BERN, C.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; RABKE-VERANI, J.; WILLIAMSON, J.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; VIVAR, A.; TICONA, E.; NAVINCOPA, M.; CAMA, V.; MOURA, H.; SECOR W. E.; VISVESVARA, G.; GILMAN, R. H. The epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 1658-1664, 2005. <https://doi.org/10.1086/429674>

BOOROM, K. F.; SMITH, H.; NIMRI, L.; VISCOGLIOSI, E.; SPANAKOS, G.; PARKAR, U. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. **Parasitology Vectors**, v. 1 (1), 2008. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-40>

BOREHAM, P. F. L.; STENZEL, D. J. *Blastocystis* in humans and animals: morphorlogy, biology and epizootiology. **Advances in Parasitoloty**, v. 32, p. 1-70, 1993. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60206-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60206-7)

BOTTEREL, F.; MINOZZI, C.; VITTECOQ, D.; BOUREE, P. Pulmonary localization of *Enterocytozzon bienersi* in an AIDS patient: Case report and review. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4800-4801, 2002. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4800-4801.2002>

BRASIL, P.; DE PAIVA, D. D.; DE LIMA, D. B.; DA SILVA, E. J.; PERALTA, J. M.; DA SILVA, A. J.; SODRÉ, F. C.; VILLELA, E. V.; MOURA, H. A 3-year follow-up of a Brazilian AIDS patient with protracted diarrhea caused by *Enterocytozoon bieneusi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40(4), p. 215-218, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651998000400002>

BRASIL, P.; DE LIMA, D. B.; DE PAIVA, D. D.; LOBO, M. S.; SODRÉ, F. C.; SILVA, S. P.; VILLELA, E. V.; DA SILVA, E. J.; PERALTA, J. M.; MORGADO, M.; MOURA, H. Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42(6), p. 299-304, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652000000600001>

BRUMPT, E. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v.5, p.725–730, 1912.

BUCKHOLT, M.A.; LEE, J.H.; TZIPORI, S. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2595–2599, 2002. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2595-2599.2002>

CAMA, V. A.; PEARSON, J.; CABRERA, L.; PACHECO, L.; GILMAR, R.; MEYER, S.; ORTEGA, Y.; XIAO, L. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* between a child and guinea pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2780-2710, 2007. <https://doi.org/10.1128/JCM.00725-07>

CLARK, C. G.; VAN DER GIEZEN, M.; ALFELLANI, M. A.; STENSVOLD, C. R. Recent developments in *Blastocystis* research. **Advances in Parasitology**, v. 82, p. 1–32, 2003. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00001-0>

COTTE, L. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 2003-2008, 1999. <https://doi.org/10.1086/315112>

CUNHA, M. J. R.; CURY, M. C.; SANTIN, M. Widespread presence of humanpathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in chickens. **Veterinary Parasitology**, v.217, p.108-112, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.019>

CUNHA, M. J. R.; CURY, M. C.; SANTIN, M. Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds. **Parasitology Research**, v. 116, p. 487-493, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5309-6>

D'ALFONSO, R.; SANTORO, M.; ESSI, D.; MONSIA, A.; KABORÉ, Y.; GLÉ, C.; DI CAVE, D.; SORGE, R. P.; DI CRISTANZIANO, V.; BERRILLI, F. *Blastocystis* in Côte d'Ivoire: molecular identification and epidemiological data. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36 (11), p. 2243–2250, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3053-1>

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. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0714-8>

del COCO, V. F.; CÓRDOBA, M. A.; BILBAO, G.; de ALMEIDA CASTRO, P.; BASUALDO, J. A.; SANTÍN, M. First report of *Enterocytozoon bieneusi* from dairy cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.199, p.112-115, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.024>

DENG, L.; LI, W.; ZHONG, Z.; GONG, C.; LIU, X.; HUANG, X.; XIAO, L.; ZHAO R.; WANG, W.; FENG, F.; ZHANG, Y.; HU, Y.; FU, H.; HE, M.; ZHANG, Y.; WU K.; PENG, G. Molecular characterization and multilocus genotypes of *Enterocytozoon*

bieneusi among horses in southwestern China. **Parasites & Vectors**, v. 9, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1844-3>

