

SILVIO LUÍS PEREIRA DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Giardia spp. PROVENIENTES DE AMOSTRAS FECAIS DE
ORIGEM HUMANA E ANIMAL

São Paulo

2007

SILVIO LUÍS PEREIRA DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Giardia spp. PROVENIENTES DE AMOSTRAS FECAIS DE
ORIGEM HUMANA E ANIMAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari

São Paulo

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1832
FMVZ

Souza, Silvio Luís Pereira de
Caracterização genética de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana e animal / Silvio Luís Pereira de Souza. – São Paulo: S. L. P. Souza, 2007.
91 f. : il.

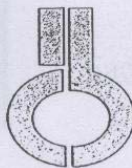
Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. *Giardia* spp. 2. Glutamato desidrogenase. 3. Genótipos.
4. Assemblage. I. Título.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 38130900 - telefax : (55) (11) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

São Paulo, 10 de março de 2003

PARECER 423/CEP

Prezada Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua trigésima quarta reunião, realizada no dia 27 de fevereiro p.p., analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Caracterização genética de isolados de *Giardia spp* provenientes de amostras fecais de origem humana e animal".

Informo que, após análise e discussão, o referido projeto, foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. GERHARD MALNIC
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. RODRIGO MARTINS SOARES
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização genética de isolados de *Giardia* spp provenientes de amostras fecais de origem humana e animal" Protocolo nº 266/2003, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/02/2003.

(We certify that the Research "Genetic characterization of *giardia* spp isolates from stool samples from animal and man" protocol number 266/2003, under the responsibility of Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 02/27/2003 meeting.)

São Paulo, 07 de março de 2003

Profª Drª Júlia Maria Mateka
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUZA, Silvio Luís Pereira de Souza

Título: Caracterização genética de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana e animal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

“in memorian”

*“Estás em tudo que penso
estás em quanto imagino
estás no horizonte imenso
estás no grão pequenino*

*Estás na ovelha que passe
estás no rio que corre
estás em tudo que nasce
estás em tudo que morre*

*Em tudo estás nem repousas
oh! ser tão mesmo e diverso
eras no início das coisas
serás no fim do universo*

*Estás na alma e nos sentidos
estás no espírito estás
na letra e os tempos cumpridos
no céu, no céu estarás...”*

*Ao meu pai Silvío Pereira de Souza
“in memorian”*

e

*ao meu padrinho Wilson Machado
“in memorian”*

*quem não poupou esforços
para tornar possível esta conquista,
a este meu reconhecimento e eterna gratidão.*

À minha esposa, Máisa

*Pelo carinho, paciência, dedicação,
companheirismo e amor demonstrado.
Meu equilíbrio e sensatez nas horas mais difíceis.
Pelo amor que nos une
E principalmente por você existir.*

À minha mãe Maria José e minha Tia Tereza

*Pelo apoio irrestrito,
mesmo nas horas mais difíceis
e nas minhas ausências,
tão comuns ao longo destes últimos anos
Por não terem medido esforços
Em nenhum momento
Sempre me incentivando
e acreditando...
Tornando este sonho realidade*

*Aos meus avós:
Lindolfo e Amélia
Euclides e Maria de Lourdes*

*Mesmo não tendo oportunidade
de estudar
Cultivaram uma grandiosa
sabedoria popular
e sempre me incentivaram
na busca deste ideal.*

*O mais amplo do mundo, o conhecimento, o reconhecimento,
a alegria deixada por um presente, como um suavíssimo cometa,
tudo isto e muito mais cabem na extensão de uma palavra...*

*Quando se diz obrigado, se dizem muitas coisas mais,
Que vêm de muito longe e de muito perto,
De tão longe como a origem do indivíduo humano
De tão perto como o secreto pulsar do coração*

Pablo Neruda..

Agradecimentos Especiais

A Deus

por simplesmente tudo.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora

Prof^a Solange Maria Gennari

*Por ter acreditado e dado à oportunidade
do meu ingresso na Parasitologia. Meu
ponto de partida profissional.*

Ao Prof. Rodrigo Martins Soares

*Por ter mostrado o caminho a seguir
tornando um sonho em realidade.*

Pelos seus ensinamentos, paciência e amizade, minha eterna admiração.

Agradecimentos

Agradeço, de uma maneira geral, a todos os que tenham contribuído para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, que por descuido ou esquecimento não foram aqui mencionados.

Ao professor Leonardo J. Richtzenhain pela amizade, incentivo e colaboração para minha formação científica e na realização desse trabalho (permitindo a utilização do Laboratório de Biologia Molecular e seus equipamentos).

Ao amigo e Prof Marcelo Labruna pela amizade, incentivo e conselhos científicos muito valiosos.

Ao Prof. Paulo Eduardo Brandão pela disponibilidade, sugestões e incentivo no decorrer da realização deste trabalho.

Ao Prof. Fernando Ferreira pelo valioso auxílio durante a impressão da tese.

Ao Prof. Silvio Arruda Vasconcellos pelo apoio e incentivo nesta jornada.

À Prof^a Nobuko Kasai e ao Prof José Antonio Jerez pelo incentivo e conselhos que muito valorizaram a minha formação.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Doenças Parasitárias, Hilda F. J. Penna, Renato Caravieri e Pedro César Ferreira pelo convívio, conhecimentos e experiência a mim concedido.

Aos meus amigos da pós-graduação do VPS, pelo agradável período que passamos juntos e também por compartilharem comigo de minhas aflições e angústias, Alessandra Ragozzo, Renata Monteiro, Guacyara, Mauricio Horta, Adriano Pinter (Pequeno Billy), Alexandre Thomaz, Alexandre Ataliba, Richard Pacheco, Ricardo Cabrera e aos bolsistas Luciana Nunes, Jonas (Mato Grosso) e Simone Rosa.

A pós-graduanda Mikaela Funada pelo apoio e auxílio no decorrer deste experimento.

As amigas Lara Borges e Adriana Cortez pelo apoio técnico e ensinamentos nos ensaios moleculares.

A técnica de Laboratório Sheila Oliveira e Renata pelo apoio e auxílio no seqüenciamento das amostras.

Aos funcionários e amigos Alexandre Sanches, Sandra Abelardo Sanches, Orlando Bispo e Jucélia pelo apoio, amizade e força.

Aos funcionários da Secretária do VPS, Virgínia, Cristina e Danival pelo incentivo, apoio e dedicação.

Ao Laboratório AFIP e ao Hospital Sanatorinhos que gentilmente cederam as amostras de *Giardia* spp. de origem humana.

A pós-graduanda Lucia Eiko que forneceu várias amostras de provenientes de bugios.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da USP pela gentileza, atenção e esclarecimentos bibliográficos.

À Cristina Maziero e família pelo apoio, incentivo e compreensão durante estes longos anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho (processo nº 2003/01587-3).

RESUMO

SOUZA, S. L. P. **Caracterização genética de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana e animal.** [Characterization genetic of *Giardia* spp. isolated from human and animal faecal samples]. 2007. 91 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O protozoário flagelado *Giardia duodenalis* é um parasito intestinal que pode infectar uma ampla variedade de mamíferos, incluindo os humanos e os animais domésticos e selvagens. Devido à carência de informações a respeito da caracterização molecular de amostras de *Giardia* spp. no Brasil, o presente estudo teve como objetivo analisar 113 amostras de fezes positivas para *Giardia* spp. de origem humana e animal. Um segmento do gene que codifica a enzima glutamato desidrogenase (*gdh*) dos isolados provenientes de 37 humanos, 31 cães, 20 gatos, 12 bugios, cinco bezerros, três chinchilas, duas avestruzes, dois cachorros-do-mato e uma onça-pintada foi amplificado e seqüenciado. A análise da seqüência de nucleotídeos do gene *gdh* mostrou que estes isolados foram divididos em seis linhagens genéticas principais (*Assemblages* A, B, C, D, E, F). O genótipo All foi identificado apenas nas amostras de humanos, enquanto o genótipo Al foi detectado nos isolados de origem animal (gato, bezerro, onça-pintada). Os isolados de *Giardia* spp. provenientes dos humanos, bugios, chinchilas e avestruzes foram caracterizados como pertencente ao genótipo BIV. Entretanto, os demais *Assemblages* foram identificados apenas em um grupo específico de hospedeiros. *Assemblage* C e D foram encontrados nas amostras de cães e cachorros-do-mato, *Assemblage* F nas amostras de gatos e *Assemblage* E nas amostras de bezerros. A caracterização molecular das amostras de *Giardia* spp. gera uma importante contribuição para o conhecimento da especificidade de hospedeiro dos diferentes genótipos.

Palavras-chave: *Giardia* spp. Glutamato desidrogenase. Genótipos. *Assemblage*.

ABSTRACTS

SOUZA, S. L. P. **Characterization genetic of *Giardia* spp. isolated from human and animal faecal samples.** [Caracterização genética de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana e animal]. 2007. 91 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The flagellated protozoan *Giardia duodenalis* is an intestinal parasite that can infect a broad variety of mammalian hosts, including humans and domestic and wild animals. Due the lack of information about the molecular characterization of *Giardia* spp. in Brazil, this study aimed to analyse 113 stool samples from human and animals, all positive to *Giardia* spp. A segment of the glutamate dehydrogenase gene (*gdh*) of isolates from 37 humans, 31 dogs, 20 cats, five calves, 12 wild monkeys, three chinchilas, two ostriches, two crab-eating-foxes and one jaguar was amplified and sequenced. Nucleotide sequences analysis of *gdh* gene showed that these isolates could be divided into six main genetic lineage (*Assemblages* A, B, C, D, E, F). The genotype All was identified only in human isolates, whereas genotype AI was detected in a variety of animals (cat, calf, jaguar). In addition, *Giardia* spp. isolates recovered from human, wild monkeys, chinchila and ostriches were characterized as genotype BIV. However the other *Assemblages* identified were confined to restrict host species. *Assemblages* C and D were found in isolates from dogs and crab-eating-foxes, *Assemblage* F from cats and *Assemblage* E from calves. The molecular characterisation of *Giardia* spp. isolates has made a major contribution to our understanding of the host specificity of different genotypes.

Key words: *Giardia* spp. Glutamate dehydrogenase. Genotypes. *Assemblage*.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	soro albumina bovina
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
<i>g</i>	gravidade terrestre
HCl	ácido clorídrico
M	molar
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pb	pares de bases
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p	quantidade suficiente para
RFLP	polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição
SDS	dodecil sulfato de sódio
Seq	seqüenciamento
TE	tampão Tris-EDTA
P/v	peso por volume

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Estratégia adotada para o seqüenciamento dos nucleotídeos do produto da PCR de gene *gdh* de *Giardia* spp. - São Paulo - 2007_ 48
- FIGURA 2 - Relação filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene da glutamato desidrogenase provenientes dos isolados de *Giardia* spp. avaliada através do emprego do modelo de distancia Kimura 2 parâmetros e pelo algoritmo dos agrupamentos vizinhos - São Paulo - 2007_----- 62

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Ocorrência da <i>Giardia duodenalis</i> na população humana e de cães e gatos provenientes de diferentes estados do Brasil – São Paulo - 2007_____	29
QUADRO 2 -	Relação de <i>Assemblages</i> identificados nas amostras de <i>Giardia duodenalis</i> – São Paulo – 2007_____	35
QUADRO 3 -	Estudos de caracterização genética de amostras de <i>Giardia</i> spp. de origem humana e animal – São Paulo – 2007_____	37
QUADRO 4 -	Relação de amostras fecais positivas para a presença de cistos de <i>Giardia</i> spp. de origem humana e animais - São Paulo – 2007___	39
QUADRO 5 -	Relação de <i>primers</i> utilizados para amplificação de seqüências parciais do gene codificador da glutamato desidrogenase de <i>Giardia</i> spp. - São Paulo – 2007_____	43
QUADRO 6 -	Reagentes utilizados para amplificação de seqüências parciais do gene codificador da glutamato desidrogenase de <i>Giardia</i> spp. - São Paulo – 2007_____	46
QUADRO 7 -	Amostras padrões representantes dos principais <i>Assemblages</i> de <i>Giardia</i> spp. utilizadas para a caracterização genética das amostras de <i>Giardia</i> spp. de origem humana e animal - São Paulo – 2007_____	50
QUADRO 8 -	<i>Assemblages</i> e genótipos identificados nas amostras de cistos de <i>Giardia</i> spp. de origem humana e animal - São Paulo - 2007 ___	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Identificação molecular das amostras de <i>Giardia</i> spp. provenientes de gatos avaliadas pelo seqüenciamento do gene <i>gdh</i> - São Paulo - 2007 _____	55
TABELA 2 - Identificação molecular das amostras de <i>Giardia</i> spp. provenientes de cães avaliadas pelo seqüenciamento do gene <i>gdh</i> - São Paulo - 2007 _____	56
TABELA 3 - Identificação molecular das amostras de <i>Giardia</i> spp. provenientes de animais selvagens avaliadas pelo seqüenciamento do gene <i>gdh</i> - São Paulo - 2007 _ _ _ _ _	57
TABELA 4 - Identificação molecular das amostras de <i>Giardia</i> spp. provenientes de bovinos avaliadas pelo seqüenciamento do gene <i>gdh</i> - São Paulo - 2007 _____	58
TABELA 5 - Identificação molecular das amostras de <i>Giardia</i> spp. provenientes de animais exóticos avaliadas pelo seqüenciamento do gene <i>gdh</i> - São Paulo - 2007 _____	58
TABELA 6 - Identificação molecular das amostras de <i>Giardia</i> spp. provenientes de humanos avaliadas pelo seqüenciamento do gene <i>gdh</i> - São Paulo - 2007 _____	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	AMOSTRAS DE <i>Giardia</i> spp	39
3.1.1	Amostras de Origem Humana	40
3.1.2	Amostras de Origem Animal	41
3.2	PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	42
3.3	EXTRAÇÃO DO DNA	42
3.4	PRIMERS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>gdh</i>	43
3.5	AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS	44
3.5.1	Amostras de Dna de bactérias intestinais	44
3.5.2	Amostras de cães e gatos contendo outros parasitas	44
3.5.3	Acesso aos bancos de dados	45
3.6	AMPLIFICAÇÃO DA SEQUENCIA DO GENE <i>gdh</i>	45
3.6.3	Parâmetros para o Termociclador (PCR)	46
3.7	ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	46
3.8	PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	47
3.9	QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS	47
3.10	SEQUENCIAMENTO	47
3.10.1	Estratégia de Sequenciamento	47
3.10.2	Reação de Sequenciamento	49
3.11	AVALIAÇÃO E EDIÇÃO DAS SEQÜENCIAS DO GENE <i>gdh</i>	49
3.12	ALINHAMENTO E TRADUÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS	50
3.13	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	50
3.14	ANÁLISE FILOGENÉTICA	51
4	RESULTADOS	52
4.1	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>gdh</i>	52
4.2	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	55
4.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA	60
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICE	88

“Quando as portas da percepção
se abrirem então o mundo
será como ele é.....
.....Infinito”

William Blake

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O holandês Antony Van Leeuwenhoek, ao examinar suas próprias fezes diarréicas mediante a utilização de um simples aparelho manual de aumento, por ele mesmo construído, observou o primeiro protozoário intestinal descoberto no homem, mas foi Wilhelm Duszan Lambl em 1859 quem descreveu o organismo, fornecendo as primeiras figuras do protozoário encontrado nas fezes diarréicas de crianças, nomeando-as *Cercomonas intestinalis*. O gênero *Giardia* foi descrito por Kunstler (1882 apud THOMPSON; REYNOLDSON; LYMBERY, 1994, p. 7) ao observar o flagelado no intestino de girinos de rã e denominá-lo *Giardia agilis* em homenagem ao biólogo francês Alfred Giard.

Os organismos do gênero *Giardia* são protozoários flagelados pertencentes ao Filo: Sarcocystophora, Classe: Zoomastigophora e a Ordem Diplomonadida, sendo considerado o principal grupo de parasito da Família Hexamitidae, presente no trato intestinal de todas as classes de vertebrados (THOMPSON; REYNOLDSON; LYMBERY, 1994; THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000).

As denominações *G. duodenalis*, *G. intestinalis* e *G. lamblia* têm sido empregadas como sinonímia, sendo encontrada nos humanos e na grande maioria dos animais, incluindo cães, gatos, bovinos, suínos, ovinos e eqüinos (THOMPSON, 2000).

No decorrer dos anos, mais de 40 espécies foram descritas como pertencentes ao gênero *Giardia*, sendo a maioria destas espécies nomeadas de acordo com o hospedeiro no qual eram encontradas (*G. canis*, *G. bovis*). A grande maioria dos pesquisadores não aceitaram este conceito rígido baseado exclusivamente na especificidade de hospedeiro e elegeram o estudo morfológico realizado por Filice (1952 apud THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993, p. 78) apropriado para a determinação das espécies pertencentes ao gênero *Giardia*. Este sistema divide o gênero *Giardia* em três grupos morfológicos distintos, diferenciados

primariamente de acordo com o formato das estruturas microtubulares centrais, denominadas corpos medianos.

