VALDIR AZEVEDO DOS SANTOS

Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana do Hospital Universitário – USP – São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da *beta-giardina (bg)*

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

VALDIR AZEVEDO DOS SANTOS

Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana do Hospital Universitário – USP – São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da *beta-giardina* (*bg*)

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw

Versão corrigida. A versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Valdir Azevedo dos.

Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana do Hospital Universitário – USP – São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da *beta-giardina* (*bg*) / Valdir Azevedo dos Santos. – São Paulo, 2011.

Orientador: Jeffrey Jon Shaw.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Diagnóstico de parasitas e de vetores.

Versão do título para o inglês: Molecular characterization of isolates of *Giardia* spp. from fecal samples of human origin of the University Hospital - USP – São Paulo, Brazil, by analysis of fragments of the gene encoding the *beta-giardin* (*bg*).

Descritores: 1. *Giardia* 2. Biologia molecular 3. Técnicas e procedimentos de laboratório 4. Doenças parasitárias I. Shaw, Jeffrey Jon II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0162/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Valdir Azevedo dos Santos.

Título da Dissertação: Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana do Hospital Universitário – USP – São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da *beta-giardina* (*bg*).

Orientador(a): Jeffrey Jon Shaw.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:

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) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 18 de junho de 2009.

PARECER 899/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 96ª reunião realizada em 16.06.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Inquérito epidemiológico e caracterização molecular de isolados de Giardia spp. provenientes de amostras fecais de origem humana do Hospital Universitário da USP - São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (gdh) e beta-giardina*".

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

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **16 de junho de 2010**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo Sr.
VALDIR AZEVEDO DOS SANTOS
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Ao meu pai Simpliciano Antônio dos Santos
(*in memorian*)

A minha mãe Lucilia Azevedo dos Santos
(*in memorian*)

Aos familiares e amigos pelo incentivo e
apoio constante para a minha formação.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por abrir as portas na minha vida pessoal e profissional e por colocar no meu convívio pessoas tão especiais que tornaram possível a realização desse sonho.

Ao Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw, pela orientação, ensinamentos, conselhos, amizade, paciência, minha eterna gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelos ensinamentos, conselhos, amizade e paciência, minha eterna gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Paulo Minani “in memorian” pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Sanazzaro, pela amizade, confiança e oportunidade de trabalho.

À Prof^a. Dr^a Irene Soares, ao Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, à Prof^a. Dr^a Renata Rosito Tonelli, pelos conselhos na minha qualificação.

Às secretárias da pós-graduação do ICB, Angela e Silvia, pela amizade, conselhos e incentivo.

À Sheila Oliveira, Camila Oliveira, Juliana Martins pela atenção, companheirismo e paciência em me ensinar técnicas de biologia molecular.

Ao funcionário Renato Caravieri, pela amizade, companheirismo, incentivo e apoio nas tarefas no Laboratório de Doenças Parasitárias III da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – USP.

Aos amigos Malheiros e Francis, pelo carinho e amizade.

Às amigas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Estela Galluci, Gisele Ayres, Iracema Barros, Karen Asano, Michelle Klein, Sueli Santos e Carolina Codorna, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do SLC-HU/USP Vânia, Fabiana, Ivo, Elaine, Luíz, Maria, Lilian, Maria Eni, João, Sueli, Iára, Lisinha, Elisa, Marlene e Carol (*in memorian*).

Às minhas irmãs e cunhados, Fátima, Marlene, Valdete, Arlindo, Aristides e Geraldo, por acreditarem em mim e fazerem parte da minha vida.

Às minhas sobrinhas e sobrinhos Cristiane, Vanessa, Crislaine, Alexandre, Victor e Ryan.

Ao meu filho Edgard e à minha esposa Marli.

.Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

“Dê a quem você ama: asas para voar,
raízes para voltar e motivos para ficar”

Dalai Lama

RESUMO

SANTOS, V. A. **Caracterização molecular de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana do Hospital Universitário – USP – São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da *beta-giardina* (*bg*).** 2011. 54 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A giardíase é uma doença entérica de alta prevalência particularmente nos países em desenvolvimento. Diferentes espécies foram descritas em função de seus hospedeiros. A *G. duodenalis* é a espécie que parasita não só o homem, mas também animais domésticos e selvagens. Recentemente, com a aplicação de técnicas moleculares, foi possível identificar sete diferentes agrupamentos sendo que cada um deles tem especificidade por determinadas espécies de hospedeiros. Estes agrupamentos não podem ser identificados por meio de técnicas microscópicas. O conhecimento dos agrupamentos encontrados nas populações podem fornecer informações importantes que podem ajudar as autoridades de saúde pública compreender os fatores de riscos relacionados às infecções intestinais. No presente estudo, amostras de fezes enviadas ao Laboratório de Parasitologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo foram examinados para enteroparasitoses. Um total de 6.717 amostras de fezes analisadas pelos métodos de concentração Hoffman, Ritchie e Sheather com positividade 12,5% para um ou mais enteroparasitos. *Strongyloides stercoralis* foi o helminto mais comum, encontrados em 50 indivíduos. *G. duodenalis*, o protozoário patogênico mais comum e estava presente em 97 indivíduos, sendo que 53,6% das infecções por *Giardia*, as fezes eram normais e apenas 9,2% estavam associados com fezes diarréicas. O DNA foi extraído das 97 amostras positivas para *Giardia*. Numa reação em cadeia da polimerase (PCR) o fragmento esperado de DNA foi amplificado em 59 amostras. Não houve associação entre o número de cistos e PCRs. Das amostras que foram caracterizadas com sucesso 38 pertencia ao Agrupamento A e 21 ao Agrupamento B. O conjunto do agrupamento A, 24 eram do genótipo All, 6 eram do All-3, outros 2 foram como prováveis All-3 e genótipos poderiam ser determinado tanto como AI ou All. Dos 21 pertencentes ao agrupamento B, 7 tinham sequências heterogênicas com picos duplos que não incomuns com parasitas deste grupo. Devido ao pequeno número de amostras diarréicas, não foi possível associar qualquer conjunto particular com esta patologia.