DENG, L.; CHAI, Y.; ZHOU, Z.; LIU, H.; ZHONG, Z.; HU, Y.; FU, H.; YUE, C.; PENG, G. Epidemiology of *Blastocystis* sp. infection in China: a systematic review. **Parasite**, v. 26, 2019. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019042>

DESPORTES, I.; LE CHARPENTIER, Y.; GALIAN, A.; BERNARD, F.; COCHAND-PRIOLLET, B.; LAVERGNE, A.; RAVISSE, P.; MODIGLIANI, R. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. **The Journal of Protozoology**, v. 32 (2), 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb03046.x>

DIDIER, E. S.; STOVALL, M. E.; GREEN, L. C.; BRINDLEY, P. J.; SESTAK, K.; DIDIER, P. J. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.145-166, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.006>

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. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1031-3>

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M. *Enterocytozoon bieneusi* in mature dairy cattle on farms in the eastern United States. **Parasitology research**, v. 102, p.15-20, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0746-x>

FAYER, R.; SANTIN, M.; MACARISIN, D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1349-1355, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2971-1>

FENG, Y.; LI, N.; DEAREN, T.; LOBO, M. L.; MATOS, O.; CAMA, V.; XIAO, L. Development of a multilocus sequence typing tool for high-resolution genotyping of *Enterocytozoon bieneusi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 4822-4828, 2011. <https://doi.org/10.1128/AEM.02803-10>

FENG, Y.; Gong, X.; Zhu, K.; Li N.; Yu, Z.; Guo, Y.; Weng, Y.; Kváč, M.; Feng, Y.; Xiao, L. Prevalence and genotypic identification of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in pre-weaned dairy calves in Guangdong, China. **Parasit Vectors**, v. 12, p. 41. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3310-5>

FIUZA, V. R.; OLIVEIRA, F. C.; FAYER, R.; SANTIN, M. First report of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs in Brazil. **Parasitology Internacional**, v. 64, p. 18-23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.01.002>

FIUZA, V. R.; LOPES, C. W.; OLIVEIRA, F. C.; FAYER, R.; SANTIN, M. New findings of *Enterocytozoon bieneusi* in beef and dairy cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 216, p. 46-51, 2016a. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.008>

FIUZA, V. R.; LOPES, C. W.; COSENDEY, R. I. J.; OLIVEIRA, F. C.; FAYER, R.; SANTIN, M. Zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes found in Brazilian sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 107, p. 196-201, 2016b. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.06.006>

GALVÁN-DÍAZ, A. L.; MAGNET, A.; FENOY, S.; HENRIQUES-GIL, N.; HARO, M.; GORDO, F. P.; MILLÁN, J.; MIRÓ, G.; del ÁGUILA, C.; IZQUIERDO, F. Microsporidia detection and genotyping study of human pathogenic *E. bieneusi* in animals from Spain. **Plos One**, v. 9 (3), 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092289>

GREIGE, S.; EL SAFADI, D.; BÉCU, N.; GANTOIS, N.; PEREIRA, B.; CHABÉ M.; BENAMROUZ-VANNESTE, S.; CERTAD, G.; EL HAGE, R.; CHEMALY M.; HAMZE, M.; VISCOGLIOSI, E. Prevalence and subtype distribution of

Blastocystis sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. **Parasites & Vectors**, v. 11 (1), 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2975-5>

GREIGE, S.; EL SAFADI, D.; KHALED, S.; GANTOIS, N.; BAYDOUN, M.; CHEMALY, M.; BENAMROUZ-VANNESTE, S.; CHABÉ, M.; OSMAN, M.; CERTAD, G.; HAMZE M.; VISCOGLIOSI, E. First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission. **Acta Tropica**, v. 194, p. 23-29, 2019. DOI: <https://doi.org/doi:10.1016/j.actatropica.2019.02.013>.