1. *Giardia agilis*: parasita de anfíbios. O trofozoíto é longo e estreito, com o corpo mediano em forma de bastão, medindo 20 a 30 μm de comprimento por 4 a 5 μm de largura.

2. *Giardia muris*: parasita de roedores, possivelmente alguns pássaros e mamíferos. O trofozoíto é arredondado com corpo mediano pequeno e redondo, mede de 9 a 12 μm de comprimento por 5 a 7 μm de largura.

3. *Giardia duodenalis*: parasita uma ampla variedade de mamíferos domésticos e selvagens, inclusive o homem, e possivelmente alguns pássaros e répteis. O trofozoíto apresenta forma de pêra com o corpo mediano em forma de garra, medindo 12 a 15 μm de comprimento por 6 a 8 μm de largura. Este grupo morfológico reuniu mais de 20 espécies formalmente descritas anteriormente, a grande maioria isolada de mamíferos, e no decorrer destes últimos anos vem merecendo grande atenção, sendo alvo de numerosos estudos.

Além das três espécies reconhecidas através dos critérios morfológicos distinguíveis por microscopia óptica por Filice (1952); diferenças estruturais detectadas pelo emprego da microscopia eletrônica permitiram a descrição de outras espécies adicionais.

4. *Giardia psittaci* foi descrita por Erlandsem e Bemrick (1987) como parasita de pássaros, especialmente periquitos (*Melopsittacus undulatus*), e apresenta o trofozoíto em forma de pêra com a flange ventro-lateral ausente, corpo mediano em forma de garra, medindo aproximadamente 14 μm de comprimento por 6 μm de largura.

5. *Giardia ardeae*: parasita de pássaros, especialmente garça azul (*Ardea herodias*), apresenta o trofozoíto de forma arredondado, com entalhe proeminente no disco ventral e um único flagelo caudal rudimentar, corpo mediano de forma oval a redonda, em forma de garra, medindo aproximadamente 10 µm de comprimento por 6,5 de largura (ERLANDSEM et al., 1990).

6. *Giardia microti*: espécie proposta para os roedores *Microtus ochrogaster* e *Ondatra zibethicus*, no qual os cistos analisados através de microscopia eletrônica apresentaram trofozoítos completamente desenvolvidos no seu interior, e os ensaios moleculares demonstraram diferenças quando comparadas com amostras de *G. duodenalis* provenientes dos humanos (VAN KEULEN et al., 1998).

A *Giardia* ocorre em duas formas básicas:

- Trofozoíto

O trofozoíto é o estágio ativo e móvel encontrado no lúmen do trato intestinal dos hospedeiros, apresenta o corpo com o formato de uma pãra fendida longitudinalmente e a extremidade anterior arredondada. O organismo é formado por dois núcleos ovais na superfície dorsal, um grande disco adesivo ventral, estruturas microtubulares centrais denominadas corpos medianos e quatro pares de flagelos. (THOMPSON; REYNOLDSON; LYMBERY, 1994; FARTHING, 1999).

- Cisto

O cisto é o estágio latente e resistente, sendo a forma especializada responsável pela transmissão do agente, uma estrutura ovóide medindo de 8-12 micrômetros de comprimento e 7-10 micrômetros de largura. Embora o cisto seja sensível à dessecação e ao calor, estes podem sobreviver por vários meses nas condições ambientais. (THOMPSON; REYNOLDSON; LYMBERY, 1994; FARTHING, 1999).

A *Giardia* apresenta um ciclo simples direto, os trofozoítos são encontrados aderidos à superfície do epitélio nas microvilosidades do duodeno e jejuno dos hospedeiros vertebrados. Ocorre uma rápida multiplicação por fissão binária, resultando no estabelecimento do protozoário na mucosa do epitélio do

intestino delgado. Em condições apropriadas, os trofozoítos iniciam o processo de formação dos cistos que são eliminados nas fezes uma a duas semanas após a infecção e podem permanecer infectantes por pelo menos dois meses sob condições apropriadas de temperatura e umidade (GUIMARÃES; SOGAYAR; FRANCO, 1999; LEIB; ZAJAC, 1999; FARTHING, 1999).

A transmissão ocorre pela via fecal-oral através da ingestão de cistos viáveis presentes na água e alimentos contaminados. A acidez do suco gástrico e a ação das enzimas digestivas estimulam o processo de desencistamento, ocorre a ruptura da parede do cisto e a liberação de uma massa quadrinucleada que rapidamente se diferencia em dois trofozoítos, que por sua vez aderem à superfície do epitélio nas microvilosidades do intestino delgado (THOMPSON; REYNOLDS; LYMBERG, 1994; SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000).

A forma como este agente provoca lesões nos hospedeiros ainda não está totalmente elucidada. A *Giardia* promove alterações na ultraestrutura das vilosidades intestinais, causando o encurtamento dos vilos e microvilos, esfoliação acelerada e diferenciação incompleta dos enterócitos com uma redução de aproximadamente 50% na superfície da área de absorção. A digestão e absorção de nutrientes e líquidos ficam prejudicadas, ocorrendo um decréscimo no tempo do fluxo intestinal, devido ao aumento da motilidade no trato digestivo. Ocorre então uma síndrome de má absorção e digestão, com redução na digestão de carboidratos, promovido pela diminuição na atividade da dissacaridase, sendo freqüente o encontro de gordura nas fezes (esteatorréia), indicando que a gordura não está sendo emulsificada e absorvida pelo organismo (FARTHING, 1999; THOMPSON, 2004).

Além disso, são fortes as evidências de que amostras de *Giardia* geneticamente diferentes possam variar quanto à virulência e capacidade de produzir alterações morfológicas no intestino (HOMAN; MANK, 2001; CACCIO et al., 2005).

Os efeitos clínicos devido à infecção pela *Giardia* variam desde indivíduos assintomáticos até pacientes que apresentam uma severa síndrome de má absorção, e não respondem ao tratamento com as drogas específicas

(FAUBERT, 2000). Os sinais clínicos são caracterizados pelas fezes pastosas, fétidas ou diarréicas, esteatorréia, irritabilidade, náuseas, constipação, dores abdominais e emagrecimento (FARTHING, 1999; FAUBERT, 2000). A infecção geralmente ocorre na forma aguda e os sintomas desaparecem espontaneamente em poucos dias a semanas, mas em 30 a 50% dos casos, principalmente crianças, apesar de imunocompetentes, desenvolvem a infecção na forma crônica, apresentando um quadro de diarréia severa recorrente durante vários meses (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000; FAUBERT, 2000; HOMAN; MANK, 2001).

As principais complicações da giardíase crônica estão associadas à má absorção de gordura e nutrientes como as vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), vitamina B12, ferro, xilose e lactose. Estas deficiências nutricionais produzem efeitos severos, principalmente nas crianças e adolescentes (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993; FARTHING, 1999).

G. duodenalis apresenta uma distribuição geográfica cosmopolita, ocorrendo tanto em regiões tropicais como temperadas, sendo atualmente reconhecida como o parasito intestinal mais comum encontrado no homem, nos países desenvolvidos (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; THOMPSON, 2004).

Na Ásia, África e América Latina, mais de 200 milhões de pessoas sofrem os efeitos da giardíase sintomática e em torno de 500.000 novos casos são registrados a cada ano (THOMPSON, 2004). Nos E.U.A aproximadamente 2,5 milhões de casos de giardíase ocorrem anualmente (FURNESS et al., 2000).

Os cistos são resistentes ao processo comum de cloração empregado no tratamento da água. Assim a água proveniente da rede pública e as fontes e reservatórios de águas superficiais sem tratamento ou deficientemente tratadas constituem um importante fator na disseminação e manutenção do agente (FURNESS et al., 2000; SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006).

A prevalência da *G. duodenalis* em amostras de fezes submetidas ao exame coproparasitológico varia de 2 a 5% nos países industrializados e 20 a 30% nos países em desenvolvimento, sendo observados níveis de até 35% entre crianças atendidas em creches e orfanatos nos E.U.A (FARTHING, 1999; FURNESS et al., 2000). Um estudo realizado na Holanda revelou uma prevalência da infecção pela *G.*

duodenalis de 2 a 14% dependendo da população amostrada, sendo elevada nos pacientes que apresentavam diarreia persistente (HOMAN; MANK, 2001).

Nos países em desenvolvimento, a giardíase é uma das causas mais comuns de diarreia, acometendo principalmente crianças de oito meses a 10-12 anos de idade. Nestas áreas pouco privilegiada onde, muitas vezes, as condições de vida são desfavoráveis e os níveis nutricionais inadequados, as conseqüências desta infecção assumem grande importância, agravando os problemas de má nutrição e intensificando o retardo no desenvolvimento (FARTHING, 1999; ADAM, 2001).

No Brasil, estudos envolvendo crianças revelaram que a prevalência da infecção alcança valores entre 20 a 43%, conforme detalhado no quadro 1. Uma prevalência de 28,5% foi observada em escolares com faixa etária entre sete e 14 anos (CIMERMAM; CIMERMAM, 2002).

A giardíase é provavelmente a doença entérica causada por protozoário, clinicamente mais importante em cães e gatos. Na população canina e felina a infecção ocorre com muito maior freqüência nos filhotes, principalmente em canis ou estabelecimentos de criação intensiva (LEIB; ZAJAC, 1999).

Estudos para avaliar a presença de cistos de *G. duodenalis* em amostras de fezes revelaram prevalências de 6 a 36% na população canina e de 2 a 14% em gatos provenientes de diferentes áreas (MONIS et al., 1998; LEIB; ZAJAC, 1999).

As pesquisas realizadas na Austrália e na América do Norte demonstram um surpreendente aumento no nível de infecção pelo protozoário *G. duodenalis*, sendo atualmente considerado o parasito entérico mais comum encontrado nos cães (THOMPSON, 2000). No Brasil, os levantamentos parasitológicos envolvendo os cães e gatos também evidenciam a elevada ocorrência deste protozoário no decorrer dos últimos anos (BARTMANN; ARAUJO, 2004; HUBER et al., 2005). O quadro 1 ilustra os dados da ocorrência do agente em pesquisas realizadas enfocando amostras provenientes da população humana e de cães e gatos do Brasil.

HUMANOS			
AUTORES	LOCAL	AMOSTRAS	OCORRÊNCIA (%)
UCHOA et al. (2001)	NITERÓI - RJ	218	38,3
SATURNINO et al. (2003)	NATAL - RN	100	20,7
FALEIROS et al. (2004)	CATANDUVA - SP	250	43,75
DENADAI (2005)	VITÓRIA - ES	100	24,0
CARVALHO et al. (2006)	BOTUCATU - SP	279	26,88
CÃES			
AUTORES	LOCAL	AMOSTRAS	OCORRÊNCIA (%)
SOGAYAR (1984)	BOTUCATU – SP	450	6,7
VARGAS MENDEZ (1993)	MARINGÁ – PR	250	15,6
LALLO (1994)	SÃO PAULO – SP	650	20,0
GENNARI et al. (1999)	SÃO PAULO – SP	353	7,65
GENNARI et al. (2001)	SÃO PAULO – SP	871	12,74
OLIVEIRA SEQUEIRA et al. (2002)	BOTUCATU – SP	271	12,20
MUNDIM et al. (2003)	UBERLÂNDIA - MG	100	41,0
BARTMANN; ARAUJO (2004)	PORTO ALEGRE – RS	526	38,0
BECK et al. (2005)	CANOAS - RS	332	34,04
HUBER et al (2005)	RIO DE JANEIRO - RJ	166	31,33
FUNADA et al (2007)	SÃO PAULO	1755	8,5
GATOS			
AUTORES	LOCAL	AMOSTRAS	OCORRÊNCIA (%)
GENNARI et al. (1999)	SÃO PAULO – SP	187	16,04
GENNARI et al. (2001)	SÃO PAULO – SP	303	14,52
FUNADA et al (2007)	SÃO PAULO - SP	327	8,3

Quadro 1 – Ocorrência da *Giardia duodenalis* na população humana e de cães e gatos provenientes de diferentes estados do Brasil – São Paulo -2007

A elevada ocorrência da *G. duodenalis* nos cães e gatos associada ao estreito contato da população humana com os animais de estimação, representa um importante aspecto para a saúde pública, principalmente devido a um possível risco de transmissão zoonótica (LEIB; ZAJAC, 1999; THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000).

A possibilidade de algumas amostras infectarem experimentalmente o homem e os cães e gatos sugerem a possibilidade da existência de reservatórios animais para o homem, embora o papel desses animais na manutenção da endemia humana ou em casos de epidemia necessite melhores esclarecimentos (THOMPSON, 2000).

Enquanto a maioria dos autores concordam que a *G. duodenalis* apresenta potencial para comportar-se como um agente causador de zoonose, evidências diretas para o envolvimento da transmissão zoonótica ainda são escassas (MONIS et al., 1998; THOMPSON, 2004).

Devido à grande dificuldade para a realização de estudos experimentais em seres humanos, na atualidade, evidências de transmissão zoonótica poderiam ser fornecidas através de estudos que revelem as similaridades genéticas entre os isolados de *Giardia* provenientes de humanos e animais (HOPKINS et al., 1997; THOMPSON, 2000).

A demonstração da identidade genética dos isolados de *G. duodenalis* de humanos e de outros animais em uma determinada área geográfica pode proporcionar uma forte indicação de transmissão cruzada (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000).

O padrão de migração dos cromossomos em gel de eletroforese com campo pulsátil (PFGE) foi utilizado em vários experimentos, mas acredita-se que os resultados obtidos são controversos, devido às altas taxas de rearranjo dos cromossomos (ADAM, 2001). A PFGE gera um número muito variável de bandas, não estabelecendo um padrão para a diferenciação entre os isolados de *Giardia* (THOMPSON; REYNOLDSON; LYMBERY, 1994).

A diferenciação antigênica das amostras de *Giardia* é de valor limitado, dada a elevada frequência de variação antigênica proporcionada pelas proteínas específicas variantes da superfície do parasito (VSPs) (ADAM, 2001).

A análise eletroforética de isoenzimas foi um método amplamente aplicado nos primeiros estudos de caracterização de amostras de *G. duodenalis* provenientes de humanos e animais, isolados em cultivo “*in vitro*”. A análise isoenzimática consiste em tipificar o organismo baseado no padrão de migração de um grupo de enzimas metabólicas em um gel na submetido a um campo elétrico. A migração depende do tamanho, estrutura e ponto isoelétrico destas enzimas; desde que estas propriedades são determinadas pela seqüência primária dos aminoácidos, diferenças obtidas no padrão de migração das enzimas (zimodemos) refletiriam possíveis diferenças presentes na seqüência de nucleotídeos que compõe os genes que codificam estas enzimas (ADAM, 2001).

Bertram et al. (1983) avaliaram cinco amostras de *Giardia* estabelecidas em cultivo “*in vitro*” provenientes de humanos (três isolados) e animais (um isolado de gato e um de cobaia), através da análise isoenzimática evidenciando o estabelecimento de três padrões enzimáticos distintos, identificados de I a III. O padrão I reuniu duas amostras humanas e a amostra de gato; o II, a amostra da cobaia e o III, uma amostra humana, sugerindo não ocorrer especificidade de hospedeiro.

O DNA genômico de 11 isolados de *Giardia* obtidos de humanos e quatro animais (dois castores, um gato e uma cobaia) foi comparado utilizando duas técnicas. Os padrões de fragmentos de DNA submetidos à restrição por endonuclease (RFLP) distinguiram dois grupos entre oito isolados; enquanto a análise pelo *Southern blot* utilizando sondas de DNA resultaram na descrição de três grupos. O grupo 1 reuniu seis isolados (quatro humanos, um de gato e um de castor), o grupo dois sete isolados (cinco humanos, um de cobaia e um de castor) e o grupo 3 dois isolados humanos (NASH et al., 1985).

Andrews et al. (1989) examinaram 24 enzimas metabólicas diferentes de 29 isolados de *G. duodenalis* estabelecidas em cultivo *in vitro* provenientes de humanos de diferentes regiões da Austrália e Papua Nova Guiné e os resultados

indicaram a ocorrência de quatro grupos distintos, que foram classificados como I, II, III e IV, sugerindo que *G. duodenalis* é uma espécie complexa consistindo de duas ou mais espécies morfologicamente idênticas.

Um total de 47 amostras de *Giardia* provenientes de humanos, sendo 34 isolados de laboratórios na Polônia, Bélgica e outros países e 13 obtidos de cistos presentes nas fezes de pacientes holandeses foram submetidos à análise isoenzimática, *Southern Blot* e *Dot-Blot* mediante a utilização de sondas rDNA específicas. Os isolados foram divididos em dois grupos, definidos como grupo “Polonês” e o grupo “Belga” (HOMAN et al., 1992).

