



e-ISSN 2446-8118

Maiara Helen Mitsue Inaba¹

Claudia Santos Oliveira²

Natasha Megumi Seo³

Wei Chih Chiu⁴

Maria das Graças Marciano Hirata Takizawa⁵

16

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

2. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

3. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

4. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

5. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

IDENTIFICAÇÃO DE *Blastocystis hominis* EM AMOSTRAS COLETADAS EM BAIROS DA REGIÃO OESTE DE CASCAVEL-PR

IDENTIFICATION OF *Blastocystis hominis* ON SAMPLES COLLECTED IN NEIGHBORHOODS IN THE WESTERN REGION OF CASCAVEL-PR

IDENTIFICATION DE *Blastocystis hominis* EN MUESTRAS RECOGIDAS EN BARRIOS DE LA REGION OESTE DE CASCAVEL-PR

ABSTRACT

Blastocystis hominis (*B. hominis*) is an intestinal protozoan parasite that has been investigated as a possible causative agent of symptoms, particularly abdominal pain and diarrhea in addition to the association with Irritable Bowel Syndrome. To demonstrate the occurrence of *B. hominis*, 134 fecal samples were collected in the period from April to October 2013, in the neighborhoods Santa Cruz and Santo Onofre, the city of Cascavel - PR. Each sample was subjected to two parasitological identification methods. In other words, was divided into two parts: the first part was subject to spontaneous sedimentation method (Lutz / HPJ) and the second was analyzed using the centrifugal sedimentation method in formol-ether (Ritchie). The analyzes were performed at the Parasitology Laboratory of the State

University of Western Paraná. Were found a good range of parasites, from protozoan to helminths. Among these, the presence of *Blastocystis hominis* was especially evident, representing $n = 24$ (8.22%) of the sum of the average of the two methods ($n = 292$) Table 1. The agreement between the two methods was not unanimous: With Lutz / HPJ method was detected in 14 (9.46%), while the technique Ritchie: 10 (6.94%). The negative samples percentage reached $n = 103$ (69.59%) in Ritchie and $n = 101$ (68.23%) in Lutz / HPJ. This value can be associated with improvements in socio-economic and health conditions of the population under study. The occurrence supports the demonstrated in other studies, even though allowed the use of other techniques such as Gram staining and May-Grünwald-Giemsa.

DESCRIPTORS: *Blastocystis hominis*; prevalence; parasitology; methods.

RESUMEN

Blastocystis hominis (*B. hominis*) es un protozoo parásito intestinal que ha sido investigado como un posible agente causal de los síntomas, en particular el dolor abdominal y diarrea, además de la asociación con el síndrome de intestino irritable. Para demostrar la ocurrencia de *B. hominis*, 134 muestras de heces se recogieron de abril a octubre de 2013, en los barrios de Santa Cruz y Santo Onofre, de la ciudad de Cascavel - PR. Cada muestra fue sometida a dos métodos de identificación parasitológicos, a saber, dividido en dos partes: la primera parte se sometió al método de sedimentación espontánea (Lutz / HPJ) y el segundo fue analizada usando el método de sedimentación centrífuga en formalina éter (Ritchie). Las análisis se realizaron en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Estatal del Oeste del Paraná. Una variedad de especies parásitas se encontró a partir de los helmintos protozoos. Entre estos, la presencia de *Blastocystis hominis* fue especialmente evidente, representando $n = 24$ (8,22%) de la suma de la media de los dos métodos ($n = 292$) Tabla 1. El acuerdo entre los dos métodos no fue unánime: con lo método Lutz / HPJ se detectó 14 resultados positivos para *B. hominis* (9,46%), mientras que la técnica de Ritchie: 10 (6,94%). El porcentaje de muestras negativas alcanzó $n = 103$ (69,59%) en Ritchie y $n = 101$ (68,23%) en Lutz / HPJ. Este valor puede estar asociado con mejoras en las condiciones socioeconómicas y de salud de la población en estudio. La ocurrencia es compatible con demostrado en otros estudios, aunque permite el uso de otras técnicas tales como tinción de Gram y May-Grünwald-Giemsa.