GUO, Y.; ALDERISIO, K. A.; YANG, W.; CAMA, V.; FENG, Y.; XIAO, L. Host specificity and source of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in a drinking source watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 218-225, 2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.02997-13>

HASTUTIEK, P.; YUNIARTI, W. M.; DJAERI, M.; LASTUTI, N. D. R.; SUPRIHATI, E.; SUWANTI, L. T. Prevalence and diversity of gastrointestinal protozoa in Madura cattle at Bangkalan Regency, East Java, Indonesia. **Veterinary World**, v. 12, p. 198-204, 2019. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.198-204>

HELENBROOK, W. D.; SHIELDS, W. M.; WHIPPS, C. M. Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*, living in close proximity to one another. **Parasitology Research**, v. 114, p. 2517-2525, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4451-x>

JEONG, D. K.; WON, G. Y.; PARK, B. K.; HUR, J.; YOU, J. Y.; KANG, S. J.; OH, I. G.; LEE, Y. S.; STEIN, B. D.; LEE, J. H. Occurrence and genotypic characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs with diarrhea. **Parasitology Research**, v. 102, p. 123-128, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0740-3>

JIMÉNEZ, P. A.; JAIMES, J. E.; RAMÍREZ, J. D. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. **Parasites Vectors**, v.12, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3641-2>

JONES, M.; WHIPPS, C.; GANAC, R.; HUDSON, N.; BOROOM, K. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. **Parasitology Research**, v. 109, p. 341-345, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1198-7>

KARIM, M. R.; DONG, H.; YU, F.; JIAN, F.; ZHANG, L.; WANG, R.; ZHANG, S.; RUME, I.; NING, C.; XIAO, L. Genetic diversity in *Enterocytozoon bieneusi* isolates from dogs and cats in China: Host specificity and public health implications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 3297-3302, 2014. <https://doi.org/10.1128/JCM.01352-14>

KEELING, P. J.; FAST, N. M. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. **ANN Reviews in Microbiology**, v.56, p. 93-116, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>

KOLOREN, Z.; GULABI, B. B.; KARANIS, P. Molecular identification of *Blastocystis* sp. subtypes in water samples collected from Black sea, Turkey. **Acta Tropica**, v. 180, p. 58-68, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.029>

KUMARASAMY, V.; ANBAZHAGAN, D.; SUBRAMANIJAN, V.; VELLASAMY, S. *Blastocystis* sp., Parasite Associated with Gastrointestinal Disorders: An Overview of its Pathogenesis, Immune Modulation and Therapeutic Strategies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 3172-3175, 2018. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180807101536>

LAATAMNA, A. E.; WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D.; XIAO, L.; ROST, M.; MCEVOY, J.; SAADI, A. R.; AISSI, M.; KVÁČ, M. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. **Veterinary Parasitology**, v. 208(3-4), p.135-42, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.007>

LALLO, M. A., CALÁBRIA, P.; BONDAN, E. F.; MILNELO, L. Identification of *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (microsporidia) spores in stool and urine samples obtained from free-living South American Coatis (*Nasua nasua*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78 (12), p. 4490-4492, 2012a. <https://doi.org/10.1128/AEM.07708-11>

LALLO, M. A., CALÁBRIA, P.; MILANELO, L. *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (Microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds: microsporidia spores in birds. **Veterinary Parasitology**, v. 190 (3-4), p. 418-422, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.030>

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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02110-07>

LEE, H.; LEE, S. H.; SEO, M. G.; KIM, H. Y.; KIM, J. W.; LEE, Y. R.; KIM, J. H.; KWON, O. D.; KWAK, D. Occurrence and genetic diversity of *Blastocystis* in Korean cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 258, p. 70-73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.010>

LEELAYOOVA, S.; SUBRUNGRUANG, I.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; WORAPONG, J.; PETMITIR, P. C.; MUNGTHIN, M. Identification of genotype of *Enterocytozoon bieneusi* from stool samples from human immunodeficiency virus-infected patients in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3001-3004, 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.00945-06>

LEELAYOOVA, S.; SIRIPATTANAPIPONG, S.; THATHAISONG, U.; NAAGLOR, T. TAAMASRI, P.; PIYARAJ, P.; MUNGTHIN, M. Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 401-406, 2008. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.401>

LEELAYOOVA, S.; PIYARAJ, P.; SUBRUNGRUANG, I.; PAGORNRAT, W.; NAAGLOR, T.; PHUMKLAN, S.; TAAMASRI, P.; SUWANASRI, J.; MUNGTHIN

M. Genotypic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in specimens from pigs and humans in a pig farm community in Central Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 1572-1574, 2009. <https://doi.org/10.1128/JCM.00187-09>

LI, W.; TAO, W.; JIANG, Y.; DIAO, R.; YANG, J.; XIAO, L. Genotypic distribution and phylogenetic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in diarrheic chickens and pigs in multiple cities, China: potential zoonotic transmission. **PLoS One**, v. 9 (9), 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108279>