Mayrhofer et al. (1995) examinaram 60 amostras de *Giardia* isoladas de humanos previamente estabelecidas em camundongos através da análise do perfil eletroforético de 27 enzimas metabólicas. Os resultados permitiram a diferenciação dos isolados em dois grupos, estabelecidos como Agrupamento *Assemblage A* e o Agrupamento *Assemblage B*.

Amostras de DNA de 40 isolados de *Giardia* derivadas de humanos e animais pertencentes ao genótipo “Belga” e “Polonês” (HOMAN et al., 1992) foram comparadas com amostras humanas do genótipo *Assemblage A* e B (MAYRHOFER et al., 1995) e os isolados padrões que representaram os quatro grupos enzimáticos (I, II, III, IV) definidos por Andrews et al. (1989). PCR – RFLP dos segmentos homólogos de dois genes codificadores de proteínas da superfície do trofozoíto (*tsa* 417 e *tsp* 11), e o sequenciamento de um fragmento do gene da glutamato desidrogenase (*gdh*) confirmaram que os isolados de *G. duodenalis* se apresentam divididos em dois agrupamentos genéticos principais. Os isolados australianos *Assemblage A* são equivalentes ao grupo Polonês e abrange os grupos isoenzimáticos I e II, enquanto o *Assemblage B* equivale ao grupo Belga e contém os grupos III e IV (MONIS et al., 1996).

Os resultados compartilhados nesses estudos mostraram que as amostras de *G. duodenalis* recuperadas dos humanos e outras espécies de mamíferos podem ser reunidas em dois grupos principais, sendo descrito na Europa como “Polonês” e “Belga” (HOMAN et al., 1992), na América do Norte como grupo 1, 2 e 3 (NASH et al., 1995) e na Austrália como *Assemblage A* e B (MAYRHOFER et

al., 1995). As análises comparativas realizadas recentemente confirmaram que esta variedade de grupos são geneticamente equivalentes (MONIS et al., 1996).

Embora um consenso a respeito da nomenclatura para esses grupos ainda não esteja estabelecido, o termo *Assemblage* tem recebido grande aceitação e a análise molecular mostra que a distancia genética separando estes dois *Assemblages* podem exceder aquela usada para delinear outras espécies de protozoários (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; MONIS et al., 2003). Por não existir na literatura, uma tradução para o termo *Assemblage*, optamos por usar a palavra no idioma inglês.

O *Assemblage* A consiste de um agrupamento genético, cujo os isolados podem ser divididos em dois subgrupos (genótipos) distintos, denominados A-I e A-II . O genótipo A-I abrange um conjunto de amostras provenientes de humanos e animais, e o genótipo A-II consiste inteiramente de isolados humanos (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; THOMPSON, 2004).

O agrupamento genético *Assemblage* B compreende dois subgrupos (genótipos), o B-III e o B-IV, e abrange uma reunião de isolados predominantemente humanos com algumas amostras de origem animal (MONIS et al., 2003; THOMPSON, 2004).

Estudos de caracterização genética das amostras de *G. duodenalis* recuperadas diretamente das fezes dos animais, através do emprego da PCR e sequenciamento, permitiram a identificação de *Assemblages* anteriormente desconhecidos, principalmente aqueles refratários para o crescimento “*in vitro*” (HOPKINS et al., 1997; THOMPSON, 2000).

Hopkins et al. (1997) analisaram amostras de *G. duodenalis* diretamente das fezes humanas e caninas através da amplificação pela PCR e o seqüenciamento dos nucleotídeos de um fragmento da menor subunidade do gene RNA ribossômico (SSU-rRNA). Os resultados demonstraram quatro grupos genéticos diferentes, o *Assemblage* A (uma amostra humana e duas caninas), o *Assemblage* B (13 amostras humanas e duas caninas), o grupo três (nove amostras caninas) e o quatro (duas amostras caninas). Os isolados pertencentes aos grupos três e quatro revelaram-se geneticamente diferentes dos *Assemblages* previamente

observados nos estudos anteriores envolvendo humanos e animais, sugerindo a existência de dois novos grupos genéticos encontrados especificamente nos cães.

Um estudo envolvendo 11 amostras de *G. duodenalis* de origem canina estabelecidas através da infecção experimental em camundongos, pela análise isoenzimática, amplificação e seqüenciamento dos nucleotídeos do gene da enzima *gdh* permitiram a identificação de dois genótipos específicos caninos, distintos de todos os isolados humanos e animais previamente estabelecidos, sendo designado como *Assemblage C* e *Assemblage D* por MONIS et al. (1998).

O seqüenciamento e comparação dos nucleotídeos do gene SSU-rRNA de amostras de *Giardia* isoladas de duas espécies de roedores, *Microtus ochrogaster* e *Ondatra zibethicus*, revelaram diferenças significativas quando comparadas com as seqüências exibidas pelos isolados de *G. duodenalis* derivados dos humanos, acreditando-se constituir uma espécie distinta compartilhada por esses roedores, designada como *G. microti* (VAN KEULEN et al., 1998).

Ey et al. (1997) analisaram 31 isolados de *Giardia* originários de seis espécies de animais de produção (alpaca, bovino, caprino, ovino, suíno, eqüino) estabelecidos em cultivo “*in vitro*” e camundongos, e compararam com amostras humanas representantes dos *Assemblages A* e *B* através da análise isoenzimática e genética. PCR-RFLP dos genes *tsa* 417 e *tsp* 11 e o seqüenciamento do gene *gdh* evidenciaram que 16 isolados derivados de bovinos, ovinos, alpacas, caprinos e suínos segregavam uma linhagem distinta de todas as outras obtidas em outros estudos envolvendo *G. duodenalis*, sendo referida como um novo genótipo específico dos animais de produção “*Novel Livestock*”.

Monis et al. (1999) no intuito de examinar a relação entre os genótipos de *G. duodenalis*, analisaram amostras representativas dos principais grupos genéticos identificados (*Assemblage A, B, C, D, Livestock*) e compararam com dois isolados derivados de um gato e um rato. Através de PCR e seqüenciamento de segmentos dos genes da *gdh*, triose-fosfato isomerase (*tim*), fator alongamento 1 α e SSU-rRNA foi possível diferenciar sete linhagens genéticas distintas, confirmando os genótipos estabelecidos nos estudos anteriores, conforme ilustra o quadro 2.

O quadro 2 reúne os genótipos identificados nos estudos envolvendo a análise bioquímica e molecular das amostras de *G. duodenalis* humanas e animais.

<i>Giardia duodenalis</i>		
ASSEMBLAGES	HOSPEDEIROS	REFERÊNCIAS
ASSEMBLAGE A	humanos, animais de produção, gatos, cães e castores	MAYRHOFER et al. (1995)
ASSEMBLAGE B	humanos, chinchilas, cães, castores e ratos	HOMAN et al. (1992) e MONIS et al. (1996)
ASSEMBLAGE C	cães	HOPKINS et al. (1997) e MONIS et al. (1998)
ASSEMBLAGE D	cães	HOPKINS et al. (1997) e MONIS et al. (1998)
ASSEMBLAGE E “LIVESTOCK”	Alpaca, bovinos, caprinos, suínos e ovinos	EY et al. (1997) e MONIS et al. (1999)
ASSEMBLAGE F	Gatos	MONIS et al. (1999)
ASSEMBLAGE G	Rato doméstico	MONIS et al. (1999)

Quadro 2 – Relação de *Assemblages* identificados nas amostras de *Giardia duodenalis* – São Paulo – 2007

Alguns genótipos de *G. duodenalis* apresentam uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo os humanos e os animais, enquanto outros parecem ser encontrados exclusivamente nos seus hospedeiros específicos, e não oferecendo risco de transmissão zoonótica (THOMPSON, 2004).

A caracterização molecular das amostras de *Giardia* permite o seu conhecimento genético, e pode ser efetuada sobre amostras recuperadas de suprimentos de água, fornecendo algum indício a respeito da origem da contaminação em situações de surtos epidêmicos.

Desde que os isolados provenientes de cães e gatos apresentam notória dificuldade se estabelecer em cultivo “*in vitro*”, apenas poucas amostras que foram isoladas puderam ser analisadas e caracterizadas (ADAM, 2001). Assim, a maioria das informações existentes foram oriundas de estudos baseados em isolados mantidos em cultivo “*in vitro*”, prática que proporciona uma seleção entre os isolados presentes na amostra, perpetuando apenas o genótipo melhor adaptado às condições do cultivo (MONIS et al., 2003).

Apenas poucos estudos envolvendo a análise genética das amostras de *G. duodenalis*, isoladas diretamente das fezes derivadas de cães e gatos foram realizados. De maneira geral, esses experimentos foram realizados principalmente na América do Norte, Europa e Austrália, requerendo mais estudos comparativos, no intuito de confirmar se as amostras de *Giardia* spp. de outras áreas são geneticamente equivalentes; fornecendo importantes informações para o entendimento das relações epidemiológicas deste agente.

No Brasil, apesar dos níveis significativos da ocorrência da *G. duodenalis* na população humana e nos animais, restritas informações a respeito da identificação molecular deste agente consta na literatura científica.

A enzima glutamato desidrogenase cataliza o processo de desaminação do glutamato e origina o α -cetoglutarato e a amônia sendo encontrada nas eubactérias e eucariotos (BENACHENHOU-LAFA; FORTERRE; LABEDAN, 1993). O seqüenciamento de um segmento do gene *gdh* fornece informações para identificar as sete linhagens genéticas (Quadro 2) entre amostras de *G. duodenalis* provenientes dos humanos e animais (MONIS et al., 1999).

O quadro 3 ilustra os resultados de estudos de caracterização genética de amostras de *Giardia* spp. isoladas da população humana e animal.

AUTORES	LOCAL	MARCADOR	AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO
HOMAN; MANK (2001)	Holanda	<i>gdh</i> (PCR- RFLP)	Humanos (18)	A (9) B (9)
AMAR et al. (2002)	Reino Unido	TPI (PCR- RFLP)	Humanos (30)	AII (9) B (21)
READ et al. (2002)	Austrália	SSU-rDNA (Seq – 130 pb)	Humanos (23)	A (7) B (16)
ABE; KIMATA; ISEKI (2003)	Japão	<i>gdh</i> (PCR- RFLP) <i>gdh</i> (Seq – 220 pb)	Cães (4)	D (4)
APPELBEE et al. (2003)	Canadá	SSU-rDNA (Seq – 292 pb)	Bovinos (42)	E (41) A (1)
READ; MONIS; THOMPSON (2004)	Austrália	<i>gdh</i> (PCR- RFLP) <i>gdh</i> (Seq – 318 pb)	Humanos (8)	AI (1) AII (1) BIV (6)
			Cães (9)	AI (1) BIV (2) C (4) D (2)
			Bovinos (16)	E (16)
BERRILI et al. (2004)	Itália	SSU-rDNA (Seq – 292 pb)	Cães (14)	C (11) D (1)
			Gato (1)	A (1)
			Bovinos (3)	E (3)
ABE; KIMATA; TOKORO (2005)	Japão	<i>gdh</i> (Seq – 592 pb)	Humanos (3)	AII (2) B (1)
ITAGAKI et al. (2005)	Japão	<i>gdh</i> (Seq – 177 pb)	Cães (21)	D (6) C (1) A (14)
			Bovinos (5)	E (4) A (1)
			Gatos (3)	F (3)
			Macacos (3)	B (3)
TROUT et al. (2005)	EUA	SSU-rDNA (Seq 292 pb)	Bovinos (237)	E (206) A (31)
PAPINI et al. (2006)	Itália	SSU-rDNA (Seq – 175 pb)	Gatos (27)	A (27)
FAYER et al. (2006)	EUA	SSU-rDNA (Seq 292 pb)	Gatos (18)	F (18)
VAN DER GIESSEN et al. (2006)	Holanda	<i>gdh</i> (PCR- RFLP) <i>gdh</i> (Seq – 399 pb) SSU-rDNA (Seq – 229 pb)	Humanos (98)	A (34) B (64)
			Cães (2)	D (2)
			Caprino (1)	E (1)
			Ovino (1)	E (1)
			Cervídeo (1)	A (1)

Quadro 3 – Estudos de caracterização genética de amostras de *Giardia* spp. de origem humana e animal – São Paulo – 2007

2 OBJETIVOS

- Padronizar a reação de PCR para amplificar o gene codificador da enzima glutamato desidrogenase de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras de origem humana e animal.
- Caracterizar molecularmente as seqüências parciais de gene codificador da enzima glutamato desidrogenase de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras de origem humana e animal.
- Verificar as relações filogenéticas das linhagens de parasitas estudadas utilizando métodos genealógicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

No intuito de avaliar os isolados de *Giardia* spp. provenientes de humanos e animais, foram desenvolvidas atividades destinadas à obtenção e preparação das amostras fecais, bem como os procedimentos relacionados às reações moleculares para a análise das amostras.

3.1 AMOSTRAS DE *Giardia* spp.

No decorrer deste estudo foram avaliadas 113 amostras de cistos de *Giardia* spp. de origem humana e animal, conforme detalhado no quadro 4.

HOSPEDEIRO DE ORÍGEM	Nº DE AMOSTRAS
HUMANOS	37
CÃES	31
GATOS	20
BOVINOS	05
BUGIOS (<i>Allouatta fusca</i>)	12
CHINCHILAS (<i>Chinchilla lanigera</i>)	03
CACHORROS DO MATO (<i>Cerdocyon thous</i>)	02
AVESTRUZES (<i>Struthio camelus</i>)	02
ONÇA PINTADA (<i>Panthera onca</i>)	01
TOTAL	113

Quadro 4 – Relação de amostras fecais positivas para a presença de cistos de *Giardia* spp. de origem humana e animais - São Paulo - 2007

3.1.1 AMOSTRAS DE ORIGEM HUMANA

As amostras de fezes humanas foram obtidas junto a rotina de exames coproparasitológicos realizada no laboratório da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) e no Hospital Sanatorinhos.

A AFIP é um centro afiliado ao convênio estabelecido entre a Universidade Federal de São Paulo e a Secretaria Municipal de Saúde da cidade de São Paulo, que dá suporte no desenvolvimento de exames laboratoriais, tratamentos e pesquisas. O Laboratório da AFIP é o responsável pela rotina de diagnóstico parasitológico empregada em grande parte dos hospitais municipais da cidade de São Paulo avaliando uma média de 1000 amostras de fezes por dia.

O Hospital Sanatorinhos, localizado no município de Vargem Grande Paulista, em São Paulo, analisa em torno de 1000 amostras de fezes no decorrer do ano, constatando-se uma ocorrência média em torno de 14% de amostras positivas para *Giardia* spp.

As amostras de fezes humanas foram examinadas para presença de cistos de *Giardia* pelo método de Hoffman (REY, 2001). O sedimento das amostras positivas foi acondicionado em tubos plásticos contendo uma solução de dicromato de potássio a 2% e mantidos a 4^o C para posterior purificação. No Anexo 1 (Quadro 1), encontra-se a relação das amostras de cistos de *Giardia* spp. provenientes de humanos.

3.1.2 AMOSTRAS DE ORIGEM ANIMAL

As amostras de fezes de origem animal foram obtidas junto ao Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e com o apoio de algumas instituições colaboradoras:

- Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo (CCZ).
- União Internacional Protetora dos Animais (UIPA).
- Laboratório ABC.
- Instituto Veterinário de Imagem (IVI).
- Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Anhembi Morumbi (Laboratório FMV-UAM).

As amostras de fezes foram submetidas à rotina de diagnóstico coproparasitológico realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias (FMVZ-USP) e avaliadas pelo método de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (OGASSAWARA; BENASSI, 1980) para a pesquisa de *Giardia* spp.

As amostras positivas para presença de cistos de *Giardia* spp. foram diluídas em uma solução conservante de dicromato de potássio a 2% e acondicionadas em frascos plásticos a 4°C e purificadas.

A procedência das amostras de cistos de *Giardia* spp. de origem animal avaliadas no presente estudo estão detalhadas de acordo com os respectivos hospedeiros no Apêndice A.

3.2 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

No intuito de purificar e concentrar os cistos de *Giardia* spp., as amostras de fezes foram diluídas em uma solução de sulfato de zinco ($d= 1,18 \text{ g/cm}^3$) e a seguir filtradas e centrifugadas por 10 minutos a 500 x g. O sobrenadante foi depositado sobre uma lâmina e recoberto com uma lamínula, sendo a seguir analisado ao microscópio óptico para confirmar a presença dos cistos. Após este processo, foi realizada uma lavagem desta lâmina em solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2 (PBS) e os cistos foram recolhidos e transferidos para microtubos tipo *ependorf*. A seguir, os microtubos foram submetidos a uma centrifugação por 5000 x g durante 10 minutos, obtendo os cistos purificados e concentrados no sedimento.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

Os cistos sedimentados durante o processo descrito no item anterior foram submetidos a extração do DNA, conforme descrito por Hopkins et al. (1997): foi adicionado ao sedimento presente em cada microtubo, 490 μL de uma solução de digestão (Tris-HCl 10 mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%). A seguir, adicionou-se 10 μl de proteinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e as amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C.