DESCRIPTORES: *Blastocystis hominis*; prevalencia; parasitología; métodos.

INTRODUÇÃO

Blastocystis hominis (*B. hominis*), agente etiológico da Blastocitose, foi isolado

e identificado por Fedor Aleksandrovich Lesh em 1870⁽¹⁾, e considerado por anos como inofensivo. Foi somente a partir das duas últimas décadas que se tem adquirido significativo entendimento a respeito desse ser vivo, e hoje é investigada sua patogenicidade e impacto na saúde pública. Trata-se de um protozoário anaeróbico, polimórfico que apresenta quatro formas principais: vacuolar, granular, amebóide e cística⁽²⁾. Nas fezes, é encontrada, principalmente, a forma vacuolar, utilizada no diagnóstico. As formas de transmissão consistem na via fecal-oral, ingestão de água e/ou alimentos contaminados⁽²⁻⁶⁾. Condições higiênicas, sanitárias e nível de escolaridade são significantes fatores de risco para *B. hominis* e outras infecções parasitárias⁽⁷⁾.

Tem-se admitido que em situações de alta carga parasitária (mais de cinco células por campo de 400X) e na ausência de outros parasitas, vírus ou bactérias, o *B. hominis* pode causar sintomas⁽⁸⁾, tais quais: gastroenterite, dor abdominal, prurido anal, flatulência, meteorismo, náusea, vômito e diarréia de intensidade variável, sem presença de sangue ou leucócitos nas fezes⁽⁴⁾. Em casos de imunodepressão, o quadro clínico torna-se, ainda, mais intenso. Dor abdominal e diarreia são as principais queixas relacionadas^(8,9).

Além disso, pesquisas apontam associação entre *Blastocystis hominis* e a síndrome do intestino irritável^(10,11), com demonstração do aumento dos níveis de anticorpos IgG para *Blastocystis* em pacientes portadores da referida síndrome, em comparação com o grupo controle assintomático⁽¹¹⁾. Ainda assim, seu *status quo* de parasita não tem sido totalmente reconhecido, sendo frequentemente listado entre o grupo de comensais⁽¹²⁾.

De distribuição global, sua prevalência é pequena em países desenvolvidos, como o Japão (0,5 a 1%) e maior naqueles em desenvolvimento, como Argentina (27,2%)⁽¹²⁾. No Brasil, já foram encontradas taxas de 40% em uma comunidade em MS⁽¹³⁾, e de 6,7% em um estudo de 1.749 amostras no RJ, demonstrando variações mesmo entre regiões⁽¹⁴⁾.

Pelas emergentes associações do *Blastocystis hominis* com sintomatologias, significando impacto sobre abordagens e patogenicidade, além do interesse sobre sua real presença junto às populações, este estudo traz a ocorrência em bairros da região oeste de Cascavel-PR em 2013.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido por meio de um estudo transversal realizado nos bairros Santa Cruz e Santo Onofre, situados no município de Cascavel – Paraná, localizado no terceiro planalto do estado, na região oeste paranaense, com uma altitude média de 781 metros, área de 2.100,831 Km² e população estimada em 312.778 habitantes. Cerca de 98,47% das casas possuem água tratada e 85% da cidade conta com rede de esgoto.

Foram examinadas 134 amostras fecais coletadas no período de abril a outubro de 2013, obtidas através de visitas às casas dos bairros, citados, por acadêmicos acompanhados das agentes comunitárias de saúde (ACS) durante suas visitas de rotina. Forneceram-se o recipiente de coleta universal com conservante, instruções de coleta e esclarecimentos a respeito das parasitoses. Todos os moradores que forneceram material colaboraram, também, respondendo a um questionário a respeito de hábitos e condições de vida bem como sintomas possíveis de serem apresentados. As amostras englobaram indivíduos de ambos os gêneros e diversas faixas etárias.