LI, W.; TAO, W.; JIANG, Y.; DIAO, R.; YANG, J.; XIAO, L. Occurrence, molecular characterization and predominant genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle in Henan and Ningxia, China. **Parasitology Vectors**, v. 9, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1425-5>

LI, W.; FENG, Y.; SANTÍN, M. Host Specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and Public Health implications. **Trends of Parasitology**, v. 35 (6), p.436-451, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.004>

MA ,J.; LI, P.; ZHAO, X.; XU, H.; WU, W.; WANG, Y.; GUO, Y.; WANG, L.; FENG, Y.; XIAO, L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. **Veterinary Parasitology**, v. 207(3-4), p. 220-7, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.011>

MALHEIROS, A.F.; STENSVOLD, C. R.; CLARK, C.; BRAGA, G. B.; SHAW, J. J. Short report: Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon Region, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 1050–1053,2011. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0481>

MALONEY, J. G.; LOMBARD, J. E.; URIE, N. J.; SHIVLEY, C. B.; SANTIN, M. Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy

heifer calves. **Parasitology Research**, v. 18(2), p. 575-582, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6149-3>

MALONEY, J. G.; MOLOKIN, A.; SANTIN, M. Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 73, p. 119-125, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.013>

MASUDA, A.; SUMIYOSHI, T.; OHTAKI, T.; MATSUMOTO, J. Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from dairy cattle in Kanagawa, Japan. **Parasitology International**, v. 67 (96), p. 702-705, 2018. doi: [10.1016/j.parint.2018.07.005](https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.07.005). <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.07.005>

MATOS, O.; LOBO, M. L.; XIAO, L. Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/981424>

MELO, G. B.; PAULA, F. M.; MALTA, F. M.; MARUTA, C. W.; CRIADO, P.; CASTILHO, V. L. P.; GONÇALVES, E. M. N.; ESPIRITO SANTO, M. C.; GRYSCEK, R. C. B. Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil. **Parasitology Open**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1017/pao.2017.3>.

MORENO, Y.; MORENO-MESONERO, L.; AMORÓS, I.; PÉREZ, R.; MORILLO, J. A.; ALONSO, J. L. Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *International Journal of Hygiene Environmental Health*, v. 221 (1), p. 102-111, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.008>

MOURA, R. G. F.; OLIVEIRA-SILVA, M. B.; PEDROSA, A. L.; NASCENTES G. A. N.; CABRINE-SANTOS, M. Occurrence of *Blastocystis* spp. in domestic animals in Triângulo Mineiro area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51(2), p. 240-243, 2018. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0484-2016>

MUNGTHIN, M.; SUBRUNGRUANG, I.; NAAGLOR, T.; AIMPUN, P.; AREEKUL, W.; LEELAYOOVA, S. Spore shedding pattern of *Enterocytozoon bieneusi* in asymptomatic children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 473-476, 2005. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45832-0>

NAVARRO, C.; DOMINGUEZ-MARQUEZ, M.V.; GARIJO-TOLEDO, M. M.; VEGA-GARCIA, S.; FERNANDEZ BARREDO, S.; PEREZ-GARCIA, M. T.; GARCIA, A.; BORRAS, R.; GOMEZ-MUNOZ M. High prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs reared under intensive growing systems: frequency of ribotypes and associated risk factors. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.347–358, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.003>

NOEL, C.; DUFRERNEZ, F.; GERBOD, D.; EDGCOMB, V. P.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P.; SINGH, M.; WINTJENS, R.; SOGIN, M. L.; 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 Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 355, v. 43, p.43:348–355, 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.348-355.2005>

OSMAN, M.; EL SAFADI, D.; CIAN, A.; BENAMROUZ, S.; NOURRISSON, C.; POIRIER, P. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. **Neglected Tropical Diseases**, v. 10 (3), 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004496>

PARIJA, S. C.; JEREMIAH, S. S. Blastocystis: taxonomy, biology and virulence. **Tropical Parasitology**, v. 3(1), p. 17–25, 2013. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113894>

PARKAR, U.; TRAUB, R. J.; KUMAR, S.; MUNGTHIN, M.; VITALI, S.; LEELAYOOVA, S.; MORRIS, K.; THOMPSON, R. C. A. Direct characterization of

Blastocystis from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. **Parasitology**, v. 134, p. 359–367, 2007. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001582>