O produto da digestão foi purificado com uma solução (500 μL) de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Após a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, foi adicionado, à solução de DNA, igual volume de propanol e a mistura obtida, incubada durante 12 horas a temperatura de -20°C. Depois deste período, a solução alcoólica foi submetida a centrifugação a 12.000 x g por 30 minutos. O sedimento obtido foi deixado secar em temperatura ambiente por uma hora, suspenso em 30 μL de TE (10mM TrisHCL pH8,0; 1mM EDTA pH 8,0) e

incubado em banho-seco a 56°C por 30 minutos. O material extraído foi mantido a uma temperatura de 20°C até o momento da amplificação (SAUMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

3.4 PRIMERS EMPREGADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE *gdh*

Os procedimentos relacionados a amplificação de um segmento do gene *gdh* foram estabelecidos utilizando os *primers* #578 e #579 preconizados por Monis et al. (1998) associados a um conjunto de novos *primers* desenvolvidos pelo grupo executor deste trabalho, os *primers* GdhR, GdhF e #579II. A seqüência e a posição dos *primers* utilizados na reação de amplificação estão descritas no Quadro 5.

PRIMERS	SEQÜÊNCIA	POSIÇÃO NO GENE
#578 (senso)	5' GAGAGGATCCTTGARCCNGAGCGCGTNATC 3'	144 - 173
#579 (anti-senso)	5' ACCTTCTAGAANCCNGCDATGTTNGCGCC 3'	1320 – 1292
GdhR (senso)	5' CGAGCGCGAGCCGAAGTATATCC 3'	114 - 136
GdhF (anti-senso)	5' ATGGGGGTCCTGGGGCAGATAG 3'	1449 – 1428
#579 II (anti-senso)	5' GATGTTYGCRCCCATCTGRTAGTTC 3'	1303 – 1274
GdhF-I (senso)	5' AAYGAGGTYATGCGCTTCTGCCA 3'	412 - 434
GdhF-II (senso)	5' ACTTCCTBGAGGAGATGTGCAAGGA 3'	641 - 665

Quadro 5 – Relação de *primers* utilizados para amplificação de seqüências parciais do gene codificador da glutamato desidrogenase de *Giardia* spp. - São Paulo - 2007

3.5 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS *PRIMERS*

A especificidade das PCRs utilizando os pares de *primers* GdhR/#579 e GdhR/579II foi avaliada a partir da observação do comportamento destes *primers* na presença de DNA de bactérias intestinais, nas mesmas condições de laboratório desenvolvidas para amplificar o gene *gdh* das amostras de *Giardia* spp. Os *primers* para *gdh* também foram testados contra amostras contendo ovos e oocistos de outros parasitos que podem infectar os cães e gatos.

3.5.1 AMOSTRAS DE DNA DE BACTÉRIAS INTESTINAIS

As amostras de DNA bacteriano foram obtidas a partir das colônias das bactérias, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Anhembi Morumbi. Uma amostra de colônia de cada espécie bacteriana (*Escherischia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella* spp. e coliformes totais) foi recolhida com auxílio de alça de platina e submetida ao mesmo procedimento de extração de DNA aplicado aos sedimentos contendo cistos de *Giardia* spp., conforme descrito no item 3.3.

3.5.2 AMOSTRAS DE CÃES E GATOS CONTENDO OUTROS PARASITOS

Para a obtenção de amostras de fezes deste item, alíquotas de várias amostras de fezes de cães, contendo os principais helmintos e protozoários que acometem o trato digestivo desta espécie (*Toxocara canis*, *Ancylostoma* spp., *Cystoisospora* spp., *Sarcocystis* spp., *Neospora-Hammondia* e *Cryptosporidium* spp.) foram combinadas em um único frasco. Após a confirmação dos parasitas

presentes através do exame coproparasitológico, este combinado de amostras foi submetido à PCR exatamente como descrito para detecção do gene *gdh*.

Procedimento análogo foi realizado com amostras de gatos abordando os principais helmintos e protozoários que acometem esta espécie (*Toxocara cati*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma* spp., *Cystoisospora felis*, *Cystoisospora rivolta* e *Toxoplasma-Hammondia*).

3.5.3 ACESSO AOS BANCOS DE DADOS

Foram pesquisados os bancos de dados de acesso público do Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para a busca de seqüências homólogas do gene codificador de *gdh* de *Giardia* spp., bem como de seqüências homólogas do gene codificador de *gdh* das bactérias acima citadas.

A busca por similaridade entre os *primers* desenhados neste trabalho com outras seqüências eventualmente disponíveis foi feita com auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) .

3.6 AMPLIFICAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DO GENE *gdh*

Dois procedimentos visando a amplificação do fragmento alvo do gene *gdh* foram realizados utilizando-se soluções com volume final de 50 µL, contendo os reagentes relacionados no quadro 6, aos quais foram adicionados uma alíquota de 05 µL da amostra de DNA de *Giardia* spp. extraída conforme item 3.3.

TAMPÃO DE AMPLIFICAÇÃO (μL) GDH – I		TAMPÃO DE AMPLIFICAÇÃO (μL) GDH – II	
ÁGUA	24,8	ÁGUA	9,2
		BSA	10,0 (20mg/ml)
DNTP	8,0 (1,25mM)	DNTP	8,0 (1,25mM)
BUFFER	5,0 (10x Conc)	BUFFER	5,0 (10x Conc)
GLICEROL	2,5	DMSO	2,5
PRIMER (SENSO)	1,25 (10pmol/ul)	PRIMER (SENSO)	4,0 (10pmol/ul)
PRIMER (ANTI-SENSO)	1,25 (10pmol/ul)	PRIMER (ANTI-SENSO)	4,0 (10pmol/ul)
MgCl ₂	2,0 (50mM)	MgCl ₂	2,0 (50mM)
TAQ POLIMERASE	0,2 (5U/ul)	TAQ POLIMERASE	0,3 (5U/ul)

Taq DNA polymerase platinum (Invitrogen, CA, USA)

Quadro 6 - Reagentes utilizados para amplificação de seqüências parciais do gene codificador da glutamato desidrogenase de *Giardia* spp. - São Paulo - 2007

3.6.1 PARÂMETROS PARA O TERMOCICLADOR (PCR)

Uma vez no termociclador, o aquecimento inicial foi de 95°C por 3 minutos, ocorrendo depois 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 120 segundos, seguidos de um aquecimento final de 72°C por 5 minutos para a extensão.

3.7 ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Os fragmentos amplificados foram visualizados através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (P/V) em cuba horizontal imerso em tampão Tris–Borato–EDTA (0,045 M Tris-Borato, 1mM EDTA, pH 8,0) e a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1.- 10 V/cm de gel). Foram analisadas alíquotas de 10 μL da amostra amplificada e o gel foi imerso numa solução de brometo de etídeo a 0,5 μg/mL durante 20 minutos e posterior observação em transluminador ultravioleta para a visualização dos produtos amplificados. As dimensões dos

fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

3.8. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Após a separação dos produtos de PCR (itens 3.6 e 3.7) por eletroforese em gel de agarose 1,5%, as bandas de interesse foram eluídas do gel com o auxílio de um kit comercial, seguindo as instruções do fabricante (GFX Gel purification kit, Amersham, CA, USA).

3.9. QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS

Alíquotas dos produtos de PCR purificados, após o procedimento descrito no item anterior, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% e quantificadas com o auxílio de um marcador de peso molecular (Low DNA mass ladder, Invitrogen, CA, USA).

3.10. SEQUENCIAMENTO

3.10.1 ESTRATÉGIA DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento de nucleotídeos estabelecido por cada *primer* utilizado na reação é capaz de determinar em média 500 nucleotídeos. Como o fragmento a ser seqüenciado é um produto de PCR de mais de 1000 nucleotídeos, o sequenciamento completo foi realizado em duas etapas, conforme ilustra a figura 1.

Na etapa inicial foi empregado o *primer* Gdh R para o seqüenciamento dos primeiros 550 nucleotídeos. A partir da análise destas seqüências previamente obtidas foi possível o desenvolvimento de um novo conjunto de *primers*, Gdh F-I e Gdh F-II, conforme detalhado no quadro 4. Através do emprego do *primer* Gdh F-II foi possível a obtenção dos nucleotídeos presentes na porção final do produto da PCR. O *primer* Gdh F-I foi proposto para abranger os nucleotídeos da região mediana do gene, e a sua utilização permitiu garantir a qualidade na região de intersecção das seqüências de nucleotídeos geradas pela utilização dos *primers* Gdh R e Gdh F-I. As seqüências foram determinadas em duplicatas para aumentar a confiabilidade do resultado.

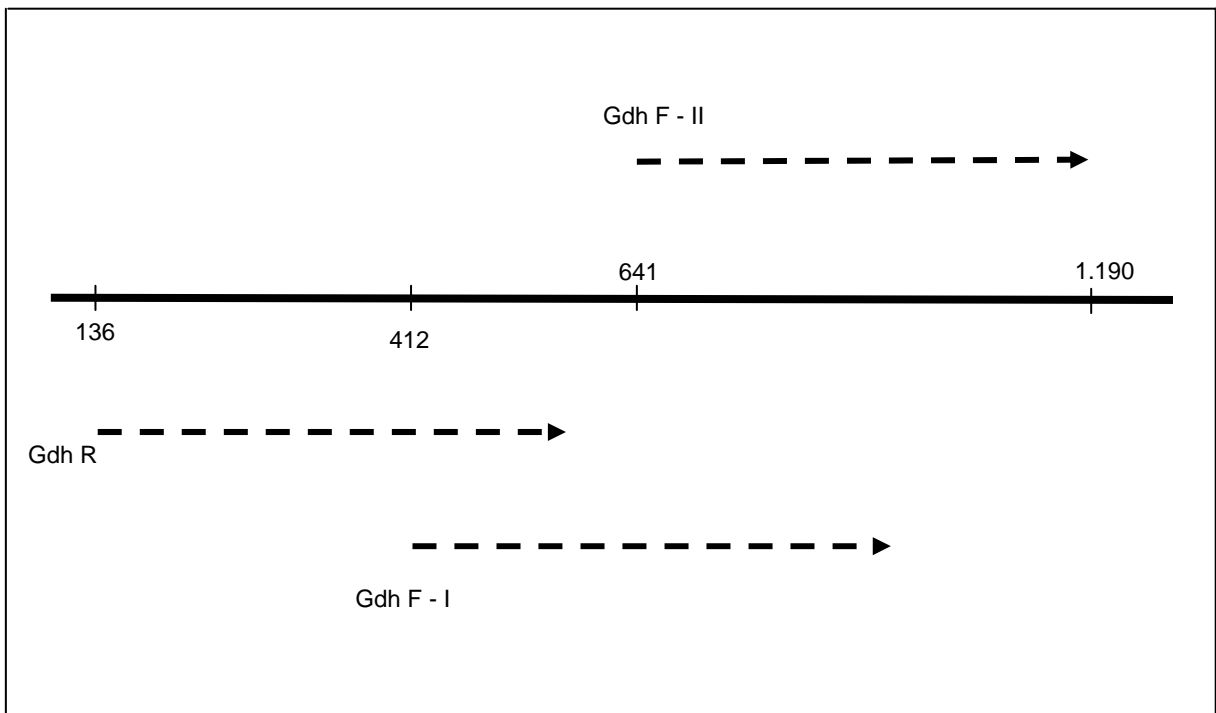


Figura 1 - Estratégia adotada para o sequenciamento dos nucleotídeos do produto da PCR do gene *gdh* de *Giardia* spp. - São Paulo - 2007

3.10.2 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para a reação de seqüenciamento automático foi utilizado o *kit* comercial ABI Prism BigDye TM terminator – cycle sequencing ready reaction (Applied Biosystems, CA, USA). O DNA obtido após a reação de purificação descrita no item anterior foi utilizado como amostra para a reação de seqüenciamento. A reação foi executada utilizando-se, para cada amostra, 1,0 pmol de primer, 2,0µl de BigDye terminator, 4,0 µl de tampão de seqüenciamento (200mM de Tris, 5mM de MgCl₂; pH 9,0), 30 a 90 ng de amostra e água ultra-pura (Milli-Q®) qsp 20,0µl. As reações de seqüenciamento foram conduzidas no termociclador em 35 ciclos de 96 °C por 30 seg; 50 °C por 15 seg e 60 °C por 4 min. Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados por precipitação com isopropanol, seguindo recomendações do manual do kit (ABI Prism Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reation Kit Protocol, Applied Biosystems, CA, USA). Após a precipitação, as amostras foram submetidas à eletroforese em seqüenciador automático modelo ABI Prism® 310 DNA Sequencers (Applied Biosystems, CA, USA).

3.11. AVALIAÇÃO E EDIÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS DO GENE *gdh*

A reação de seqüenciamento emprega um único *primer* por reação, como foi necessário a utilização de três *primers* (Figura 1) para abranger o produto de 1.190 pares de bases do gene *gdh*, cada amostra avaliada gerou no mínimo três seqüências parciais independentes, de acordo com a região delimitada por cada *primer*.

A qualidade dessas sequencias parciais e a união desses fragmentos seqüenciados em suas respectivas zonas de intersecção foram obtidas com o auxílio dos programas *Phred* e *Phrap* incluídos na suíte *Codon Code Aligner*, proporcionando a montagem da seqüência total do gene *gdh*.

3. 12 ALINHAMENTO E TRADUÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS

As seqüências de nucleotídeos do gene *gdh* de cada amostra amplificada foram alinhadas manualmente com o auxílio dos programas Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base seqüências homólogas disponíveis no *GenBank*.

3.13 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para a identificação molecular foi necessário a utilização de algumas seqüências do gene *gdh* representantes dos principais *Assemblages* estabelecidos na literatura, conforme detalhado no quadro 7.

AMOSTRAS	HOSPEDEIRO	ASSEMBLAGE	NÚMERO DE ACESSO: GENEBANK
AD 1	HUMANO	A I	AY 178735
BRIS 136	HUMANO	A II	AY 178737
AD 28	HUMANO	B IV (B ₀)	AY 178738
VANC/ 89	CÃO	B (B ₁)	AY 178750
AD 158	SIAMANG	B (B ₂)	AY 178753
AD 85	HUMANO	B (B ₃)	AY 178755
AD 136	CÃO	C	U 60982
AD 148	CÃO	D	U 60986
P 15	PORCO	E	AY 178741
AD 23	GATO	F	AF 069057
<i>G. ardea</i>	GARÇA	-----	AF 069060

Quadro 7 - Amostras padrões representantes dos principais *Assemblages* de *Giardia* spp. utilizadas para a caracterização genética das amostras de origem humana e animal - São Paulo - 2007

As seqüências de nucleotídeos do gene *gdh* das amostras de *Giardia* spp. de origem humana e animal foram alinhadas com as seqüências das amostras padrões representantes de cada *Assemblage*. A identificação molecular foi realizada através da comparação do grau de similaridade entre as seqüências estudadas e as seqüências padrões dos *Assemblages* previamente estabelecidos pela utilização do método de distância “p” com o auxílio do programa Mega.

A distância “p” avalia a proporção de posições em que duas seqüências apresentam diferenças e a quantificação dessas diferenças são expressas numa matriz na forma de valores ou distâncias entre 0 e 1. A identidade molecular da amostra corresponde ao complemento do valor aferido pelo método de distância “p”, sendo obtida da seguinte maneira:

$$\text{Identidade (\%)} = (1 - \text{distância "p"}). 100$$

3.14 ANÁLISE FILOGENÉTICA

No intuito de verificar as relações filogenéticas das amostras de *Giardia* spp. avaliadas neste estudo e outras amostras estabelecidas na literatura foi proposta uma genealogia que empregou o modelo de substituição Kimura 2-parâmetros para o cálculo da distância e o algoritmo de agrupamentos vizinhos(*neighbor-joining*) para a reconstrução filogenética com o auxílio do programa Mega. As amostras padrões representantes dos principais *Assemblages* estabelecidos na literatura (Quadro 7) foram incluídas nesta análise.

4 RESULTADOS

Nesse tópico serão descritos os resultados obtidos neste estudo.