Os exames coproparasitológicos foram realizados no laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus de Cascavel, utilizando-se duas técnicas: Ritchie (centrífugo-sedimentação em formol-éter) e Lutz/HPJ (sedimentação espontânea). A leitura do material foi feita com microscópio óptico. Os resultados foram computados em planilha do Excel (tabela 1) e os dados obtidos foram analisados, estatisticamente, com base no teste do qui-quadrado ao nível de 5%.

Todos os participantes receberam o laudo do exame parasitológico. Aqueles que

estavam infectados foram encaminhados à consulta médica e tratamento na Unidade Básica de Saúde Santa Cruz, localizada na área de abrangência da pesquisa.

A pesquisa foi realizada em concordância com os padrões éticos e com o devido consentimento livre e esclarecido dos participantes, em cumprimento à Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde do Brasil. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Unioeste, parecer nº171/2007/CEP.

RESULTADOS

Foi encontrada uma grande variedade de espécies parasitárias, desde protozoários a helmintos. Dentre estes a presença de *Blastocystis hominis* foi especialmente evidente. A análise de ocorrências diferenciou os resultados baseados nas espécies encontradas e no método parasitológico utilizado. A concordância entre os dois métodos não foi unânime. Com a técnica de sedimentação espontânea, detectou-se 14 (9,46%) indivíduos com *B. hominis*, enquanto que pela técnica de centrífugo-sedimentação em formol éter: 10 (6,94%). Resultando em uma porcentagem final de 8,22% em 292 resultados positivos, uma vez que houve indivíduos que apresentaram associação de mais de um parasita (não discriminada estatisticamente), culminando no valor total de 148 resultados pelo método Lutz/HPJ e 144 pelo método de Ritchie. A presença de *Cryptosporidium sp.* não foi detectada pela técnica Lutz/HPJ, e por Ritchie encontraram-se cinco casos respondendo por 3,47% do total de 144 diagnósticos feitos por essa técnica. Na porcentagem final, esse coccídeo respondeu por 1,71%. O método de Ritchie, ainda, contribuiu com a detecção de um caso de *Iodamoeba bütschlii*. Além disso, ambos os métodos demonstraram a presença de *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoebahistolytica/dispar* e *Giardia lamblia*, resultados apresentados na tabela 1. O resultado negativo foi o predominante na amostra analisada, assim sendo representado por 69,86%.

Tabela 1- Ocorrência das espécies parasitárias, segundo os métodos de Lutz/HPJ e Ritchie

Espécies	Lutz/HPJ	%	Ritchie	%	Total	%
<i>*Blastocystis hominis</i>	14	9,46	10	6,94	24	8,22
<i>Endolimax nana</i>	13	8,78	10	6,94	23	7,88
<i>Entamoeba coli</i>	8	5,41	8	5,56	16	5,48
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	6	4,05	6	4,17	12	4,11
<i>Giardia lamblia</i>	4	2,70	3	2,08	7	2,40
<i>Cryptosporidium</i> sp	0	0,00	5	3,47	5	1,71
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	0	0,00	1	0,69	1	0,34
Negativo	103	69,59	101	70,14	204	69,86
Total	148	100,00	144	100,00	292	100

Fonte = A identificação das espécies foi realizada pelo laboratório de parasitologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná no período de abril a outubro de 2013.

Valor de p= 0,05.

DISCUSSÃO

Após análise das amostras fecais, constatou-se que o protozoário de maior ocorrência foi o *Blastocystis hominis*. É considerado o mais comum dos protozoários reportados em amostras fecais humanas⁽⁵⁾, desenvolvendo infecções entre 30 a 50% dos portadores em países em desenvolvimento, e uma taxa menor nos países desenvolvidos. A exemplo, um estudo realizado na Itália comparando resultados entre os pacientes de uma região de forte presença de imigrantes constatou uma prevalência de *B. hominis* três vezes maior em imigrantes se comparada com os naturais italianos, incluindo comparação por múltiplas infecções, de significância estatística⁽¹⁵⁾. Conclusão semelhante foi constatada em estudos realizados entre outras populações estrangeiras e de comunidades de refugiados nos EUA e Europa⁽¹⁵⁾. Além disso, considera-se que países industrializados – não somente, mas principalmente, costumam não notificar parasitas intestinais⁽¹⁸⁾, tanto por não ser, ainda, reconhecido como patogênico como, também, pela falta de prática no diagnóstico de *B. hominis*⁽¹⁷⁾.