Palavras-chave: *G. duodenalis*. β -*giardina*. Biologia molecular.

ABSTRACT

SANTOS, V. A. Molecular characterization of *Giardia* spp., found in human faecal samples examined at the University of São Paulo's University Hospital, São Paulo, Brazil based on point mutations of the gene coding for beta-giardin (bg). 2011. 54 p. Masters Thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

Giardiasis is an enteric disease that is more frequent in developing countries. Different species have been described from different hosts, and of these *Giardia duodenalis* occurs in man and domestic and wild animals. Recently molecular techniques have been used to identify 7 different assemblages which show varying degrees of host specificity. These assemblages cannot be identified using standard microscopic techniques. Knowledge of the assemblages found in populations can provide important information that can help public health authorities understand the risk factors related to intestinal infections. In the present study faecal samples submitted to the Parasitology Laboratory of the University of São Paulo's University Hospital were examined for enteroparasitic infections. A total of 6,717 faecal samples were analysed by the Hoffman, Ritchie and Sheater concentration methods and 12.5% were positive for one or more enteroparasites. The commonest helminth was *Strongyloides stercoralis* which was found in 50 individuals. The commonest pathogenic protozoan was *G. duodenalis* which was present in 97 individuals. 53.6% of the *Giardia* infections were found in normal stools and only 9.2% were associated with diarrheic stools. DNA was extracted from all 97 *Giardia* positive samples. In a polymerase chain reaction (PCR) the expected fragment was amplified from the DNA of 59 samples. There was no association with the number of cysts and positive PCRs. Of the samples that were successfully characterized 38 belonged to Assemblage A and 21 to Assemblage B. Of those belonging to Assemblage A 24 were genotype AII, 6 were AIII, another 2 were also possible AIII and the genotypes of 2 could not be determined as either AI or AII. Of the 21 Assemblage B samples 7 had heterogenic sequences with two peaks which are not uncommon with parasites of this group. Due to the small sample size of diarrheic stools it was not possible to associate any particular assemblage with this pathology.

Key words: *Giardia duodenalis*; β -giardin; molecular characterization; point mutations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Protozoários patogênicos através de veiculação hídrica adaptado: Karanis et. al., 2007.	16
Figura 2 - Ciclo de vida do parasito <i>Giardia</i> spp. Adaptado de: Centers for Disease Control and Prevention, 2011.....	17
Figura 3 - Quatro principais ciclos de transmissão de <i>G. duodenalis</i>	20
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos amplificados a partir do gene <i>bg</i>	40
Figura 5 – Agrupamento A – identificação dos genótipos de <i>G. duodenalis</i> , através do gene <i>bg</i> , baseado na análise de SNPs.	41
Figura 6 – Agrupamento B – identificação dos genótipos de <i>G. duodenalis</i> , através do gene <i>bg</i> , baseado na análise de SNPs.	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies de <i>Giardia</i> spp. reconhecidas atualmente e seus respectivos hospedeiros.....	15
Quadro 2 – Agrupamentos de <i>G. duodenalis</i> e seus respectivos hospedeiros	23
Quadro 3 – Parasitos encontrados	33
Quadro 4 – Prevalência percentual de cada helminto em relação ao total de helmintos observados.	34
Quadro 5 – Prevalência percentual de cada protozoário em relação ao total de protozoários observados.	35
Quadro 6 – Dados das amostras positivas para <i>G. duodenalis</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Prevalência dos casos de *G. duodenalis* por sexo e faixa etária..34