PINTONG, A. R.; SUNYANUSIN, S.; PRASERTBUN, R.; MAHITTIKORN, A.; MORI, H.; CHANGBUNJONG, T.; KOMALAMISRA, C.; SUKTHANA, Y.; POPRUK, S. *Blastocystis* subtype 5: Predominant subtype on pig farms. **Parasitology International**, v. 67, p. 824–828, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.08.009>

PRADO, J. B. F.; RAMOS, C. A. D. N.; FIUZA, V. R. D. S.; TERRA, V. J. B. Occurrence of zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* in cats in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 28 (1), p. 80-90. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180096>

PRASERTBUN, R.; MORI, H.; PINTONG, A. R.; SANYANUSIN, S.; POPRUK, S.; KOMALAMISRA, C.; CHANGBUNJONG, T.; BUDDHIRONGAWATR, R.; SUKTHANA, Y.; MAHITTIKORN, A. Zoonotic potential of *Enterocytozoon* genotypes in humans and pigs in Thailand. **Veterinary Parasitology**, v. 233, p. 73-79, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.002>

QI, M.; WANG, R.; WANG, H.; JIAN, F.; LI, J.; ZHAO, J.; DONG, H.; ZHU, H.; NING, C.; ZHANG, L. *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in grazing horses in China and their zoonotic transmission potential. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, p. 591-597, 2016. <https://doi.org/10.1111/jeu.12308>

RAMIREZ, J. D.; SANCHEZ, A.; HERNANDEZ, C.; FLOREZ, C.; BERNAL, M. C.; GIRALDO, J. C.; REYES, P.; LOPEZ, M. C.,; GARCIA, L.; COOPER, P. J.; VICUNA ,Y.; MONGI, F.; CASERO, R. D. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 32-35, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.017>

RAMIREZ, J. D.; SANCHEZ, L. V.; BAUTISTA, D. C.; CORREDOR, A. F.; FLOREZ, A. C.; STENSVOLD, C. R. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals

from Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 223-228, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.020>

RANGEL-MARTÍNEZ, C.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, D. E.; MARTÍNEZ-OCAÑA, J.; ROMERO-VALDOVINOS, M.; CASTILLO-ROJAS, G.; ESPINOSA-GARCÍA, A. C. Identification of opportunistic parasites and helminth ova in concentrated water samples using a hollow-fibre ultrafiltration system. **Urban Water Journal**, v. 12, p. 440-444, 2015. <https://doi.org/10.1080/1573062X.2014.916315>

REETZ, J.; RINDER, H.; THOMSCHE, A.; MANKE, H.; SCHWEBS, M.; BRUDEREK, A. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 785-787, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00045-0)

REETZ, J.; NOCKLER, K.; RECKINGER, S.; VARGAS, M. M.; WEISKE, W.; BROGLIA, A. Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. **Paratology International**, v. 58, p. 285-292, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.03.002>

RIJPSTRA, A. C.; CANNING, E. U.; VAN KETEL, R. J.; EEFTINCK SCHATTENKERK, J. K.; LAARMAN, J. J. Use of light microscopy to diagnose small-intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. **Journal of Infectious Diseases**, v. 157, p.827-831, 1988. <https://doi.org/10.1093/infdis/157.4.827>

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 microspopy and PCR for detection of Microsporidia in stool specimens, **Journal of clinical microbiology**, v. 36,p. 1814-1818, 1998.

RINDER, H.; THOMSCHE, A.; DENGIEL, B.; GOTHE, R.; LOSCHER, T.; ZAHLER, M. Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and

pigs and first detection in cattle. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 185-188, 2000. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0185:CGRBEB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0185:CGRBEB]2.0.CO;2)

RIVERA, W. L. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. **Veterinary Parasitology**, v. 156 (3-4), p. 178-182, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.001>

ROBERTS, T.; STARK, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. **Veterinary Parasitology**, v.196 (1-2),p. 85– 89, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.011>

SAK, B.; KVEC, M. HANZLIKOVÁ, D.; CMA, V. First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v.153, p. 220-224, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.043>

SAK, B.; KUCEROVÁ, Z.; KVEC, M.; KVCNOVÁ, D.; ROST, M. SECO, E. W. Soropositivity for *Enterocytozoon bieneusi*, Czech Republic. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p. 335-337, 2010. <https://doi.org/10.3201/eid1602.090964>