4.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *gdh*

Monis et al. (1998) desenvolveram os *primers* #578 e #579, mas estes são *primers* não exclusivos para *Giardia* spp., visto que foram baseados na seqüência consenso entre uma única seqüência do gene *gdh* de *Giardia* spp. disponível naquela época e seqüências de gene *gdh* de outros microorganismos, entre eles a *Escherichia coli*. Nesse sentido, foi desenvolvido um novo par de *primers* que flanqueasse toda a região definida pelos *primers* #578 e #579, porém baseado nos dados da única seqüência completa do gene *gdh* de *Giardia* spp. disponível até então (seqüência depositada no GenBank sob o nº M84604), visando com estes *primers* não amplificar seqüências de *E. coli*. Vale ressaltar, que naquele período, todas as seqüências disponíveis de *gdh* de *Giardia* spp. eram seqüências parciais. Assim, foi desenhado o par de *primers* GdhR e GdhF.

Amostras de DNA previamente extraídas de cistos de *Giardia* spp. foram submetidas à reação de amplificação na presença dos *primers* #578 e #579 utilizando-se o tampão de amplificação GDHI, não sendo observado nenhum produto amplificado no gel de agarose após a reação.

Para melhorar os resultados obtidos nessa primeira reação, algumas alterações foram efetuadas no tampão GDH I de forma a obter o tampão GDH II (Quadro 6), no qual foram modificadas as concentrações de alguns dos reagentes, substituição de reagentes (glicerol por DMSO) ou mesmo adicionados alguns compostos (adição de soro-albumina bovina).

As alterações efetuadas no tampão de amplificação permitiram melhorar o sinal da amplificação, gerando um produto correspondente ao segmento alvo do gene *gdh*.

As amostras de DNA de *Giardia* spp. foram então processadas e submetidas à reação de amplificação na presença dos *primers* GdhR e GdhF e tampão de amplificação GDHII, visando a avaliação desses novos *primers*. Estes *primers* demonstraram um desempenho insatisfatório, não sendo observado nenhum fragmento amplificado após a reação.

De posse destes resultados, tentou-se associar os *primers* recém desenhados com os *primers* de Monis et al. (1998). Então, foram avaliadas PCRs utilizando-se os pares #578/GdhF e GdhR/#579. O par de *primer* GdhR/#579 foi capaz de amplificar um fragmento de dimensão de acordo com o esperado, enquanto o par #578/GdhF não amplificou qualquer fragmento.

No intuito de avaliar a especificidade proporcionada pela atuação dos *primers* GdhR e #579, foi realizada uma pesquisa junto aos bancos de dados de informações genéticas visando buscar seqüências homólogas de outros organismos que pudessem também ser encontrados em amostras de fezes. Com este procedimento, foi possível constatar que a seqüência de nucleotídeos do *primer* GdhR apresenta similaridade desprezível com as seqüências do gene *gdh* de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Helicobacter* spp. e *Shigella* spp., sendo a maior similaridade verificada com a seqüência de *Shigella* spp.

Para verificar o comportamento dos *primers* GdhR e #579 nas condições de laboratório, amostras de DNA previamente extraídas de colônias das bactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e colônias de coliformes totais) foram submetidas ao protocolo de amplificação exatamente como descrito para amplificar seqüências de *Giardia* spp. Após a reação de PCR, os *primers* GdhR e #579 amplificaram fragmentos com diversas mobilidades eletroforéticas, entretanto nenhum deles com as dimensões do fragmento gerado pela amplificação de genes de *Giardia* spp.

A partir desses resultados e do conhecimento previamente obtido junto aos bancos de dados de informações genéticas a respeito da seqüência de

nucleotídeos do gene *gdh* das amostras de *Giardia* spp. e outras bactérias (especialmente *Shigella* spp.) foi possível o desenvolvimento de mais um *primer*, designado #579II, como mais uma alternativa para melhorar a especificidade dos produtos amplificados.

O desempenho dos *primers* GdhR e #579II foi analisado nas condições práticas de laboratório mediante o emprego de amostras de DNA extraídas de colônias das bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e colônias de coliformes totais. Para a reação de amplificação seguiu-se o mesmo protocolo aplicado para amplificar as amostras de *Giardia* spp. com os *primers* GdhR e #579, verificando, neste caso, uma melhora significativa na especificidade da reação, eliminando os fragmentos de DNA bacteriano produzido de maneira inespecífica, observados com os *primers* GdhR e #579.

As amostras de *Giardia* spp. de origem humana e animal foram submetidas à reação de amplificação na presença dos *primers* GdhR e 579II (Quadro 5) proporcionando um produto correspondente ao segmento alvo do gene *gdh*, em boas condições para a análise por sequenciamento automático.

As amostras de fezes provenientes de cães e gatos contendo os principais helmintos e protozoários que acometem o trato digestivo desses animais foram submetidas às condições previamente estabelecidas para a extração e a amplificação do gene *gdh* presente nas amostras de *Giardia* spp. não sendo constatado nenhum produto amplificado após a reação.

No decorrer deste experimento a amplificação do gene *gdh* logrou êxito e tornou possível a amplificação das 113 amostras de *Giardia* spp. de origem humana e animal.

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Após o sequenciamento, as 113 seqüências obtidas foram alinhadas entre si e com as outras seqüências representativas dos diversos *Assemblages* de *G. duodenalis*. Uma matriz de identidade foi calculada e os resultados encontram-se detalhados nas tabelas abaixo relacionadas:

Tabela 1 - Identificação molecular das amostras de *Giardia* spp. provenientes de gatos avaliadas pelo seqüenciamento do gene *gdh* - São Paulo – 2007

GATOS					
AMOSTRAS	NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS	POSIÇÃO NO GENE	IDENTIDADE (%)	ASSEMBLAGE	GENÓTIPO
F ₁	1002	166 – 1167	100	F	-
F ₃	1025	166 – 1190	100	F	-
F ₄	1002	166 – 1167	100	F	-
F ₅	996	172 – 1167	99,80	A	A I
F ₆	1002	166 – 1167	100	F	-
F ₇	1000	166 – 1165	100	F	-
F ₈	1002	166 – 1167	100	F	-
F ₁₀	1022	166 – 1187	100	A	A I
F ₁₁	1056	166 – 1221	99,80	A	A I
F ₁₂	698	463 – 1160	99,80	A	A I
F ₁₃	1002	166 – 1167	100	F	-
F ₁₄	1022	166 – 1187	99,60	A	A I
F ₁₅	1002	166 – 1167	100	F	-
F ₂₀	1013	175 – 1187	100	F	-
F ₂₁	1002	166 – 1167	100	F	-
F ₂₂	1022	166 – 1187	100	A	A I
F ₂₃	752	175 – 926	100	A	A I
F ₂₄	927	235 – 1161	100	F	-
F ₂₅	1011	166 – 1176	100	A	A I
F ₂₆	995	166 - 1160	100	A	A I

A análise das seqüências das amostras de *Giardia* spp. provenientes dos gatos possibilitaram a identificação de dois grupos genéticos (*Assemblage* F e *Assemblage* A). O *Assemblage* F foi detectado em 11 das 20 amostras analisadas, enquanto nove amostras foram pertencentes ao *Assemblage* A e genótipo A I.

Tabela 2 - Identificação molecular das amostras de *Giardia* spp. provenientes de cães avaliadas pelo seqüenciamento do gene *gdh* - São Paulo - 2007

AMOSTRAS	CÃES			
	NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS	POSIÇÃO NO GENE	IDENTIDADE (%)	ASSEMBLAGE
C ₁	1023	166 - 1188	99,80	D
C ₂	995	166 - 1160	99,40	D
C ₃	638	166 - 803	99,10	D
C ₆	1025	166 - 1190	99,60	D
C ₇	899	166 - 1064	99,60	D
C ₈	707	166 - 872	99,50	D
C ₉	819	172 - 990	99,80	D
C ₁₀	825	166 - 990	99,60	D
C ₁₁	872	166 - 1037	99,70	D
C ₁₂	1024	166 - 1189	99,90	D
C ₁₃	1055	166 - 1220	99,80	C
C ₁₄	993	166 - 1158	99,70	D
C ₁₇	979	166 - 1144	99,60	C
C ₂₀	561	477 - 1037	99,30	C
C ₂₁	1023	166 - 1188	100	C
C ₂₃	995	166 - 1160	99,50	D
C ₂₄	1001	166 - 1166	99,90	D
C ₂₅	731	166 - 896	98,70	D
C ₂₈	1005	166 - 1170	99,90	D
C ₂₉	995	166 - 1160	99,60	D
C ₃₀	970	166 - 1135	99,70	D
C ₃₁	979	166 - 1144	99,90	C
C ₃₂	1022	166 - 1187	100	C
C ₃₄	1000	166 - 1165	99,70	D
C ₃₅	1022	166 - 1187	99,60	D
C ₃₆	979	166 - 1144	100	C
C ₃₇	992	169 - 1160	99,50	D
C ₃₈	1025	166 - 1190	99,20	C
C ₃₉	992	169 - 1160	99,50	D
C ₄₀	995	166 - 1160	99,80	D
C ₄₂	1012	166 - 1177	99,80	D

A análise das amostras de *Giardia* spp. provenientes dos cães demonstrou a ocorrência de dois *Assemblages* distintos C e D. A maioria das amostras (23/31) pertence ao *Assemblage* D, e oito foram identificadas como *Assemblage* C.

Tabela 3 - Identificação molecular das amostras de *Giardia* spp. de animais selvagens pelo seqüenciamento do gene *gdh* - São Paulo - 2007

BUGIO - <i>Allouatta fusca</i>					
AMOSTRAS	NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS	POSIÇÃO NO GENE	IDENTIDADE (%)	ASSEMBLAGE	GENÓTIPO
BG CEMAS	1055	166 – 1220	99,80	B	B IV
BG CCZ - I	995	166 – 1160	99,80	B	B IV
BG CCZ – II	995	166 – 1160	99,80	B	B IV
BG 40	809	166 – 974	99,80	B	B IV
BG 45	1023	166 – 1188	99,80	B	B IV
BG 46	1022	166 – 1187	99,80	B	B IV
BG 92	1022	166 – 1187	99,80	B	B IV
BG 93	1002	166 – 1167	99,70	B	B IV
BG 95	995	166 – 1160	99,80	B	B IV
BG 96	1022	166 – 1187	99,70	B	B IV
BG 97	1001	166 – 1166	99,80	B	B IV
BG 99	995	166 – 1160	99,70	B	B IV

CACHORRO DO MATO - <i>Cerdocyon thous</i>					
AMOSTRAS	NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS	POSIÇÃO NO GENE	IDENTIDADE (%)	ASSEMBLAGE	GENÓTIPO
CM 1	1057	166 – 1222	99,40	D	-
CM 2	972	166 - 1137	99,90	C	-

ONÇA PINTADA - <i>Panthera onca</i>					
AMOSTRAS	NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS	POSIÇÃO NO GENE	IDENTIDADE (%)	ASSEMBLAGE	GENÓTIPO
ONÇA	984	166 - 1149	99,70	A	A I

A identificação molecular das amostras de *Giardia* spp. oriundas dos animais selvagens mostrou a ocorrência dos *Assemblages* A, B, C e D. Em relação aos bugios todas as amostras analisadas foram identificadas como *Assemblage* B e genótipo BIV, enquanto a única amostra de onça-pintada demonstrou pertencer ao *Assemblage* A e genótipo AI. As duas amostras de cachorro do mato apresentaram *Assemblages* distintos, sendo uma delas pertencente ao *Assemblage* C e a outra amostra ao *Assemblage* D.

Tabela 4 - Identificação molecular das amostras de *Giardia* spp. provenientes de bovinos avaliadas pelo seqüenciamento do gene *gdh* - São Paulo - 2007

BOVINOS					
AMOSTRAS	NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS	POSIÇÃO NO GENE	IDENTIDADE (%)	ASSEMBLAGE	GENÓTIPO
BV 3	555	469 – 1023	99,90	E	-
BV 4	995	166 – 1160	99,70	A	A I
BV 5	563	709 – 1271	99,90	E	-
BV 6	686	475 – 1160	99,20	E	-
BV 7	692	469 - 1160	99,30	E	-

Embora tenham sido analisadas apenas cinco amostra de *Giardia* spp. provenientes dos bovinos foi possível a identificação do *Assemblage* E em quatro amostras e uma amostra pertencente ao *Assemblage* A e genótipo A I.

Tabela 5 - Identificação molecular das amostras de *Giardia* spp. provenientes de animais exóticos avaliadas pelo seqüenciamento do gene *gdh* - São Paulo - 2007

CHINCHILA – <i>Chinchila lanígera</i>					
AMOSTRAS	NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS	POSIÇÃO NO GENE	IDENTIDADE (%)	ASSEMBLAGE	GENÓTIPO
CH 145	809	166 – 974	100	B	B IV
CH 299	1025	166 – 1190	100	B	B IV
CH 391	809	166 – 974	100	B	B IV
AVESTRUZ – <i>Struthio camelus</i>					
AMOSTRAS	NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS	POSIÇÃO NO GENE	IDENTIDADE (%)	ASSEMBLAGE	GENÓTIPO
AV 13	1011	166 – 1176	99.80	B	B IV
AV 17	1019	169 – 1187	99.80	B	B IV

As amostras de *Giardia* spp. oriundas dos animais exóticos foram todas pertencentes ao *Assemblage* B. As três amostras de chinchilas e as duas de avestruzes foram identificadas como pertencente ao genótipo BIV.

Tabela 6 - Identificação molecular das amostras de *Giardia* spp. de origem humana avaliadas pelo seqüenciamento do gene *gdh* - São Paulo - 2007

HUMANOS					
AMOSTRAS	NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS	POSIÇÃO NO GENE	IDENTIDADE (%)	ASSEMBLAGE	GENÓTIPO
H ₁	993	167 - 1159	100	B	B IV
H ₃	859	166 - 1024	100	A	A II
H ₄	826	166 - 991	100	A	A II
H ₅	995	166 - 1160	100	A	A II
H ₆	994	166 - 1159	100	A	A II
H ₇	994	166 - 1159	99,69	A	A II
H ₈	977	166 - 1142	100	A	A II
H ₉	872	166 - 1037	100	A	A II
H ₁₀	995	166 - 1160	98,98	B	B IV
H ₁₁	998	166 - 1163	100	A	A II
H ₁₂	994	166 - 1159	100	A	A II
H ₁₄	858	166 - 1023	99,64	A	A II
H ₁₅	997	166 - 1142	99,58	A	A II
H ₁₆	995	166 - 1160	100	A	A II
H ₁₇	995	166 - 1160	100	A	A II
H ₁₈	843	166 - 1008	100	A	A II
H ₁₉	808	166 - 973	100	A	A II
H ₂₀	859	166 - 1024	100	A	A II
H ₂₁	995	166 - 1160	99,90	B	B IV
H ₂₂	995	166 - 1160	99,50	B	B IV
H ₂₃	785	468 - 1252	100	A	A II
H ₂₄	846	166 - 1011	100	A	A II
H ₂₅	1023	167 - 1189	100	B	B IV
H ₂₆	1022	166 - 1187	100	A	A II
H ₂₇	976	166 - 1146	99,70	A	A II
H ₂₉	1018	172 - 1189	100	B	B IV
H ₃₀	989	172 - 1160	100	B	B IV
H ₃₁	997	166 - 1162	100	A	A II
H ₃₂	995	166 - 1160	100	A	A II
H ₃₅	994	166 - 1159	100	A	A II
H ₃₆	995	166 - 1160	99,70	A	A II
H ₃₈	846	166 - 1011	100	A	A II
H ₃₉	853	160 - 1012	100	A	A II
H ₄₀	1001	160 - 1160	100	A	A II
H ₄₁	843	166 - 1008	99,70	A	A II
H ₄₂	995	166 - 1160	100	A	A II
H ₄₃	887	151 - 1037	99,80	B	B IV

A identificação molecular das 37 amostras de *Giardia* spp. oriundas de humanos mostrou que a grande maioria (29/37) pertence ao *Assemblage* A e ao genótipo AII, enquanto apenas oito amostras foram identificadas como *Assemblage* B e genótipo BIV.

A identificação molecular das amostras de *Giardia* spp. de origem humana e animal avaliadas neste experimento demonstra a ocorrência de seis grupos genéticos distintos, conforme ilustrado no quadro 8.

HOSPEDEIROS	ASSEMBLAGES – GENÓTIPOS	
	HUMANO	A II
CÃES	C e D	-----
GATOS	F	A I
BOVINOS	E	A I
BUGIOS	-----	B IV
CACHORRO DO MATO	C e D	-----
ONÇA PINTADA	-----	A I
CHINCHILA	-----	B IV
AVESTRUZ	-----	B IV

Quadro 8 – *Assemblages* e genótipos identificados nas amostras de *Giardia* spp. de origem humana e animal - São Paulo - 2007

4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A partir da identificação molecular foi possível observar que algumas amostras apresentavam seqüências de nucleotídeos idênticas, neste caso foi selecionada pelo menos uma seqüência para representar estes grupos idênticos na análise filogenética.

A reconstrução filogenética das amostras de *Giardia* spp. de origem humana e animal demonstrou a ocorrência de seis linhagens genéticas distintos separadas por longos ramos, conforme ilustrado na figura 2.