Tabela 2 – Prevalência dos casos de *G. duodenalis* por faixa etária e agrupamento
..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>β giardina</i>	beta-giardina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	ácido etileno diamoni tetracético
ef1α	fator de elongação 1- alfa
<i>g</i>	gravidade terrestre
<i>Gdh</i>	glutamato desidrogenase
HCl	ácido clorídrico
M	Molar
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNP	single nucleotide polymorphism
<i>SSU rRNA</i>	subunidade ribossômica menor
<i>tpi</i>	triose fosfato isomerase
Tris	hidroximetil aminometano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	<i>25</i>
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	<i>25</i>
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Amostras.....	26
3.2 Processamento das Amostras	26
3.2.1 <i>Triagem inicial</i>	<i>26</i>
3.2.2 <i>Pesquisa dos cistos de G. duodenalis.....</i>	<i>27</i>
3.2.3 <i>Avaliação semi-quantitativa dos cistos de G. duodenalis.....</i>	<i>27</i>
3.2.4 <i>Recuperação dos cistos de G. duodenalis</i>	<i>28</i>
3.2.5 <i>Extração de ácidos nucléicos</i>	<i>28</i>
3.2.5.1 <i>Rompimento dos cistos por choque-térmico</i>	<i>28</i>
3.2.5.2 <i>Purificação e precipitação</i>	<i>28</i>
3.2.6 <i>Reação em cadeia pela polimerase (PCR)</i>	<i>29</i>
3.2.6.1 <i>Gene codificador da beta-giardina</i>	<i>29</i>
3.2.6.2 <i>Visualização e purificação do produto amplificado.....</i>	<i>30</i>
3.2.6.3 <i>Reação de sequenciamento</i>	<i>30</i>
3.2.6.4 <i>Precipitação do DNA amplificado</i>	<i>31</i>
3.2.6.5 <i>Eletroforese de sequenciamento</i>	<i>32</i>
3.2.7 <i>Análise das sequências.....</i>	<i>32</i>
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Resultados do exame protoparasitológico	33
4.2 Pesquisa dos cistos de G. duodenalis	39
4.3 Análise do gene codificador da beta giardina (bg)	40
5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO – Certificado do Hospital Universitário.....	53

1 INTRODUÇÃO

Giardia é um parasito flagelado que causa giardíase em humanos, animais domésticos e selvagens. É uma das causas mais comuns de diarreia por protozoários no mundo. Acomete principalmente crianças nos países em desenvolvimento, elevando os índices de morbidade. Este organismo peculiar tem atraído muito interesse não só devido a sua importância médica, mas também veterinária (SPRONG et al., 2009; THOMPSON et al., 2004).

Inicialmente, a *Giardia* foi descoberta por Antony Van Leeuwenhoek em 1681, quando examinava suas próprias fezes diarreicas em um simples aparelho manual de aumento construído por ele mesmo. Em 1859, o parasito foi descrito detalhadamente por Wilhelm Duszán Lambl, que encontrou o protozoário nas fezes diarreicas de criança, e o nomeou de *Cercomonas intestinalis* (LAMBL, 1859¹ apud ADAM, 2001).

Posteriormente, em 1875, *C. intestinalis* foi observado em coelhos, sendo somente em 1882 que o termo para o gênero *Giardia* foi criado (DAVAINE, 1875² apud MONIS et al., 2009). Em 1882, Kunstler observou o flagelado no intestino de girinos e o denominou *Giardia agilis*, em homenagem ao biólogo francês Alfred Giard (KUNSTLER, 1882³ apud MONIS et al., 2009).

De acordo com a descoberta do parasito no hospedeiro, numerosas espécies de *Giardia* foram sendo descritas. Filice, em 1952, publicou um estudo no qual sugeria que apenas três espécies deveriam ser reconhecidas de acordo com critérios morfológicos: *Giardia agilis* parasito de anfíbios; *Giardia muris* parasito de roedores e *G. duodenalis* (sinonímia: *G. intestinalis* e *G. lamblia*), parasito de diversas espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos (FILICE, 1952⁴ apud THOMPSON et al., 2000).

Em 1987, foi descrito a *Giardia psittaci*, como parasito de pássaros, especialmente periquitos. Logo depois, foi descrita a *Giardia ardeae*, também parasito de pássaros, porém, em especial, de garça azul (ERLANDSEM e

¹ LAMBL, W. Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. **Vierteljahrsschr. Prakst. Heikunde**, v. 61, p. 1-58, 1859.

² DAVAIN, C. Monadiens. **Dictionnaires encyclopedique des sciences medicales**, v. 9, 1875.

³ KLUSTER, J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. **C. R. Seances Soc. Biol. Fil.**, v. 95, p. 347-349, 1882.

⁴ FILICE, F. P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory. **Univ California Publ Zool**, v. 57, p. 53-146, 1952.

BEMRICK, 1990), e a *Giardia microti*, encontrada em roedores *Microtus ochrogaster* e *Ondatra zibethicus* (VAN KEULEN et al., 1998).

Atualmente, os organismos do gênero *Giardia* são classificados como protozoários flagelados pertencentes ao Reino Protista, Filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora e a Ordem Diplomonadida, sendo considerado o principal grupo de parasitos da Família Hexamitidae (THOMPSON et al., 2000). O quadro 1 reúne as espécies de *Giardia* reconhecidas atualmente e seus respectivos hospedeiros.

Quadro 1 – Espécies de *Giardia* spp. reconhecidas atualmente e seus respectivos hospedeiros.

Espécies	Hospedeiro
<i>G. duodenalis</i>	Homens e mamíferos domésticos e selvagens
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores

Fonte: Adaptado de Thompson, 2004

Giardia spp. é um protozoário eurixeno, de ciclo biológico monoxeno direto, que apresenta duas formas evolutivas: o trofozoíto e o cisto (MONIS e THOMPSON, 2003).