SANTIN, M.; VCINO, J. A.; FAYER, R. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bieneusi* in horses. **Journal of Parasitology**, v. 96 (1), p. 157-1661, 2010. <https://doi.org/10.1645/GE-2184.1>

SANTIN, M. DARGATZ, D.; FAYER, R. Prevalence and genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in weaned beef calves on cow-calf operations in the USA. **Parasitology Research**, v.110, p. 2033-2041, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2732-6>

SANTIN, M.; FAYER, R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 363-371, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.014>

SANTIN, M.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; SOLANO-AGUILAR, G.; FAYER, R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. **Parasitology Research**, v.109, p.205-212, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2244-9>

SANTIN, M. *Enterocytozoon bieneusi*. In: XIAO, L.; RYAN, U.; FAYER, Y. (Eds.). **Biology of Foodborne Parasites**. Boca Raton (FL): CRC Press, p.149–174, 2015.

SARFATI, C.; BOURGEOIS, A.; MENOTTI, J.; LIEGEOIS, F.; MOYOU-SOMO, R.; DELAPORTE, E.; DEROUIN, F.; NGOLE, E. M.; MOLINA, J. M. Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 162-164, 2006. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.162>

SCANLAN, P. D. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. **Trends in Parasitology**, v.28, n.8, p. 327-334, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.001>

SKOTARCZAK, B. Genetic diversity and pathogenicity of *Blastocystis*. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 25 (3), p. 411–416, 2018. <https://doi.org/10.26444/aaem/81315>

SEGUÍ, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; KLISIOWICZ, D. R.; OISHI, C. Y.; KOSTER, P. C.; LUCIO, A.; HERNÁNDEZ-DE-MINGO, M.; PUENTE, P.; TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G.; CARMENA, D. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. **Parasites & Vectors**, v. 11 (1), p. 490, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3054-7>

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.

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.

SONG, J.; YIN, Y.; YUAN, Y.; TANG, H.; REN, G.; ZHANG, H.; LI, Z. First genotyping of *Blastocystis* sp. in dairy, meat, and cashmere goats in northwestern China. **Acta Tropica**, v. 176, p.277–282, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.028>

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. <https://doi.org/10.1645/GE-840R.1>

STENSVOLD, C. R.; SURESH, G. K.; TAN, K. S.; THOMPSON, R. C.; TRAUB R. J.; VISCOGLIOSI, E.; YOSHIKAWA, H.; CLARK, C. G. Terminology for *Blastocystis* subtypes-a consensus. **Trends in Parasitology**, v. 23 (3), p. 93-6, 2007a. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.004>

STENSVOLD, C. R.; ARENDRUP, M. C.; JESPERSGAARD, 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, 2007b. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003>

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. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002672>

STENSVOLD, C. R.; CLARK, C. G. Current status of *Blastocystis*: A personal view. **Parasitology International**, v. 65 (6), p. 763-771, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>

STENZEL, D. J.; BOREHAM, P. F. L. *Blastocystis hominis* revisited. **Clinical Microbiology**, v. 9, p. 563-584, 1996. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.4.563>

TAN, K. S. W.; SINGH, M.; YAP, E. H. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: Hot spots in terra incognita. **International Journal of Parasitology**, v. 32(7),p. 789–804, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00005-X)

TAN, K. S. W. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p.121-144, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.017>

TAN, T. C.; SURESH, K. G. Amoeboid form of *Blastocystis hominis* – a detailed ultrastructural insight. **Parasitology Research**,v. 99, p. 737–742, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0214-z>

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. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08>

TAN, T. C.; SURESH, K. G.; SMITH, H. V. Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. **Parasitology Research**, v. 104, p. 85-93, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1163-5>

THATHAISONG, U.; WORAPONG, J.; MUNGTHIN, M.; TAN-ARIYA, P.; VIPUTTIGUL, K.; SUDATIS, A.; NOONAI, A.; LEELAYOOVA, S. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical*

Microbiology, v. 41 (3), p. 967-975, 2003. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.967-975.2003>

THATHAISONG, U.; SIRIPATTANAPIPONG, S.; LEELAYOOVA, S.; MUNGTHIN, M. Prevalence and Molecular Characterization of *Enterocytozoon bieneusi* among Pigs in Chonburi Province, Eastern Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2019. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0569>