A seqüência padrão de *G. ardea* incluída na análise filogenética determinou a formação de um grupo único e distinto separado por um longo ramo, em relação as amostras avaliadas neste estudo, evidenciando uma indicação da diversidade que existe entre os membros de espécies diferentes.

As amostras avaliadas e as demais seqüências (Quadro 7) incluídas neste estudo, formalmente designadas *G. duodenalis*, formaram uma complexa hierarquia de agrupamentos sustentados por valores de *bootstraps* consistentes. Assim seis agrupamentos principais foram evidenciados (A, B, C, D, E, F).

O agrupamento *Assemblage* A apresentou uma ramificação com dois subgrupos (genótipos), sendo que o genótipo AI reuniu amostras de origem animal (gato, bovino e onça-pintada); enquanto o genótipo AII contemplou apenas amostras de origem humana.

O *Assemblage* B foi formado por um agrupamento único, representado pelo subgrupo (genótipo) BIV, que compreendeu amostras provenientes de humanos e animais (chinchila, bugio e avestruz).

Os agrupamentos remanescentes (*Assemblages* E e F) foram formados por uma reunião de amostras provenientes de uma única espécie de hospedeiro. O agrupamento *Assemblage* E reuniu apenas as amostras de bovinos, enquanto o agrupamento *Assemblage* F foi representada apenas por amostras oriundas dos gatos.

A análise filogenética das amostras provenientes dos cães desencadearam a formação de dois agrupamentos distintos e separados, o *Assemblage* C e o *Assemblage* D. As duas amostras de cachorro do mato foram alocadas nestes agrupamentos específicos, porem uma amostra no agrupamento *Assemblage* C e a outra amostra no *Assemblage* D.

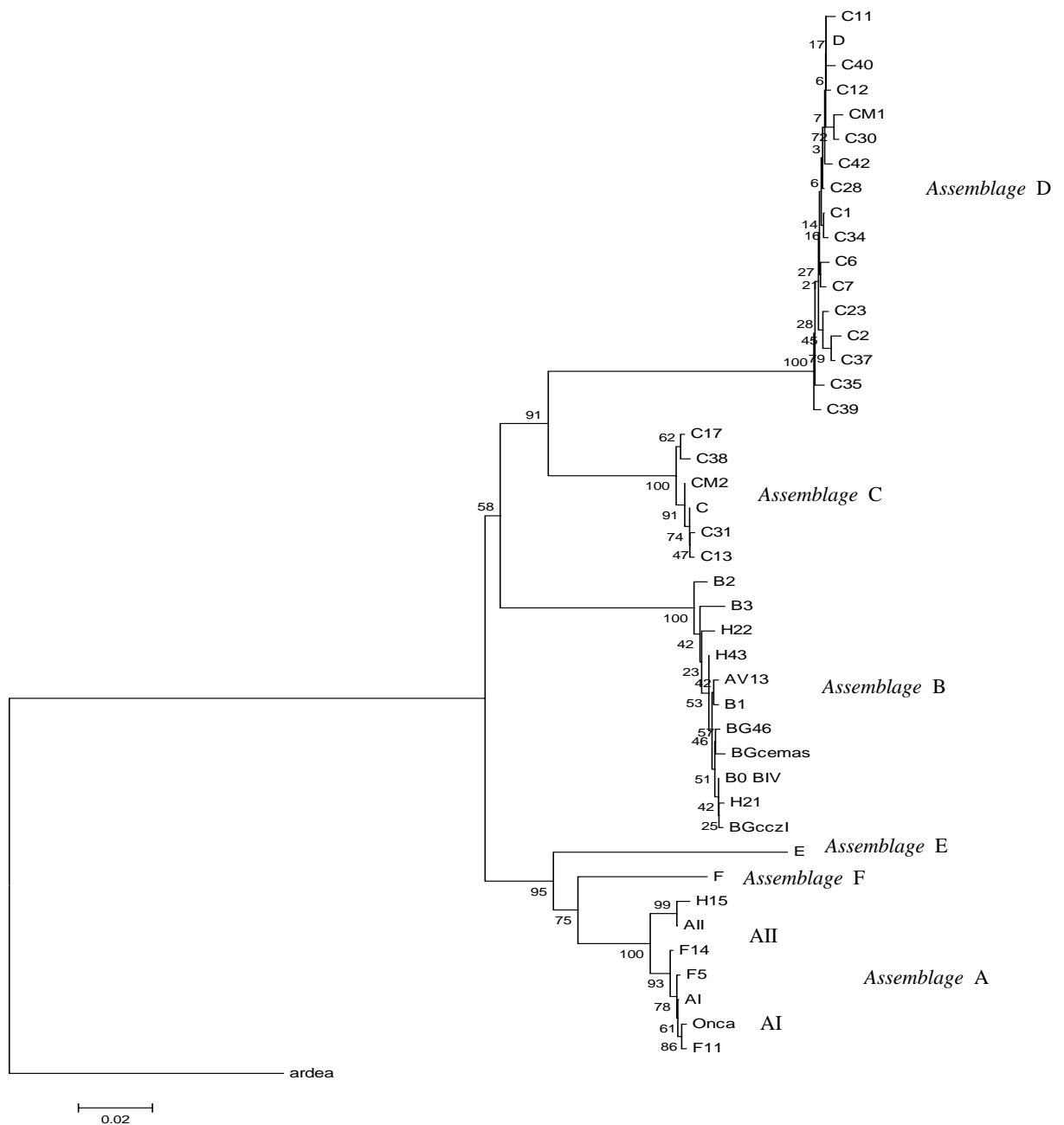


Figura 2 - Relação filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene da glutamato desidrogenase provenientes dos isolados de *Giardia* spp. avaliada através do emprego do modelo de distância Kimura 2 parâmetros e pelo algoritmo dos agrupamentos vizinhos - São Paulo - 2007

5 DISCUSSÃO

Na atualidade uma ampla variedade de ensaios moleculares vêm sendo utilizada para gerar mais conhecimento a respeito da espécie complexa *G. duodenalis*, composta de isolados morfológicamente indistinguíveis e que são geneticamente distintos.

Uma condição imprescindível para a realização desses estudos de caracterização genética é o estabelecimento de um sistema capaz de amplificar genes de amostras isoladas de uma ampla variedade de hospedeiros. Como alguns autores relataram falhas no sistema empregado para a amplificação de amostras de *G. duodenalis* (AMAR et al., 2002; TROUT et al., 2004; VAN DER GIESSEN et al., 2006), assim no presente estudo foi necessário o desenvolvimento de novos *primers* e algumas alterações foram realizadas nas condições empregadas nas reações para a amplificação do gene *gdh*.

A adição de DMSO, que é um solvente que facilita a desnaturação do DNA, e a BSA, que atua como um estabilizador da enzima polimerase e auxilia na retirada de inibidores nas fezes, proporcionou uma grande melhora na reação, independente das condições dessas amostras, tais como o período de conservação e a presença de inibidores nas fezes. Assim, foi possível a amplificação de todas as 113 amostras de *Giardia* spp. de origem humana e animal, condição imprescindível para o seqüenciamento e a identificação molecular.

Os estudos abrangendo a evolução da enzima *gdh* propõem que a sua origem seja em função de uma única duplicação gênica ancestral, e por consequência estes parálogos já foram usados para a construção de uma árvore da vida universal. A distribuição do padrão filogenético indicou que vários eventos adicionais de duplicação gênica, associados a processos de perda paralela e transferência lateral de gene, provavelmente foram mecanismos significantes durante a história evolucionária dessas enzimas (BENACHENHOU-LAFA; FORTERRE; LABEDAN, 1993).

Assim as seqüências derivadas do gene *gdh* são pouco conservadas e apresentam um nível de variabilidade entre os nucleotídeos que fornece informações moleculares de maneira mais detalhada capaz de diferenciar as sete linhagens genéticas principais (*Assemblages* A - G) e os seus subgrupos (AI, AII, BIII, BIV) que compõe a espécie formalmente designada *G. duodenalis* e as outras espécies deste gênero (MONIS et al., 1999). Tal fato foi de grande importância nesse estudo, pois permitiu uma identificação mais restrita das amostras com inferências mais consistentes a respeito da transmissão entre as espécies.

Desde que o marcador molecular consagrado nos estudos de caracterização genética, a menor subunidade do gene ribossômico (SSU-rDNA), quando aplicado para avaliar amostras de *G. duodenalis* não permite a distinção dos *Assemblages* e os seus subgrupos, devido a sua natureza altamente conservada; o gene *gdh* vem sendo utilizado com elevada freqüência e extremo sucesso para caracterizar os isolados de *Giardia* spp. provenientes de humanos e uma ampla variedade de mamíferos domésticos e selvagens (READ; MONIS; THOMPSON, 2004).

A identificação molecular realizada nesse estudo mostra que as amostras de *Giardia* spp. provenientes dos humanos foram divididas em dois agrupamentos genéticos principais: o *Assemblage* A e o *Assemblage* B, resultado compatível com todas as referências descritas na literatura (MONIS; THOMPSON, 2003; THOMPSON, 2004). Embora poucos, isolados humanos foram avaliados, esse resultado indica que apenas os *Assemblages* (A e B) estão adaptados para infectar os humanos no Brasil, uma vez que nenhum outro *Assemblage* ou espécie de *Giardia* spp. foram identificadas.

As amostras provenientes dos humanos que agruparam no *Assemblage* A foram todas pertencentes ao genótipo AII. Outros relatos na literatura assemelham-se aos desse estudo e reforçam as evidências de que este genótipo AII esteja presente apenas nas amostras humanas, sugerindo uma elevada especificidade parasitária (ABE et al., 2005; VAN DER GIESSEN et al., 2006).

O fato de não ser identificado nenhum isolado pertencente ao subgrupo genético AI nas amostras de humanos, também é enfatizado por alguns autores

(AMAR et al., 2002; MATSUBAYASHI; KIMATA; ABE, 2005). Este genótipo era bastante comum nos estudos realizados nos anos 80 e início da década de 90 e encontra-se pouco prevalente na atualidade, fato que pode estar relacionado à natureza da amostra avaliada. Nos estudos anteriores as amostras eram primeiramente isoladas através dos métodos de cultivo *in vitro*, as quais promovem uma seleção preferencial para esse genótipo, melhor adaptado a essas condições (MONIS; THOMPSON, 2003).

As demais amostras de humanos agruparam no *Assemblage* B e foram todas pertencentes ao genótipo BIV. Esse resultado foi compatível com outros estudos que observaram a ocorrência deste genótipo na identificação molecular das amostras humanas pertencentes ao *Assemblage* B (READ; MONIS; THOMPSON, 2004; TRAUB et al., 2004; VAN DER GIESSEN et al., 2006). As informações obtidas nesse estudo sobre este genótipo propõe um sub-agrupamento complexo que reúne amostras provenientes dos humanos e isolados de origem animal, indicando uma baixa especificidade, podendo adaptar-se e exercer o parasitismo nos humanos e em algumas espécies de animais.

A análise das amostras de *Giardia* spp. isoladas dos cães permitiu a identificação de dois agrupamentos genéticos distintos: o *Assemblage* C e o *Assemblage* D. Na literatura a grande maioria dos estudos com amostras de cães demonstra a ocorrência destes mesmos agrupamentos genéticos (HOPKINS et al 1997; MONIS et al., 1998; ABE et al., 2003; ITAGAKI et al., 2005), e ressaltam a sua ocorrência apenas nessa espécie, sugerindo uma adaptação desses *Assemblages*.

Nesse estudo nenhuma das amostras isoladas dos cães foi identificada como pertencente aos *Assemblages* A ou B. Este fato pode ter ocorrido em virtude das amostras isoladas dos cães serem provenientes de um grande centro urbano. Apenas dois estudos constataram a ocorrência dos *Assemblages* A ou B em isolados de cães, sendo ambos realizados em comunidades rurais (aldeias), local que favorece o estreito contato da população humana e de cães sob condições de higiene insatisfatória (HOPKINS et al 1997; TRAUB et al., 2004).

No presente estudo observou-se a ocorrência de dois agrupamentos genéticos distintos nas amostras de *Giardia* spp. provenientes dos gatos: o *Assemblage* F e o *Assemblage* A. Outros relatos compartilham com os resultados desse estudo e reforçam a presença do *Assemblage* F apenas nas amostras de gatos sugerindo uma elevada especificidade parasitária (MONIS et al., 1999; ITAGAKI et al., 2005; FAYER et al., 2006).

As demais amostras de gatos foram agrupadas no *Assemblage* A, sendo esse resultado compatível com outros estudos de identificação molecular (VAN KEULLEN et al., 2002; BERRILLI et al., 2004; PAPINI et al., 2006). Na literatura nada consta abordando a identificação do genótipo em amostras de gatos. Nesse estudo foi possível observar que as amostras que agruparam no *Assemblage* A eram todas pertencentes ao genótipo AI. Este genótipo corresponde a um subagrupamento que abrange amostras isoladas de humanos e de origem animal, indicando uma baixa especificidade parasitária e com capacidade de infectar humanos e uma ampla variedade de animais (THOMPSON, 2004).

As informações estabelecidas na literatura demonstram que a maioria das amostras de *Giardia* spp. provenientes dos bovinos são pertencentes ao *Assemblage* E, enquanto uma minoria pertence ao *Assemblage* A (O'HANDLEY et al., 2000; APPELBEE et al., 2003; BECHER et al., 2004; BERRILLI et al., 2004; OLSON et al., 2004; TROUT et al., 2005). Apesar do número reduzido de amostras avaliadas nesse estudo foi possível constatar a ocorrência destes dois agrupamentos genéticos nas amostras de bovinos. O *Assemblage* E corresponde a uma reunião de amostras isoladas de bovinos, ovinos, caprinos e suínos (animais de produção) e parece estar adaptado para exercer o parasitismo ao grupo dos artiodáctilos.

A única amostra isolada de bovino que agrupou no *Assemblage* A foi identificada como pertencente ao genótipo AI. Este genótipo, como já comentado, abrange amostras isoladas de humanos e de uma ampla variedade de animais.

Itagaki et al. (2005), no Japão, constataram a ocorrência de um único agrupamento genético o *Assemblage* B ao avaliar três amostras de *Giardia* spp. isoladas de *Macaca fuscata*. Graczyk et al. (2002) avaliaram duas amostras de

Giardia spp. isoladas de *Gorilla gorilla* provenientes de Uganda e identificaram como pertencentes ao agrupamento genético *Assemblage* A.

Nesse estudo todas as amostras isoladas de bugio foram caracterizadas como pertencentes ao *Assemblage* B e ao genótipo B IV, sendo o primeiro relato na literatura a respeito de identificação molecular envolvendo amostras de *Giardia* spp. isoladas de primatas do novo mundo (*Allouatta fusca*). A identificação deste mesmo genótipo nas amostras avaliadas de humanos enfatiza a sua importância, que parece estar adaptado a exercer o seu parasitismo nos humanos e nos primatas não humanos.

Os trabalhos de identificação molecular realizados com canídeos enfocam única e exclusivamente o cão doméstico (*Canis familiaris*) e demonstram uma predominância na ocorrência dos dois agrupamentos genéticos específicos, *Assemblage* C e *Assemblage* D, nesses animais (HOPKINS et al 1997; MONIS et al., 1998; ABE et al., 2003; ITAGAKI et al., 2005). Nenhuma informação foi encontrada na literatura a respeito da identificação molecular de amostras de *Giardia* spp. isoladas de canídeos selvagens. Nesse estudo as duas amostras de cachorro do mato avaliadas apresentaram resultados compatíveis com os observados na população canina. Uma amostra foi identificada como pertencente ao *Assemblage* C e a outra ao *Assemblage* D, indicando que essa espécie de canídeo selvagem é susceptível à infecção pelos mesmos grupos genéticos específicos do cão doméstico. Assim a especificidade parasitária destes *Assemblages* parece não ser restrita a uma única espécie de canídeo, podendo exercer o parasitismo a hospedeiros estritamente relacionados como o cachorro do mato (*Cerdocyon thous*).

Nesse estudo foi possível realizar a identificação molecular de uma amostra de *Giardia* spp. isolada de uma onça pintada como pertencente ao *Assemblage* A e ao genótipo AI, sendo o primeiro relato na literatura envolvendo amostras de felinos selvagens. Este resultado ressalta a ampla variedade de hospedeiro susceptível ao parasitismo por este genótipo, podendo acometer tanto os felídeos domésticos como os selvagens.

As restritas informações disponíveis na literatura demonstraram que as amostras isoladas de chinchilas foram todas pertencentes ao *Assemblage* B (THOMPSON, 2004). As três amostras avaliadas nesse estudo foram identificadas como pertencentes ao genótipo BIV, sendo esse resultado semelhante ao único trabalho que discriminou o genótipo em amostra de chinchila proveniente da Republica Tcheca (VAN DER GIESSEN et al., 2006). Apesar do número reduzido de amostras esses resultados indicam que a *Giardia* spp. obtida de chinchilas parecem ser restritas ao *Assemblage* B e ao genótipo BIV.