Os **trofozoítos** apresentam dimensões de 12 a 15 µm de comprimento por 6 a 8 µm de largura, simetria bilateral, formato de pêra e possuem dois núcleos, um par de axonemas, um par de corpos parabasais, disco adesivo ou disco suctorial e quatro pares de flagelos. São encontrados no trato intestinal do hospedeiro na forma vegetativa. Podem ser eliminados nas fezes diarréicas, mas não sobrevivem e não são capazes de infectar um novo hospedeiro (THOMPSON, 2004).

Os **cistos** são elipsóides ou ovóides e medem de 8 a 14 µm de comprimento e 7 a 10 µm de largura. Apresentam membrana cística, dois a quatro núcleos, dois pares de corpos parabasais e axonemas. São encontrados nas fezes formadas, pastosas e também diarréicas, tanto do hospedeiro como no meio ambiente. Podem permanecer viáveis por até 60 dias na superfície da água, e resistir aos processos

comuns de tratamento da água potável destinada ao consumo humano. Sendo assim, a ingestão de água com dejetos fecais contendo esta forma parasitária, é uma das principais via de transmissão e disseminação da giardíase (ROBERTSON et al., 2010; MONIS e THOMPSON et al., 2003).

Dentre os surtos epidêmicos (n=325) relatados ao redor do mundo, associados à transmissão de protozoários patogênicos através da veiculação hídrica, registrados principalmente na América do Norte e Europa, em 40,6% dos surtos, estavam relacionados à contaminação de água potável por cistos de *G. duodenalis*, os outros parasitas encontrados foram: *Cryptosporidium* spp em 50,8%, *Entamoeba histolytica* em 2,8%, *Cyclospora cayetanensis* em 1,8%, *Toxoplasma gondii* em 0,9%, *Isospora belli* em 0,9%, *Blastocystis* spp em 0,6% e outros em 0,3% (Figura 1) (KARANIS et al.; 2007).

Figura 1 – Protozoários patogênicos através da veiculação hídrica.
Fonte: Adaptado de Karanis et al., 2007.

Em um estudo realizado na Espanha por Carmena et al. (2007), foram analisadas amostras de água de torneira (n=82), água não tratada (n=31) e tratada (n=26) de pequenas estações de tratamento de água. Os métodos de tratamento utilizados foram o de cloração e/ou filtração rápida. Os resultados foram positivos para cistos de *Giardia* em 26,8% em água de torneira, 42,5% em água não tratada e 19,2% em água tratada.

A infecção no hospedeiro é iniciada quando o cisto é transmitido de forma direta, pelo contato pessoa-pessoa, ou indireta pela via fecal-oral, principalmente por alimentos ou água contaminados.

Após a ingestão do cisto, o desencistamento é iniciado no meio ácido do estômago e completado no duodeno e jejuno. Cada cisto libera dois trofozoítos que se aderem à parede do intestino e passam a se alimentar por pinocitose, e a se reproduzir assexuadamente por divisão binária. Isto pode levar a alguns sintomas como diarreia e má absorção (CACCIÒ et al., 2005; THOMPSON et al., 2000).

No jejuno, em direção ao cólon, alguns trofozoítos transformam-se em cistos. Em seguida são eliminados de maneira intermitente nas fezes do hospedeiro, permanecendo no ambiente e dando continuidade ao ciclo biológico ao infectar um novo hospedeiro (Figura 1) (ADAM, 2001; MONIS e THOMPSON., 2003; ROBERTSON et al., 2010).

Um indivíduo infectado pode liberar até 2×10^6 cistos por grama de fezes. A quantidade necessária para causar infecção é de 10 a 100 cistos, e o período de incubação pode variar entre 3 a 25 dias (SMITH et al., 2006).

Figura 2 - Ciclo de vida do parasito *Giardia* spp.

Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2011. Acessado em 11 de junho de 2011.

As manifestações clínicas da giardíase são bastante variáveis, podendo haver portadores assintomáticos, que atuam como importante reservatório na disseminação do parasito. Os sintomas mais frequentes são diarreia aguda ou crônica, desidratação, dor abdominal, náuseas, vômitos, flatulência e perda de peso. (CACCIÒ e RYAN., 2008; SAVIOLI et al., 2006). A severidade da doença é determinada pelo número de cistos ingeridos, virulência do parasito, idade, estado nutricional e imunológico do hospedeiro.

A diarreia é a manifestação mais comum, podendo ser aguda, intermitente ou crônica e autolimitada ou persistente. As fezes pastosas ou diarreicas são malcheirosas e podem conter muco e/ou gordura, mas raramente pus ou sangue (CACCIÒ et al., 2008; FAUBERT, 2000; SCOTT et al., 2002; REY.2008).

A giardíase tem a sua maior incidência entre indivíduos mais jovens, principalmente entre os grupos populacionais que apresentam condições de higiene precárias, e em instituições fechadas como, por exemplo, creches e orfanatos (MACHADO et al., 1999; MOHAMMED-MAHDY et al., 2009).

Em setembro de 2004 a *giardíase* foi incluída na “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da Organização Mundial da Saúde, que tem como objetivo buscar estratégias de controle para doenças que ocorrem principalmente nos países em desenvolvimento (SAVIOLI et al., 2006).