UDONSOM, R.; PRASERTBUN, R.; MAHITTIKORN, A.; MORI, H.; CHANGBUNJONG, T.; KOMALAMISRA, C. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 65, p. 107-111, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.007>

VALENÇA-BARBOSA, C.; DE JESUS BATISTA, R.; PEREIRA IGREJA, R.; D'AVILA LEVY, C. M.; WERNECK DE MACEDO, H.; CARNEIRO SANTOS, H. L. Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 10 (1), 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2458-0>

VALENÇA-BARBOSA, C.; DE JESUS BATISTA, R.; PEREIRA IGREJA, R.; D'AVILA, LEVY, C. M.; WENERCK DE MACEDO, H.; CARNEIRO SANTOS, H. L. Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 10 (1), 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2458-0>

VALENÇA-BARBOSA, C.; DO BOMFIM T. C. B.; TEIXEIRA, B. R.; GENTILE, R.; NETO, S. F. D. C.; MAGALHÃES, B. S. N.; BALTHAZAR, D. A.; DA SILVA, F. A.; BIOT, R.; D'AVILA, LEVY, C. M.; SANTOS, H. L. C. Molecular epidemiology of *Blastocystis* isolated from animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Plos One**, v. 14 (1), 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210740>

WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; MCEVOY, J.; ROST, M.; SHERWOOD, D.; HOLCOMB, K.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium parvum* and *Enterocytozoon bieneusi* in American Mustangs and Chincoteague ponies. **Experimental Parasitology**, v. 162, p. 24-27, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.12.004>

WAN, Q.; XIAO, L.; ZHANG, X.; LI, Y.; LU, Y.; SONG, M.; LI, W. Clonal evolution of *Enterocytozoon bieneusi* populations in swine and genetic differentiation in subpopulations between isolates from swine and humans. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10 (8), 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004966>

WANG, J.; GONG, B.; YANG, F.; ZHANG, W.; ZHENG, Y.; LIU, A. Subtype distribution and genetic characterizations of *Blastocystis* in pigs, cattle, sheep and goats in northeastern China's Heilongjiang Province. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, p. 171-176, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.026>

WANG, W.; OWEN, H.; TRAUB, R. J.; CUTTELL, L.; INPANKAEW, T.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. **Veterinary Parasitology**, v.203, p.264-269, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.006>

WASSON, K.; PEPPER, R. L. Mammalian microsporidiosis. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 113-128, 2000. <https://doi.org/10.1354/vp.37-2-113>

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. <https://doi.org/10.1177/2049936113504754>

WEBER, R.; BRYAN, R. T.; SCHWARTZ, D. A.; OWEN, R. L. Human microsporidial infections. **Clinical Microbiology Review**, v. 7, p. 426-461, 1994. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.426>

YAKOOB, 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1761-x>

YAMASHIRO, S.; FIUZA, R. D. S.; TEIXEIRA, A. T. L. S.; BRANCO, N.; LEVY, C. E.; CASTRO, I. C. V. S.; FRANCO, R. M. B. *Enterocytozoon bieneusi* detected by molecular methods in raw sewage and treated effluent from a combined system in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 403-410, 2017. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160435>

YE, J.; XIAO, L.; MA, J.; GUO, M.; LIU, L.; FENG, Y. Anthroponotic enteric parasites in monkeys in public park, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 1640-1643, 2012. <https://doi.org/10.3201/eid1810.120653>

YOSHIKAWA, H.; TOKORO, M.; NEGAMOTO, T.; ARAYAMA, S.; ASIH, P. B. S.; ROZI, I. E.; SYAFRUDDI, D. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygien. **Parasitology International**, v. 65 (6), p. 780-784, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.03.010>

YOSHIKAWA, H.; ABE, N.; WU, Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. **Microbiology**, v. 150(5), p. 1147–1151, 2014. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26899-0>

YOSHIKAWA, H.; WU, Z.; KIMATA, I.; ISEKI, M.; ALI, I. K.; HOSSAIN, M. B.; ZAMAN, Z.; HAQUE, R.; TAKAHASHI, Y. Polimerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* population isolated from different countries. **Parasitology Research**, v. 92, p.22-29, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0995-2>

ZHANG, Q.; CAI, J.; LI, P.; WANG, L.; GUO, Y.; LI, C.; LEI, M.; FENG, Y.; XIAO, L. *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in Tibetan sheep and yaks. **Parasitology Research**, v. 117, p. 721-727, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5742-1>