Nos poucos estudos envolvendo aves duas espécies de *Giardia* spp. foram identificadas: *G. psittaci* encontrada em psitacídeos e *G. ardea* em garças (ERLANDSEM; BEMRICK, 1987; ERLANDSEM et al., 1990). Nada consta a respeito da identificação molecular de amostras de *Giardia* spp. provenientes de avestruzes. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a ocorrência da espécie formalmente descrita como *G. duodenalis* colonizando o trato intestinal de aves, conforme ressaltado por Mc Donnell et al. (2003). No presente estudo as duas amostras avaliadas eram pertencentes ao *Assemblage* B e ao genótipo BIV, também identificado nas amostras de humanos, primatas e chinchilas. Este é o primeiro relato de amostras isoladas de avestruzes incluídas neste genótipo, confirmando a baixa especificidade parasitária deste genótipo e ampliando a gama de hospedeiros susceptíveis.

No intuito de elucidar as relações estabelecidas entre os diferentes *Assemblages* e os seus respectivos hospedeiros e a origem geográfica das amostras foi realizada uma análise filogenética.

Em seqüências homólogas de segmentos de DNA com uma origem comum, as diferenças entre elas originaram-se a partir de mutações que ocorreram em linhagens que se diversificaram a partir de seu ancestral comum. Os métodos da análise filogenética baseados em distâncias transformam a variabilidade de nucleotídeos das seqüências em um valor de distância e constroem uma matriz com todas as distâncias calculadas entre os pares de seqüências possíveis (RUSSO; MIYAKI; PEREIRA, 2001).

Na construção da árvore filogenética a partir das seqüências do gene *gdh* foram necessárias duas etapas: o cálculo da distância e a construção da topologia. Para a construção da matriz de distâncias foi necessário o emprego de um modelo de substituição nucleotídeos denominado Kimura 2-parâmetros. A distância de Kimura 2-parâmetros considera que as taxas de transição e transversão são diferentes. As purinas possuem dois anéis de carbono, enquanto que as pirimidinas possuem apenas um. Tal fato possibilita que as substituições de purina por purina ou pirimidina por pirimidina sejam fisicamente mais prováveis de acontecer, pois não afetam tanto a conformação do DNA e passam mais facilmente despercebidas pelo crivo dos mecanismos de reparo da célula. Este modelo leva em consideração esse desvio na direção da ocorrência das transições (RUSSO; MIYAKI; PEREIRA, 2001).

Após a construção da matriz de distâncias foi necessário empregar um algoritmo para a reconstrução da topologia. Para tanto foi empregado o algoritmo de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*), que é baseado no princípio de evolução mínima, no qual a árvore com menor soma total dos ramos é procurada e eleita, sendo muito utilizado pela simplicidade do seu cálculo.

Monis et al., (1999) realizaram a análise filogenética das amostras representantes dos principais agrupamentos genéticos (*Assemblages* A, B, C, D, E e F) empregando os métodos de distância, verossimilhança e parcimônia e constataram a produção de árvores com topologia similares. O algoritmo de agrupamento de vizinhos foi ressaltado como o método de escolha a ser empregado nessas análises, devido a sua rapidez e facilidade para avaliar um número elevado de amostras.

Os métodos de distância devem ser empregados para avaliar um grupo de seqüências quando a distancia média entre elas for menor ou igual a 0.2 (RUSSO; MIYAKI; PEREIRA, 2001).

Na análise filogenética foram contempladas as seqüências de *Giardia* spp. obtidas nesse estudo associadas a um grupo de seqüências consagradas na literatura provenientes de outras áreas geográficas.

A árvore filogenética obtida neste estudo foi semelhante ao padrão geral estabelecido nos demais trabalhos realizados com amostras de outros continentes, com a divisão da espécie formalmente descrita como *G. duodenalis* em seis agrupamentos genéticos principais e distintos (MONIS; THOMPSON, 2003; READ; MONIS; THOMPSON, 2004). As seqüências oriundas dos isolados do mesmo genótipo foram virtualmente idênticas indicando que as diferenças genéticas no locus *gdh* parece ser fixa e estável nos isolados das várias espécie de hospedeiros, independente da sua origem geográfica.

Tal fato poderia ser explicado por uma teoria que propõe uma estrutura de reprodução clonal para os protozoários do gênero *Giardia*. O critério para estabelecer essa clonalidade foi quanto a ocorrência das características fundamentais da reprodução sexuada (segregação e recombinação) na população. Se estas características são aparentemente raras ou ausentes na população de *Giardia* spp. sugerem que a reprodução sexual esteja ausente, indicando uma predominância da reprodução clonal (TIBAYRENC; KJELLBERG; AYALA, 1990; TIBAYRENC; AYALA, 1991).

A reprodução clonal seria suficientemente predominante na população para gerar clones estáveis numa escala evolucionária de tempo, sendo assim, encontrados em diferentes áreas geográficas distantes.

A hipótese de clonalidade não exclui a possibilidade de uma ocasional recombinação genética, mas indica que a recombinação não seria importante o suficiente para alterar, de forma significativa, o padrão atuante da estrutura clonal.

Embora a teoria clonal não esteja totalmente elucidada, se a *Giardia* spp. possui uma estrutura clonal, a mais provável explicação para a origem das dicotomias, evidentes na espécie formalmente descrita *G. duodenalis*, seria devido aos efeitos ocasionados pela separação espacial de clones ancestrais, seja em um novo hospedeiro ou em áreas biogeográficas isoladas. A estrutura populacional contemporânea do grupo *G. duodenalis* pode ser vista como enraizada em uma série entrelaçada de clones antigos geneticamente isolados. O *Assemblage* E e o *Assemblage* F parece derivar de um clone enraizado no ancestral comum do agrupamento genético *Assemblage* A (EY et al., 1997).

Apenas poucas diferenças foram observadas nos isolados pertencentes ao *Assemblage* B, sendo todas as amostras agrupadas no genótipo BIV. Este resultado foi compartilhado por outros estudos que demonstram a pouca ou nenhuma identificação de amostras pertencentes ao genótipo BIII (READ; MONIS; THOMPSON, 2004; VAN DER GIESSEN et al., 2006), o qual parece constar de apenas dois isolados de origem humana provenientes da Austrália e da Holanda.

A maioria das informações a respeito da identificação molecular de amostras de *Giardia* spp. enfatizam apenas a distinção dos *Assemblages* (GRACZYK et al., 2002; APPELBEE et al., 2003; BERRILI et al., 2004; TROUT et al., 2005; ABE et al., 2005; PAPINI et al., 2006). Alguns autores ressaltaram uma dificuldade para realizar uma significativa diferenciação entre os genótipos (ABE et al., 2003; ITAGAKI et al., 2005; VAN DER GIESSEN et al., 2006). O presente estudo conseguiu obter uma informação detalhada e consistente que possibilitou a diferenciação dos genótipos, isto poderia ser em função da região estudada no gene *gdh* e do número de nucleotídeos seqüenciados; pois os estudos que não foi possível esta diferenciação utilizaram um número restrito de nucleotídeos (220 pb, 177 pb e 399 bp, respectivamente).

A partir dos resultados obtidos nesse estudo os agrupamentos genéticos *Assemblages* C e D, que pareciam ser espécie-específica para os cães, vão passar a ser específico de uma variedade restrita de hospedeiros, pois podem acometer outros canídeos além do cão doméstico.

Algumas seqüências avaliadas nesse estudo exibiram picos duplos no cromatograma gerado na leitura da reação de seqüenciamento, não podendo ser utilizada na íntegra para a análise molecular. Este fato parece ser bastante comum sendo constatado com freqüência nas amostras de *Giardia* spp. (HOPKINS et al., 1997; BERRILI et al., 2004; TRAUB et al., 2004; ITAGAKI et al., 2005). Uma possível explicação para este fato pode contemplar dois aspectos distintos, a ocorrência de uma heterozigose naquela posição específica do gene ou a ocorrência de uma infecção mista, ocasionada pela presença de dois *Assemblages* diferentes no mesmo hospedeiro.

As recentes observações científicas demonstram que a *Giardia* spp. possui um nível extremamente baixo de heterozigose de seqüência alélica (YU; BIRKY; ADAM, 2002). Nenhuma heterozigose de seqüência alélica foi detectada em mais que 6.5 KB do gene *tim* (triose fosfato isomerase) proveniente de sete isolados do subgrupo AI, sendo descrito um nível de heterozigose de seqüência alélica menor que 0,1 % (Mc ARTHUR et al., 2000).

Assim a totalidade dos estudos ressalta a ocorrência de infecção mista como a causa para este fenômeno. Essa explicação foi reforçada quando uma mesma amostra foi identificada como pertencente a *Assemblages* diferentes por marcadores genéticos distintos, sugerindo uma facilidade do marcador para amplificar um determinado *Assemblage*, comprovando a ocorrência de infecções mistas nos hospedeiros (READ; MONIS; THOMPSON, 2004; TRAUB et al., 2004).

Apesar do aumento de conhecimento promovido pelos estudos de identificação molecular com amostras de *Giardia* spp. de diferentes espécies de hospedeiros, o seu potencial zoonótico ainda remanesce sob intenso debate na atualidade (MONIS; THOMPSON, 2003; HUNTER; THOMPSON, 2005).

Os relatos científicos são unânimes em demonstrar que apenas o *Assemblage* A e o *Assemblage* B foram identificados nas amostras de humanos; ressaltando um maior interesse para inferências zoonóticas, nestes dois *Assemblages*.

O agrupamento *Assemblage* A reuniu amostras isoladas dos humanos e animais, porém com genótipos diferentes. O genótipo AI reuniu única e exclusivamente isolados humanos, enquanto o genótipo AI reuniu apenas amostras de animais (felídeos e bovinos). Esse resultado reforça a importância da identificação molecular do genótipo das amostras de *Giardia* spp. para inferências de transmissão entre as espécies.

No presente estudo o genótipo AI não estaria implicado num contexto zoonótico, mas a associação com os relatos da literatura (MONIS et al., 1996, THOMPSON, 2000), que enfatizam a sua ocorrência nos humanos ressalta a importância deste genótipo numa possível transmissão zoonótica.

O genótipo BIV reuniu amostras isoladas dos humanos e de espécies de animais bastante divergentes (bugio, chinchila e avestruz), sugerindo que uma maior importância deve ser atribuída a este subgrupo que revela um extraordinário potencial zoonótico e de transmissão inter-espécies.

A maioria dos estudos atuais determina uma maior predominância do *Assemblage* B nos isolados humanos (CACCIO et al., 2005) e os estudos que identificaram o genótipo envolvido enfatizam uma restrita ocorrência do genótipo BIII, sugerindo uma massiva representação do genótipo BIV no contexto atual.

Os demais *Assemblages* (C, D, E e F) parecem apresentar uma distinta preferência por hospedeiros específicos ou para uma variedade restrita de hospedeiros e provavelmente não representam um potencial zoonótico.

Os hospedeiros são provavelmente expostos a amostras de mais de um *Assemblage*, sendo provável que o *Assemblage* específico adaptado para aquele hospedeiro estabelece uma competição com os demais, principalmente em situações onde a frequência de transmissão é elevada (HOPKINS et al., 1997; O'HANDLEY et al., 2000; CACCIO et al., 2005). Assim, os cães, gatos e bovinos devem ser primariamente susceptíveis à infecção com os isolados dos seus respectivos *Assemblages* específicos, mas ocasionalmente, podem ser acometidos pelos *Assemblage* A ou *Assemblage* B e passam a representar um potencial zoonótico.

Em relação a ocorrência de *Giardia* spp. nos animais selvagens, muito pouca informação está disponível para aferir o papel desses animais como fonte de infecção para os humanos. Os animais selvagens são infectados provavelmente, a partir de fontes de água contaminada com matéria fecal de origem humana, servindo assim para amplificar a quantidade desse isolado contaminante (CACCIO et al., 2005; APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005).

Na atualidade um grande número de seqüências de DNA está sendo analisado, ampliando as informações disponíveis na literatura. O padrão geral que emerge deste conhecimento é que cada espécie de hospedeiro possui um *Assemblage* específico adaptado para as condições intrínsecas deste hospedeiro, mas em contrapartida, alguns *Assemblages* parecem apresentar uma baixa especificidade parasitária podendo acometer uma ampla variedade de hospedeiros.

A distância genética presente nos agrupamentos (*Assemblages*) que compõem a espécie formalmente descrita *G. duodenalis* foi estudada por Monis et al. (2003). O cálculo baseado nas diferenças de nucleotídeos presentes na seqüência do gene *gdh* estimou os valores de 0,01 a 0,02 (1 – 2%) para variação intra *Assemblages* e 0,07 a 0,3 (7 – 30%) entre os *Assemblages*.

A separação desses *Assemblages* é similar ou maior que aquela estabelecida entre as espécies de outros gêneros de microorganismos. A informação biológica disponível sugere que uma forte correlação exista entre algumas características bióticas (variedade de hospedeiro, taxa de crescimento *in vitro*) e a linhagem genética para a qual o isolado pertence.

As informações moleculares demonstram que a espécie formalmente descrita como *G. duodenalis* seria uma espécie complexa, compreendendo pelo menos sete principais *Assemblages*, sendo estes significativamente diferentes que devem representar espécies distintas (MONIS et al., 1999). Existe uma forte concordância por parte dos pesquisadores para rever a taxonomia atual estabelecida para a *Giardia* spp. e eleger alguns *Assemblages* específicos para o nível de espécie baseado na correlação entre as características filogenéticas e biológicas desses isolados.

Adicionalmente, outras seqüências não codificadoras ou microsátélites que apresentam uma taxa mais elevada de mutações poderia estabelecer uma subdivisão adicional na espécie *G. duodenalis* e auxiliar a elucidar a questão do potencial zoonótico.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no estudo das 133 amostras de *Giardia* spp. isoladas de humanos e animais, pode-se concluir que:

- A técnica de PCR padronizada neste estudo permite amplificar o gene *gdh* das amostras de *Giardia* spp. provenientes de uma ampla variedade de hospedeiros.
- As amostras de *Giardia* spp. isoladas no Brasil apresentam pelo menos seis linhagens genéticas principais representadas pelos *Assemblages* A, B, C, D, E e F.
- A relação filogenética estabelecida entre as amostras de *Giardia* spp. avaliadas nesse estudo é similar ao agrupamento estabelecido pelos isolados provenientes dos outros continentes.
- Os *Assemblages* C, D, E, F e o genótipo All apresentam uma elevada especificidade parasitária e infectam apenas um grupo específico de hospedeiro, enquanto os genótipos AI e BIV apresentam uma baixa especificidade parasitária e infectam várias espécies de hospedeiros.
- O genótipo AI pode ser transmitido entre diferentes espécies de animais.
- O genótipo BIV infecta o homem e os animais e oferece maior risco para a transmissão zoonótica.
- Considerável diversidade genética existe dentro da espécie formalmente descrita como *G. duodenalis*.

REFERÊNCIAS

ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 1, p. 29-33, 2003.

ABE, N.; KIMATA, I.; TOKORO, M. Genotyping of *Giardia* isolates from humans in Japan using the small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences. **Journal of Infectious Diseases**, v. 58, n. 1, p. 57-58, 2005.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p.447-475, 2001.

AMAR, C. F.; DEAR, P. H.; PEDRAZA-DIAZ, S.; LOOKER, N.; LINNANE, E.; MCLAUHLIN, J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 446-452, 2002.

ANDREWS, R. H.; ADAMS, M.; BOREHAM, P. F. L.; MAYRHOFER, G.; MELONI, B. P. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. **International Journal for Parasitology**, v. 19, n. 2, p. 183-190, 1989.

APPELBEE, A. J.; FREDERICK, L. M.; HEITMAN, T. L.; OLSON, M. E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 4, p. 289-294, 2003.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.

BARTMANN, A.; ARAÚJO, F. A. P. Freqüência de *Giardia lamblia* em cães atendidos em clínicas veterinárias de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1093-1096, 2004.

BECHER, K. A.; ROBERTSON, I. D.; FRASER, D. M.; PALMER, D. G.; THOMPSON, R. C. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 1-2, p. 1-9, 2004.

BECK, C.; ARAÚJO, F. A. P.; OLICHESK, A. T.; BREYER, A. S. Freqüência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo Método de Faust e cols. (1939) e pela Coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 126-130, 2005.

BENACHENHOU-LAFA, N.; FORTERRE, P.; LABEDAN, B. Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the archaeobacteria in the universal tree of life. **Journal Molecular Evolution**, v. 33, p. 335-346, 1993.

BERRILLI, F.; DI CAVE, D.; DE LIBERATO, C.; FRANCO, A.; SCARAMOZZINO, P.; ORECCHIA, P. Genotype characterisation of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 3, p.193-199, 2004.