A prevalência de giardíase humana é de 2 a 7% na Europa e América do Norte, podendo atingir valores como 40% nos países em desenvolvimento. A sua distribuição é global, contando com 200 milhões de casos sintomáticos na Ásia, África e América Latina, com a incidência de 500 mil novos por ano (SOUSA et al., 2006; THOMPSON; MONIS, 2004; WHO, 1996). Valores de prevalência próximos aos referidos acima foram reportados por Almeida e colaboradores que relataram valores entre 2 e 5% em países desenvolvidos e de 20 e 30% em países em desenvolvimento para essa parasitose (ALMEIDA et al., 2006).

Pesquisas recentes demonstraram a presença deste parasita em crianças de vários Estados brasileiros. Estudos sobre a prevalência de enteroparasitas em creches da cidade de Botucatu, São Paulo, demonstrou que 53,4% das crianças analisadas apresentavam positividade para algum parasito, sendo que aproximadamente 26,9% delas eram portadoras de *G. duodenalis* (DE CARVALHO et al., 2006).

Mascarini e Donalisio (2006) realizaram estudos em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. Constataram que *G. duodenalis*, apresentou diferença quanto à sua distribuição dentro das famílias com alta e baixa distribuição de renda, sendo maior em famílias de baixo poder aquisitivo, assim como entre as crianças cujas mães possuíam baixo nível de escolaridade. A prevalência foi maior na faixa etária entre 2 a 6 anos do que na faixa etária de 0 a 2 anos.

Pittner et al. (2007) realizaram estudos sobre a prevalência de enteroparasitoses em escolares do estado do Paraná e *G. duodenalis* foi detectada em 50,73% das amostras de fezes.

No Rio de Janeiro, pesquisadores verificaram a frequência de enteroparasitos em 218 crianças com diarreia aguda e desidratação, sendo que *G. duodenalis* foi detectada em 4,7% das amostras fezes (CARVALHO-COSTA et al., 2007).

Pereira et al. (2007) determinaram a prevalência de *G. duodenalis* em crianças internadas com diarreia em hospitais de Goiânia (GO), onde foi detectada positividade em 9,9% das amostras de fezes. Em Minas Gerais, Machado et al. (2008), verificaram a ocorrência de *G. duodenalis* em 27,5% das fezes das crianças avaliadas. Matos et al. (2008) realizaram estudo transversal na estado da Bahia e detectaram *G. duodenalis* em fezes de 13,5% das 629 crianças participantes.

Em Presidente Bernardes (SP), Tashima et al. (2009), realizaram uma pesquisa com crianças na idade pré-escolar, e detectaram *G. duodenalis* em 16% das amostras de fezes. Foram analisadas também amostras de fezes de familiares das crianças e dos funcionários da creche. Algumas mães e irmãos eram portadores da parasitose. No entanto, com a aplicação da técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), que permite o estudo de acordo com grupos genéticos, foi possível concluir que as crianças provavelmente haviam sido infectadas durante a permanência na creche, pelo contato interpessoal, já que a maioria dos casos foi agrupado em um dos três grupos genéticos encontrados, e os isolados dos familiares nos outros dois grupos genéticos.

Por fim, um grupo de pesquisadores em Uberlândia (MG) ao analisar amostras de fezes de 133 crianças que frequentavam creche, detectaram *G. duodenalis* em 19,2% delas (GONÇALVES et al., 2011).

A *G. duodenalis* tem sido considerada um parasito re-emergente devido ao seu crescente papel em surtos de diarreia em crianças pré-escolares, e pelas altas taxas desse protozoário em animais como bezerros, cães, gatos e animais silvestres (THOMPSON et al., 2000).

A aplicação de técnicas moleculares em estudos epidemiológicos mostrou a existência de quatro ciclos de transmissão do protozoário (figura 2). A interação entre os ciclos poderia ocasionar uma zoonose (HUNTER e THOMPSON, 2005; MONIS et al., 2009).

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

Figura 3 - Quatro principais ciclos de transmissão de *G. duodenalis*.
Fonte: Adaptado de Monis et al.; 2009.

Hunter e Thompson (2005), revisaram estudos de casos clínicos, realizados no início da década de 90 relacionados a giardíase, sendo oito em países desenvolvidos. Nestes, observaram que os eventos mais frequentes associados à parasitose eram: viagens, natação em águas superficiais, ingestão de água

contaminada e contato com crianças que usavam fraldas. Nos cinco trabalhos realizados em países em desenvolvimento, os autores verificaram que os resultados apontaram a falta de saneamento básico e higiene pessoal, como os principais indicadores de risco para a giardíase. No geral, tais resultados sugerem que a transmissão zoonótica não é a principal maneira de disseminação da giardíase.

O método de diagnóstico para a giardíase em amostra de fezes é a microscopia, através do exame direto ou técnicas de concentração com a sensibilidade estimada entre 50 e 70%. A vantagem dessa técnica é que permitir detectar vários parasitas ao mesmo tempo. Entretanto, a sensibilidade do exame depende da habilidade (experiência) do microscopista ((BURKE et al., 1975; JOHNSTON et al., 2003; REY, 2008; SCHUURMAN et al., 2007).