A técnica de sedimentação espontânea, conhecida como método de Lutz

ou Hoffman Pons&Janer (Lutz/HPJ), baseia-se na sedimentação por ação da gravidade dos ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários⁽¹⁶⁾. A sedimentação por centrifugação, por sua vez, apresentada em 1948 por Ritchie, consiste na deposição através da centrifugação e na lavagem do material com éter, um solvente orgânico que forma uma fase apolar e, que retém os artefatos vegetais e toda gordura contida na amostra durante a centrifugação da suspensão de fezes.

Há discussão a respeito do melhor método investigativo para *B. hominis*, havendo defensores do método direto, método no qual faz-se dois esfregaços em lâmina, um com solução salina e outro com lugol, incluindo para investigação o muco, se presente nas fezes. Apesar da simplicidade, exige-se domínio da técnica. Colorações para preparação permanente de hematoxilina férrica, tricrômio ou pela tionina para comprovação são comumente efetuados com o método direto⁽⁴⁾. Alerta-se que água e diversas soluções podem gerar falso-negativos por lisarem o protozoário⁽¹⁶⁾. Como exemplo, há o estudo realizado pelo Departamento de Parasitologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo com 307 crianças de sete a doze anos, de uma escola da

periferia de São Paulo, em que houve detecção tanto pelo método direto quanto pelo da hematoxilina férrica (30 casos - 9,8%), de concordância plena entre ambas, entretanto com nenhuma visualização de *B. hominis* pelos métodos de Lutz/HPJ e Faust e cols., demonstrando o falso-negativo se utilizado estes métodos^(4,16). Curiosamente noutro estudo realizado, pelo mesmo departamento, com 227 escolares de seis a dez anos, houve achados de *B. hominis* pela técnica de Faust e cols (21,1%), (32,6%) pela Lutz/HPJ e (33%) pelo método direto. A explicação encontrada foi a de que o uso de formol 10% como conservante teria evitado a lise⁽¹²⁾. Isso justificaria nossos achados pelas técnicas de Lutz/HPJ e Ritchie.

Do total de 134 amostras fecais analisadas, 33 (24.62%) foram positivas para protozoários intestinais e/ou helmintos. O protozoário *Blastocystis hominis* representou (42.42%) e *Endolimax nana* (39.39%) dos resultados positivos. Em 2004, pesquisa similar, foi realizada na comunidade de Campo Verde, no município de Pitanga-PR. Na referida pesquisa é possível constatar significativa frequência de *B. hominis* com (26.5%) dos resultados positivos, perdendo posição, apenas, para o protozoário *Endolimax nana* com (33.7%)⁽¹⁷⁾. Nesse estudo, também, foram usados recipientes contendo solução com formol a 10% como conservante.

Em nossa análise, a técnica de Lutz/HPJ foi mais efetiva no isolamento dos protozoários *Endolimax nana*, *Giardia lamblia* e, especialmente, *Blastocystis hominis* do que a técnica de Ritchie (Tabela 1), o que diverge do resultado encontrado no Laboratório de Biomedicina da Universidade Feevale, de Novo Hamburgo/RS⁽¹⁸⁾, com obtenção de 32 amostras positivas para *B. hominis* utilizando-se o método de centrífugo-sedimentação e 20 resultados positivos de acordo com a técnica de sedimentação espontânea.

Dentre os argumentos que podem justificar o resultado desfavorável ao método de Ritchie, no presente estudo, estão a perda de parte do material e de formas parasitárias durante o processamento nas etapas de diluição em formalina 10%, no uso do acetato

de etila como desengordurante, em que a camada sobrenadante é desprezada, sendo essa, composta por restos fecais misturados a detritos de gorduras e, possivelmente, passível de conter exemplares de parasitas.