BERTRAM, M. A.; MEYER, E.A.; LILE, J. D; MORSE, S. A. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. **Journal of Parasitology**, v. 69, n. 5, p. 793-801, 1983.

CACCIO, S. M.; THOMPSON, A. R. C.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.

CARVALHO, T. B.; CARVALHO, L. R.; MASCARINI, L. M. Ocorrência de enteroparasitas em creches de Botucatu (Estado de São Paulo, Brasil) com ênfase em *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* e *Enterobius vermicularis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 269-273, 2006.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Giardíase. In: Cimerman, B. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2. ed. São Paulo: Editora Ateneu, 2002. cap. 7, p. 28-33.

DENADAI, W. **Aspectos da prevalência de enteroparasitoses em crianças do bairro Santo André, Vitória – ES**. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J. Sem evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **Journal of Parasitology**, v. 73, n.3, p. 623-629, 1987.

ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J.; WELLS, C. L.; FEELY, D. E.; KNUDSON, L.; CAMPBELL, S. R.; VAN KEULEN, H.; JARROLL, E. L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 5, p. 717-724, 1990.

EY, P. L.; MANSOURI, M.; KULDA, J.; NOHÝNKOVÁ, E.; MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyls-specific and potentially zoonotic genotypes. **Journal Eukariotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 626-635, 1997.

FALEIROS, J. M. M.; GALLO, G.; SILVA, M. M. K; RAFUL, R.; NASORRI, A. R; PIPINO, L. F. R; JUNQUEIRA, R. B.; PINTO, P. L. S. Ocorrência de enteroparasitoses em alunos da escola pública de ensino fundamental do município de Catanduva (São Paulo, Brasil). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 243-247, 2004.

FARTHING, M. J. G. Giardiasis. In: GILLES, H. M. **Protozoal Diseases**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1999. cap. 10, p. 562-584.

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 35-54, 2000.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M.; DUBEY, J. P. Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 44-53, 2006

FUNADA, M. R.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; GENNARI, S. M. Frequência de ocorrência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2007 (no prelo).

FURNESS, B. W.; BEACH, M. J.; ROBERTS, J. M. Giardiasis surveillance – United States, 1992-1997. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 11, p. 1-13, 2000.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.

GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J.; BLASQUES, L. S. Frequência de ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Vet News**, n. 52, p. 10-12, 2001.

GRACZYK, T. K.; BOSCO-NIZEYI, J.; SSEBIDE, B.; THOMPSON, R. C.; READ, C.; CRANFIELD, M. R. Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (*Assemblage*) A infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 5, p. 905-909, 2002.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I. L.; FRANCO, M. F. *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. **Revista do instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 45-58, 1999.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HOMAN, W. L.; MANK, T. G. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 822-826, 2001.

HOMAN, W. L.; VAN ENCKEVORT, F. H. J.; LIMPER, L.; VAN EYS, G. J. J. M.; SCHOONE, G. J.; KASPRZAK, W.; MAJEWSKA, A. C.; VAN KNAPEN, F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. **Parasitology Research**, v. 78, n. 4, p. 316-323, 1992.

HOPKINS, R. M.; MELONI, B. P.; GROTH, D. M.; WETHERALL, J. D.; REYNOLDSON, J. A.; THOMPSON, R. C. A. Ribosomal RNA sequences reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal of Parasitology**, v. 83, n.1, p. 44-51, 1997.

HUBER, F.; BONFIM, T. C.; GOMES, R. S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1-2, p. 69-72, 2005.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1181-1190, 2005.

ITAGAKI, T.; KINOSHITA, S.; AOKI, M.; ITOH, N.; SAEKI, H.; SATO, N.; UETSUKI, J.; IZUMIYAMA, S.; YAGITA, K.; ENDO, T. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 283-287, 2005.

LALLO, M. A. Ocorrência de *Giardia* sp em cães da grande São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 16., 1994, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Congresso Brasileiro da Anclivepa, 1994. p. 37

LEIB, M. S.; ZAJAC, A. M. Giardiasis in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, v. 94, n. 9, p. 793-802, 1999.

MCARTHUR, A. G.; MORISSON, H. G.; NIXON, J. E. J.; PASSAMANECK, N. Q. E.; KIM, U; HINKLE, G.; CROCKER, M. K.; HOLDER, M. E.; FARR, R.; REICH, C. I.; OLSEN, G. E.; ALEY, S. B.; ADAM, R. D.; GILLIN, F. D.; SOGIN, M. L. The *Giardia* genome project data base. **FEMS Microbiology**, v. 189, p. 271-273, 2000.

MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; ABE, N. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from a human and calf in Japan. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 3, p. 337-340, 2005.

MAYRHOFER, G.; ANDREWS, R. H.; EY, P. L.; CHILTON, N. B. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*.

Parasitology, v. 111, n. 1, p. 11-17, 1995.

MCDONNELL, P. A.; SCOTT, K. G.; TEOH, D. A.; OLSON, M. E.; UPCROFT, J. A.; UPCROFT, P.; BURET, A. G. *Giardia duodenalis* trophozoites isolated from a parrot (*Cacatua galerita*) colonize the small intestinal tracts of domestic kittens and lambs.

Veterinary Parasitology, v. 111, n. 1, p. 31-46, 2003.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin.

Infection, Genetics and Evolution, v. 3, n. 1, p. 29-38, 2003.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 9, p. 1135-1144, 1999.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; MACKRILL, J.; KULDA, J.; ISAAC-RENTON, J. L.; EY, P. L. Novel lineages of *Giardia intestinalis* indentified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 7-19, 1998.

MONIS, P. T.; MAYRHOFER, G.; ANDREWS, R. H.; HOMAN, W. L.; LIMPER, L.; EY, P. L. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. **Parasitology**, v. 112, n. 1, p. 1-12, 1996.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 233-244, 2003.

MUNDIM, M. J. S.; SOUZA, S. Z.; HORTÊNCIO, S. M.; CURY, M. C. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 770-773, 2003.

NASH, T. E.; McCUTCHAN, T.; KEISTER, D.; DAME, J. B.; CONRAD, J. D.; GILLIN, F. D. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 1, p. 64-73, 1985.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, p. 27-32, 1980.

O'HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R. C. A. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from western Australia and western Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 193-200, 2000.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; FERRARI, T. B.; NUNES, L. C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 1-2, p. 19-27, 2002.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2004.

PAPINI, R.; CARDINI, G.; PAOLETTI, B.; GIANGASPERO, A. Detection of *Giardia* Assemblage A in cats in Florence, Italy. **Parasitology Research**, v. 100, n. 3, p. 653-656, 2006.

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 125-130, 2004.

READ, C. M.; WALTERS, J.; ROBERTSON, I. D.; THOMPSON, R. C. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 229-231, 2002.

REY, L. Métodos e técnicas usuais em parasitologia. In: REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 64, p. 787-801.

RUSSO, C. A. M.; MIYAKI, C.Y.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. 1. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001, cap. 10, p. 108-116.

SATURNINO, A. C. R. D.; NUNES, J. F. L.; SILVA, E. M. A. Relação entre ocorrência de parasitas intestinais e sintomatologia observada em crianças de uma comunidade carente de Cidade Nova, em Natal - Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, n. 2, p. 85-87, 2003.

SAUNBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the Neglected Diseases Initiative. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SOGAYAR, M. I. L.; CORREA, F. M. A. *Giardia* in dogs in Botucatu, São Paulo state, Brazil: A comparative study of canine and human species. **Revista de Ciências Biomédicas**, v. 5, p. 69-73, 1984.

SOGAYAR, M. I. L.; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Editora Ateneu, 2000, cap. 14, p. 107-113.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Researchs**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1259-1267, 2000.

THOMPSON, R. C. A. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 493-496, 2002.

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 15-35, 2004.

THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 210-213, 2000.

THOMPSON, R. C. A.; REYNOLDSON, J. A.; LYMBERY, A. J. **Giardia: from molecules to disease**. Cambridge: CAB International University Press, 1994, 394 p.

THOMPSON, R. C. A.; REYNOLDSON, J. A.; MENDIS, A. H. W. *Giardia* and giardiasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 71-160, 1993.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 7, p. 2414-2418, 1990.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitology Today**, v. 7, n. 9, p. 228-232, 1991.

TRAUB, R. J.; MONIS, P. T.; ROBERTSON, I.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R. C. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. **Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 253-262, 2004.

TROUT, J. M.; SANTIN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 3-4, p. 177-183, 2005.

TROUT, J. M.; SANTIN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 3-4, p. 179-186, 2004.

UCHÔA, C. M. A; LOBO, A. G. B; BASTOS, O. M. P; MATOS, A. D. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 97-101, 2001.

VAN DER GIESSEN, J. W.; DE VRIES, A.; ROOS, M.; WIELINGA, P.; KORTBEEK, L. M.; MANK, T. G. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 849-858, 2006.

VAN KEULEN, H.; FEELY, D. E.; MACECHKO, P. T.; JARROLL, E. L.; ERLANDSEN, S. L. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 294-300, 1998.

VAN KEULEN, H.; MACECHKO, P. T.; WADE, S.; SCHAAF, S.; WALLIS, P. M.; ERLANDSEN, S. L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 108, n. 2, p. 97-107, 2002.

VARGAS-MENDEZ, L. D. **Prevalência de *Giardia* em cães de Maringá, Paraná, Brasil**. 1993. 101 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

YU, L. Z.; BIRKY, C. W.; ADAM, R. D. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 2, p. 191-199, 2002.

APÊNDICE A - Amostras de cistos de *Giardia* spp. isoladas de amostras fecais de gatos e bovinos submetidas a caracterização genética - São Paulo - 2007

GATOS			
AMOSTRA	ORÍGEM	PROCEDÊNCIA	
F ₁	Não Domiciliado	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo – SP
F ₃	Domiciliado	Laboratório ABC	Santo André - SP
F ₄	Domiciliado	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo - SP
F ₅	Domiciliado	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo – SP
F ₆	Gatil	Laboratório FMV - UAM	São Paulo – SP
F ₇	Domiciliado	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo – SP
F ₈	Domiciliado	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo – SP
F ₁₀	Gatil	UIPA	São Paulo – SP
F ₁₁	Gatil	UIPA	São Paulo – SP
F ₁₂	Gatil	UIPA	São Paulo – SP
F ₁₃	Domiciliado	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo – SP
F ₁₄	Gatil	UIPA	São Paulo – SP
F ₁₅	Gatil	UIPA	São Paulo - SP
F ₂₀	Domiciliado	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo – SP
F ₂₁	Domiciliado	Laboratório ABC	Santo André - SP
F ₂₂	Domiciliado	Laboratório UAM	São Paulo - SP
F ₂₃	Domiciliado	Laboratório FMVZ - USP	Santos - SP
F ₂₄	Não Domiciliado	Centro Controle Zoonoses	São Paulo - SP
F ₂₅	Domiciliado	Laboratório IVI	São Paulo – SP
F ₂₆	Domiciliado	Laboratório IVI	São Paulo - SP
BOVINOS			
AMOSTRAS		PROCEDÊNCIA	
BV ₃		Laboratório FMVZ - USP	Pirassununga - SP
BV ₄		Laboratório FMVZ - USP	Pirassununga - SP
BV ₅		Laboratório FMVZ - USP	Pirassununga - SP
BV ₆		Laboratório FMVZ - USP	Morungaba – SP
BV ₇		Laboratório FMVZ - USP	Morungaba - SP

APÊNDICE A - Amostras de cistos de *Giardia* spp. isoladas de amostras fecais provenientes de animais submetidas a caracterização genética - São Paulo - 2007

BUGIOS - <i>Allouatta fusca</i>		
AMOSTRAS	PROCEDÊNCIA	
BG CEMAS	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo - SP
BG CCZ - I	CCZ	São Paulo - SP
BG CCZ - II	CCZ	São Paulo - SP
BG 40	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo - SP
BG 45	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo - SP
BG 46	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo - SP
BG 92	CCZ	São Paulo - SP
BG 93	CCZ	São Paulo - SP
BG 95	CCZ	São Paulo - SP
BG 96	CCZ	São Paulo - SP
BG 97	CCZ	São Paulo - SP
BG 99	CCZ	São Paulo - SP
CACHORRO DO MATO - <i>Cercocyon thous</i>		
AMOSTRAS	PROCEDÊNCIA	
CM 1	Laboratório FMVZ - USP	São Carlos - SP
CM 2	Laboratório FMVZ - USP	São Carlos - SP
ONÇA PINTADA - <i>Panthera onca</i>		
AMOSTRA	PROCEDÊNCIA	
ONÇA	Laboratório FMVZ - USP	Campo Grande - MT
CHINCHILA - <i>Chinchilla lanigera</i>		
AMOSTRAS	PROCEDÊNCIA	
CH 155	Laboratório FMV - UAM	Cotia - SP
CH 299	Laboratório FMV - UAM	Cotia - SP
CH 300	Laboratório FMV - UAM	Cotia - SP
AVESTRUZ - <i>Struthio camelus</i>		
AMOSTRAS	PROCEDÊNCIA	
AV ₁₃	Laboratório FMV - UAM	Atibaia - SP
AV ₁₇	Laboratório FMV - UAM	Atibaia - SP

APÊNDICE A - Amostras de cistos de *Giardia* spp. isoladas de amostras fecais de cães submetidas a caracterização genética - São Paulo - 2007

CÃES			
AMOSTRA	ORÍGEM	PROCEDÊNCIA	
C ₁	Domiciliado	Laboratório FMVZ - USP	São Paulo - SP
C ₂	Domiciliado	Laboratório FMVZ – USP	São Paulo – SP
C ₃	Domiciliado	Laboratório FMVZ – USP	São Paulo – SP
C ₆	Domiciliado	Laboratório FMVZ – USP	São Paulo – SP
C ₇	Não Domiciliado	CCZ	São Paulo - SP
C ₈	Domiciliado	Laboratório ABC	Santo André – SP
C ₉	Domiciliado	Laboratório ABC	Santo André - SP
C ₁₀	Domiciliado	Laboratório FMVZ – USP	São Paulo – SP
C ₁₁	Canil	Laboratório IVI	São Paulo – SP
C ₁₂	Não Domiciliado	CCZ	São Paulo – SP
C ₁₃	Domiciliado	Laboratório FMVZ – USP	Cabriúva – SP
C ₁₄	Não Domiciliado	CCZ	São Paulo – SP
C ₁₇	Não Domiciliado	CCZ	Jundiaí – SP
C ₂₀	Não Domiciliado	CCZ	Ibiúna – SP
C ₂₁	Domiciliado	Laboratório FMVZ – USP	São Paulo – SP
C ₂₃	Domiciliado	Laboratório FMVZ – USP	São Paulo – SP
C ₂₄	Não Domiciliado	CCZ	São Paulo – SP
C ₂₅	Não Domiciliado	CCZ	São Paulo – SP
C ₂₈	Não Domiciliado	CCZ	São Paulo – SP
C ₂₉	Não Domiciliado	CCZ	São Paulo – SP
C ₃₀	Domiciliado	Laboratório FMVZ – USP	São Paulo – SP
C ₃₁	Não Domiciliado	CCZ	São Paulo – SP
C ₃₂	Não Domiciliado	CCZ	São Paulo – SP
C ₃₄	Canil	Laboratório IVI	São Paulo – SP
C ₃₅	Canil	Laboratório IVI	São Paulo – SP
C ₃₆	Canil	Laboratório IVI	São Paulo – SP
C ₃₇	Domiciliado	Laboratório IVI	São Paulo – SP
C ₃₈	Domiciliado	Laboratório FMVZ – USP	São Paulo – SP
C ₃₉	Domiciliado	Laboratório IVI	São Paulo – SP
C ₄₀	Domiciliado	Laboratório IVI	São Paulo – SP
C ₄₂	Domiciliado	Laboratório IVI	São Paulo – SP

APÊNDICE A - Amostras de cistos de *Giardia* spp. isoladas de amostras fecais de humanos submetidas a caracterização genética - São Paulo – 2007

HUMANOS		
AMOSTRAS	PROCEDÊNCIA	
H ₁	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₂	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₃	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₄	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₅	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₆	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₇	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₈	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₉	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₁₀	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₁₁	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₁₂	Hospital Sanatorinhos	Vargem Grande - SP
H ₁₄	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₁₅	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₁₆	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₁₇	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₁₈	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₁₉	Laboratório Afip	Jundiaí - SP
H ₂₀	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₂₁	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₂₂	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₂₃	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₂₄	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₂₅	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₂₆	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₂₇	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₂₉	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₃₀	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₃₁	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₃₂	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₃₅	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₃₆	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₃₈	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₃₉	Laboratório Afip	Taubaté - SP
H ₄₀	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₄₁	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₄₂	Laboratório Afip	São Paulo - SP
H ₄₃	Laboratório Afip	São Paulo - SP