Além da microscopia, métodos imunológicos baseados na coloração com anticorpos fluorescentes e ensaios imunoenzimáticos têm sido utilizados na rotina laboratorial no diagnóstico dessa parasitose (MANK et al., 1997; JOHNSTON et al., 2003; SCHUURMAN et al., 2007).

Staat et al. (2011), realizaram estudo com amostras de fezes de 730 crianças provenientes de adoção internacional nos Estados Unidos, dando ênfase a importância das amostras seriadas (1 a 3 amostras coletadas com intervalo de 48 a 72 horas), no intuito de promover o aumento na possibilidade de identificação do parasita. Detectaram *G. duodenalis* em 19% das amostras. Nesse mesmo estudo realizaram exames pareados entre o teste parasitológico (TP) e a fluorescência direta (DFA). Os autores concluíram que, quando a fluorescência direta (DFA) foi considerada como método padrão ouro, o teste parasitológico (TP) teve 83% de sensibilidade e 99% de especificidade e, quando invertido, ou seja, o teste parasitológico (TP) como método padrão ouro, a fluorescência direta (DFA) teve 93% de sensibilidade e 96% de especificidade.

A taxonomia da *G. duodenalis* ainda está sendo discutida. Geralmente é aceita como uma espécie complexa, indistinguível morfologicamente, mas passível de diferenciação por meio da aplicação de ferramentas moleculares, em sete agrupamentos (*assemblages*) distintos, classificados de A a G (CACCIÒ et al., 2005; THOMPSON e MONIS, 2004).

Até hoje, apenas os agrupamentos A e B têm sido detectados em humanos e em outros mamíferos, sendo considerados potencialmente zoonóticos (APPELBEE

et al., 2005; LALLE et al., 2005; SOUZA et al., 2007; SPRONG et al., 2009; VOLOTAO et al., 2007).

Agrupamento A é um agrupamento cujos isolados podem ser divididos em três diferentes subgrupos, denominados *sub-assemblages*: **AI**, abrangendo um conjunto de amostras provenientes de humanos e animais; **AII**, consistindo inteiramente de isolados de origem humana; **AIII**, recentemente reportado apenas em animais ungulados (CACCIÒ et al., 2008 ;CACCIÒ e RYAN, 2008; THOMPSON et al., 2000, 2004).

Agrupamento B compreende principalmente os subgrupos BIII e BIV, abrangendo isolados predominantemente humanos com algumas amostras de origem animal (MONIS et al., 1999; MONIS e THOMPSON, 2003; THOMPSON, 2004). Porém, alguns autores não confirmam essa subdivisão (SOUZA et al., 2007; WIELINGA e THOMPSON, 2007; VAN DER GIESSEN et al., 2006).

Agrupamentos C e D são detectados em cães, coiotes e ratos domésticos (APPELBEE et al., 2005) e o agrupamento E, nomeado também de genótipo *livestock*, é encontrado em bovinos, porcos, carneiros, cabras e alpacas (MONIS e THOMPSON, 2003; THOMPSON e MONIS, 2004).

Agrupamento F é isolado somente de gatos domésticos (APPELBEE et al., 2005) e o agrupamento G é encontrado apenas em ratos domésticos (MONIS e THOMPSON, 2003; THOMPSON e MONIS, 2004).

Recentemente o agrupamento H encontrado em animal marinho (foca cinzenta) (NESSELQUIST et al., 2010). O quadro 2 mostra os oito agrupamentos de *G. duodenalis* e seus respectivos hospedeiros.

Quadro 2 – Agrupamentos de *G. duodenalis* e seus respectivos hospedeiros

Genótipo	Hospedeiro
Agrupamento A	Humanos, primatas, animais de produção, cavalos, cães, gatos, porcos, veado, alce e castores
Agrupamento B	Humanos, primatas, animais de produção, cavalos, cães, coiotes, chinchilas, castores e ratos.
Agrupamentos C e D	Cães, coiotes e lobos
Agrupamento E	Bovinos, caprinos, suínos e alpacas
Agrupamento F	Gatos.
Agrupamento G	Rato doméstico
Agrupamento H	Foca cinzenta

Fonte: Adaptado de Cacciò; Sprong, 2010; Nesselquist et al., 2010

A caracterização molecular dos cistos de *G. duodenalis* vem sendo amplamente utilizada em amostras clínicas e ambientais para auxiliar na taxonomia do parasito e em estudos epidemiológicos da infecção (MONIS et al., 1998; SPRONG et al., 2009).

A maioria dos estudos tem sido realizado por meio da análise dos seguintes genes: *subunidade ribossômica menor (SSU rRNA)*, *beta-giardina (bg)*, *glutamato desidrogenase (gdh)*, *fator de alongação 1- α (ef1 α)*, *triose fosfato isomerase (tpi)*, *GLORF-C4 (C4)* e, mais recentemente, região do espaço *rRNA intergenômico* (CACCIÒ et al., 2008; CACCIÒ e RYAN, 2008; SPRONG et al., 2009).