A porcentagem de amostras negativas alcançou 69.59%. Esse valor pode ser associado à melhoria das condições sócio-econômicas e sanitárias da população em estudo. Entre elas, podem-se citar menor composição familiar, maior nível de escolaridade, residências abastecidas com água encanada e tratada, além da presença de saneamento básico (sistema de esgoto e coleta de lixo).

CONCLUSÕES

Blastocystis hominis possui distribuição mundial variável, principalmente, entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, ou mesmo entre diferentes comunidades. A ocorrência é compatível com a demonstrada em outros estudos, ainda que admitida o emprego de outras técnicas de identificação. A relativa baixa ocorrência não apenas de *B. hominis* como de outros protozoários e helmintos revela melhorias na cobertura de saneamento. Enfatiza-se a necessidade da superação das incertezas patogênicas e controvérsias epidemiológicas a respeito do referido enteroprotazoário por meio de mais estudos clínicos que incluam técnicas de investigação para *B. hominis* e que, este, não seja ignorado das citações de laudos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à nossa instituição de ensino e à nossa orientadora pelo apoio e pela oportunidade de participação nesse projeto de extensão. Incluímos, também, nossos sinceros agradecimentos à população participante pela contribuição, efetiva, em nossa pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Lesh FA. Massive development of amebas in the large intestine. *Am J Trop Med Hyg.* 1975 May;24(3):383-92.
2. Miné JC, Rosa JA. Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the Parasitology Laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University, Araraquara. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008;41(6).
3. Kaya S, Cetin ES, Aridogan BC, Arikan S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkey Parasitology Journal.* 2007; 31(3):184-187.
4. Amato NV, Alarcón RSR, Gakiya E, Bezerra RC, Ferreira CS, Braz LMA. Blastocistose: controvérsias e indefinições. *Soc Bras Med Trop.* 2003;36:515-517.
5. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Viscogliosi PD, Ho LC, Singh M, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: Implications for genetic diversity, Identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:348-355.
6. Tan KSW. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis spp.* *Clinical Microbiology Reviews.* 2008;21(4):639-665.
7. Quihui L, Valencia ME, Crompton DWT, Phillips S, Hagan P, Morales G, Diaz C. Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural schoolchildren. *BMC Publ Health.* 2006; 6:225.
8. Stenzel D, Boreham P. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(4):563-584.
9. Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M, et al. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLOS ONE* 5. 2010.e15484. doi:10.1371/journal.pone.0015484.
10. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivare CP, Delbac F, Alaoui H. New Insights into *Blastocystis spp.*: A Potential Link with Irritable Bowel Syndrome. *PLoS Pathogens* March 2012;8(3).
11. Hussain R, Jafri W, Zuberi S, Baqai R, Abrar N, Ahmed A, Zaman V. Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with Irritable bowel syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56:301-306.
12. Neto VA, Alarcon RSR, Gakiya E, Ferreira CS, Bezerra RC, Santos AG. Elevada porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2004;37(4):354-356.
13. Aguiar JIA, Goncalves FC, Sodre R, Pereira SMN, Boia ERL. Intestinal protozoa and helminthes among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007;40:631-634.
14. Macedo HW, Gonçalves AMH, Almeida CB, Dias LVB, Muniz MF. Infecção por *Blastocystis hominis* e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em pacientes atendidos em um hospital localizado em Niterói, Rio de Janeiro. *Patologia Tropical.* 2010;39(1).
15. Calderaro A, Montecchini S, Rossi S, Gorrini C, Conto F, Medici MC, Chezzi C, Arcangeletti MC. Intestinal parasitoses in a tertiary-care hospital located in a non-endemic setting during 2006-2010. doi: 10.1186/1471-2334-14-264.
16. Neves DP, Melo AL, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2005.
17. Nascimento SA, Moitinho MLR. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga City, Paraná State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2005;47(4):213-217.

18. Eymael D, Schuh GM, Tavares RG. Padronização do diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas de coloração. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2010; 43(3):309-312.

Recebido em 03.03.2016
Aprovado em: 13.07.2016