ZHAO, A.; LI, D.; WEI, Z.; ZHANG, Y.; PENG, Y.; ZHU, Y.; QI, M.; ZHANG, L. Molecular Detection and Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in Racehorses in China. **Frontiers in Microbiology**, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01920>

ZHAO, G. H.; HU, X. F.; LIU, T. L.; HU, R. S.; YU, Z. Q.; YANG, W. B. . Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qinling Mountains. *Parasitology Research*, v. 116(8),p. 2327–2333, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5506-y>

ZHU, W.; TAO, W.; GONG, B.; YANG, H.; LI, Y.; SONG, M.; LU, Y.; LI, W. First report of *Blastocystis* infections in cattle in China. **Veterinary Parasitology**, v. 246,p. 38-42, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.001>

ZOU, Y.; HOU, J. L.; LI, F. C.; ZOU, F. C.; LIN, R. Q.; MA, J. G.; ZHANG, X. X.; ZHU, X. Q. Prevalence and genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs in southern China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, p. 52-56, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.006>

Anexo A: Análise final da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) para o protocolo 101/17.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 - CEP 38405-315
Campus Umuarama - Uberlândia/MG - Ramal (VolP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 001/18 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 101/17

Projeto Pesquisa: "Prevalência e caracterização molecular de *Blastocystis* e *Enterocytozoon bieneusi* em amostras fecais de animais em propriedades rurais na microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil".

Pesquisador Responsável: Márcia Cristina Cury

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 10 de janeiro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU
Portaria nº 665/17

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos responsáveis pelas propriedades rurais, antes do início do trabalho.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada **“Caracterização molecular de *Blastocystis* sp e *Enterocytozoon bieneusi* em animais de produção de propriedades rurais da microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil”**, sob a responsabilidade dos pesquisadores, Márcia Cristina Cury e Camila Oliveira Silva Barbosa.

Nesta pesquisa nós buscamos entender o número de infecções por *Blastocystis* sp e *Enterocytozoon bieneusi*, parasitos intestinais de humanos e de outros animais, que causam diversas manifestações clínicas, como dor abdominal, náuseas, diarreia, síndrome do intestino irritável (IBS) e lesões cutâneas alérgicas. Serão coletadas amostras de galinhas, porcos, cavalos e bovinos.

Por se tratar de parasito intestinal, para este estudo precisaremos coletar fezes. Você participará da pesquisa fornecendo fezes dos animais de sua propriedade, que serão solicitadas pelos pesquisadores. As fezes serão coletadas em potes coletores (porcos e galinhas) e sacos plásticos (bovinos), previamente cedidos. Estes potes e sacos plásticos contendo as fezes serão encaminhados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão investigados os parasitos, através do exame de fezes.

Em nenhum momento o nome da propriedade será identificado. Os resultados dos exames de fezes dos animais serão fornecidos diretamente, por contato telefônico. Você será avisado do exame dos animais de sua propriedade e se houverem animais positivos, você será orientado a procurar um médico veterinário para seguir com o tratamento adequado dos mesmos. Você não terá nenhum ônus ou ganho financeiro por participar desta pesquisa.

Os benefícios serão: *Blastocystis* sp. e *Enterocytozoon bieneusi* são parasitos intestinais de humanos e de outros animais, representando ameaça à saúde pública. Na microrregião de Uberlândia nenhum trabalho que envolva epidemiologia desses parasitos foi realizado, não se conhecendo a real situação deles na região. O(A) senhor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor(a). Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: (Márcia

Cristina Cury (34-3225-8669) e Camila Oliveira (34-3225-8669), Av, Amazonas, s/n, Bloco 4C, sala 4C241, Campus Umuarama, Universidade Federal de Uberlândia. Poderá também entrar em contato com o CEUA - Comitê de Ética em Utilização de Animais na Universidade Federal de Uberlândia

Dessa forma, você, autorizando a coleta do material dos animais, estará colaborando para um melhor entendimento destes parasitos, e possibilitando futuras medidas de controle e tratamento mais eficaz.

Uberlândia, dede 201.....

Márcia Cristina Cury

Camila Oliveira Silva Barbosa

Eu aceito participar da pesquisa citada acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da Pesquisa