No Brasil, ainda são escassos os estudos relacionados à identificação molecular de *Giardia* spp. em amostras clínicas. São Paulo e Rio de Janeiro são os estados que realizaram mais pesquisas nessa área até o momento (SOUZA et al., 2007; VOLOTAO et al., 2007). Os resultados das pesquisas nesses estados são conflitantes. As amostras de origem humana do Rio de Janeiro não apresentaram o agrupamento B, apenas os agrupamentos AI e AII. Em São Paulo, foram isolados apenas os agrupamentos AII e B e, nas amostras de animais de companhia (cães e gatos), apenas os gatos apresentaram potencial de eliminação de genótipos zoonóticos. Somente nestes animais o agrupamento AI foi detectado, e no caso do Rio de Janeiro, foram encontrados apenas cães eliminando esse agrupamento.

A variação da predominância dos agrupamentos de *G. duodenalis* em determinadas áreas geográficas pode ser explicada pela diferença na dinâmica de transmissão do protozoário (MOHAMMED-MAHDY et al., 2009).

São raros os estudos que determinam a relação entre os agrupamentos do parasita com os sintomas clínicos da giardíase, mas tais pesquisas fornecem dados importantes, já que, de acordo com alguns autores há evidências que os agrupamentos A e B diferem em relação à virulência (MOHAMMED-MAHDY et al., 2009; THOMPSON, 2004).

Na caracterização molecular de *Giardia* spp., o número de marcadores utilizados nas análises é de suma importância. A utilização de apenas um marcador genético deve ser avaliada com cautela. Ao analisar amostras fecais de cães e gatos, Read et al., (2004) encontraram diferenças entre os resultados dos mesmos isolados, quando genotipados com um ou dois marcadores moleculares. Esses resultados extremamente importantes, uma vez que, alguns agrupamentos foram identificados como não zoonóticos (agrupamento D) quando o locus *SSU rRNA* foi utilizado e como potencialmente zoonóticos (agrupamento BIV) com o emprego do locus *gdh*. Apesar da importância de usar no mínimo, dois marcadores, nesse estudo, só foi possível usar um marcador a *beta-giardina*.

Em relação à diversidade molecular em *Giardia* spp., é geralmente descrito por diferentes grupos de pesquisadores a alta prevalência de sequências heterogêneas, caracterizadas por picos duplos de nucleotídeos em posições específicas, reveladas pela análise dos cromatogramas obtidos com produtos de PCR após sequenciamento automático (CACCIÒ et al., 2008; LEBBAD et al., 2008; LALLE et al., 2009; SPRONG et al., 2009). Essa heterogeneidade presente em sequências gênicas de *G. duodenalis*, pode ser atribuída a duas possíveis causas: infecções mistas verdadeiras, caracterizadas pela presença de cistos geneticamente distintos em uma única amostra (cada cisto hospedando uma variante da sequência heterogênea) ou heterozigose de sequência alélica (ASH), onde cada organismo pode hospedar simultaneamente as duas variantes (LALLE et al., 2005; SPRONG et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência de enteroparasitoses em amostras de fezes de indivíduos da comunidade atendida no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP) por meio da utilização das técnicas de Ritchie e Hoffman modificado e Biologia Molecular.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Determinar a positividade de enteroparasitoses em amostras de fezes de indivíduos da comunidade atendida no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP) por meio da utilização das técnicas de Ritchie e Hoffman modificado.

2.2.2 Determinar a prevalência de cada espécie de parasito encontrado frente ao total de amostras positivas.

2.2.3 Avaliar a variabilidade genotípica de isolados de *G. duodenalis* presentes nas amostras, pela análise de fragmentos do gene codificador *beta-giardina* (*bg*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram analisadas amostras de fezes de indivíduos atendidos no HU/USP (comunidade USP e moradores do bairro Butantã e adjacência atendidos nos postos de saúde da região) que tinham solicitação médica para a realização do exame protoparasitológico. Normalmente esse tipo de solicitação tem como finalidade a investigação clínica quando há suspeita da ocorrência de parasitose em quadros sintomáticos ou não (exame de exclusão) ou como exame de rotina como ocorre, por exemplo, no protocolo de exames com finalidades trabalhistas (admissionais, demissionais ou periódicos anuais).

O perfil socioeconômico dos indivíduos incluídos neste estudo é variado já que esse grupo engloba estudantes e funcionários da USP e moradores da região do Butantã, que abriga famílias de classe alta, média e baixa.

Sexo e idade não foram fatores de inclusão ou exclusão neste estudo.

Um total de 6.717 amostras de fezes foram coletadas e entregues no Setor de Coleta do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP (SLC/HU/USP), no período de janeiro 2009 a março de 2011.

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (ANEXO) e à Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo tendo sido aprovado por ambos.

3.2 Processamento das Amostras

3.2.1 Triagem inicial

Inicialmente, as amostras foram processadas pelas técnicas de Hoffman modificado e Ritchie (HOFFMAN et al., 1934; LUTZ, 1919; RITCHIE, 1948), habitualmente realizadas no Setor de Parasitologia do Serviço de Laboratório Clínico do HU/USP (SLC-HU/USP).

As amostras com resultado positivo para cistos de *G. duodenalis* foram separadas e posteriormente submetidas ao exame macroscópico para verificação do

aspecto e consistência fecal. Em seguida, foi adicionado bicromato de potássio a 2% (solução conservante), e as amostras foram armazenadas em refrigerador até o processamento pela técnica de centrífugo-flutuação em sacarose (SHEATER, 1923) que foi realizada no laboratório de doenças parasitárias III da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). As etapas relacionadas a procedimentos de biologia molecular foram realizadas no laboratório de biologia molecular e sorologia da FMVZ/USP.

3.2.2 Pesquisa dos cistos de *G. duodenalis*

As amostras positivas para *G. duodenalis*, triadas pelos métodos mencionados no item 3.2.1, foram submetidas à técnica de centrífugo-flutuação em sacarose (Sheater modificada) (SHEATER, 1923). Assim, aproximadamente 2 mL do filtrado (suspensão de fezes) foram adicionados a 11 mL de solução sacarose ($d=1,203\text{g/cm}^3$). Essa solução de fezes e sacarose foi filtrada em uma camada de gaze e centrifugada em tubos cônicos de 15 mL a 500 g por 10 minutos. Em seguida uma alíquota da película superficial do material centrifugado foi recuperada com o auxílio de uma alça bacteriológica e disposta em uma lâmina. A preparação foi coberta com uma lamínula (1x1cm) para a observação dos cistos em microscópio óptico (aumento de 400 vezes).

3.2.3 Avaliação semi-quantitativa dos cistos de *G. duodenalis*

As amostras positivas para *G. duodenalis* foram analisadas em relação à quantidade de cistos visualizados por campo (aumento de 400 vezes) na técnica de Sheater modificada, adaptando-se a padronização utilizada no laboratório de parasitologia do SLC-HU/USP para pesquisa de leucócitos em que é realizada leitura de ao menos quatro campos e média das contagens expressa em “cruzes” conforme descrito a seguir:

- Positivo (+): 1 a 3 cistos por campo microscópico;
- Positivo (++) : 4 a 8 cistos por campo microscópico;
- Positivo (+++) : 9 a 12 cistos por campo microscópico;
- Positivo (++++): acima de 12 cistos por campo microscópico.

3.2.4 Recuperação dos cistos de *G. duodenalis*

A recuperação dos cistos foi realizada sobre uma placa de Petri estéril, após a lavagem da lâmina e lamínula onde os cistos foram observados com 1,5 mL de tampão TE (10 mM TrisHCL pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). O lavado obtido foi transferido da placa para um microtubo de 1,5 mL, que a seguir, foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. Desprezado o sobrenadante, 1 mL do mesmo tampão foi adicionado e seguiu-se com outra centrifugação nas condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo os cistos de *G. duodenalis* foi imediatamente submetido à extração de DNA ou armazenado a -20 °C para processamento posterior.

3.2.5 Extração de ácidos nucléicos

3.2.5.1 Rompimento dos cistos por choque-térmico

A cada amostra foram adicionados 490 µL do tampão de digestão (10 mM TrisHCl pH 8.0; 100 mM NaCl; 25 mM EDTA e 1%SDS). Para a ruptura dos cistos foram realizados três ciclos consecutivos de congelamento em gelo seco ou em nitrogênio líquido, e descongelamento em banho-maria a 57 °C. A seguir, 10 µL da enzima proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados a cada amostra e as mesmas foram incubadas em banho-maria por 2 horas a 57 °C ou durante a noite a 37 °C.

3.2.5.2 Purificação e precipitação

Os produtos da digestão descrita no item anterior foram purificados com a adição de 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio, seguida por homogeneização em vortex e centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C.

O sobrenadante (400 µL) foi transferido a um microtubo de 1,5 mL e em seguida adicionou-se 400 µL de propanol absoluto. Após a homogeneização em vortex, a mistura alcoólica foi estocada por 2 horas em freezer -20 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 30 minutos a 4 °C e em seguida o propanol foi descartado por inversão de tubo.

O sedimento foi suspenso em 500 µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo deixado em posição invertida até estar completamente seco. Posteriormente, 30 µL de TE (TrisHCL pH8,0 10mM; EDTA pH8,0 1mM) foram adicionados ao sedimento que após a homogeneização em agitador orbital foi incubado a 56 °C por 10 minutos, seguido de homogeneização e armazenamento a -20 °C até o momento da amplificação.

3.2.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

3.2.6.1 Gene codificador da *beta-giardina*

Para a amplificação primária, de um fragmento de aproximadamente 753 pb, foram utilizados oligonucleotídeos descritos por Cacciò et al. (2002):

G7 (senso): 5' AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GC 3'

G759 (anti-senso): 5' GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC 3'

O protocolo de reação aplicado utilizou 45 µL de mix de reagente (34,6 µL água mQ; 1 µL dNTP a 10 mM; 1 µL de cada oligonucleotídeo a 10 pmol/ µL; 5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL MgCl a 50 mM; 0,4 µL taq Polimerase a 5 U/ µL) e 5 µL de DNA extraído conforme descrito no item 3.2.5, resultando um volume final de 50 µL em cada microtubo que, a seguir, foi levado ao termociclador.

Os parâmetros para o termociclador foram: aquecimento inicial de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 65 °C por 30 segundos; 72 °C por 60 segundos, seguidos de um aquecimento final de 72 °C por 7 minutos.

Para a amplificação secundária, para amplificar um fragmento de aproximadamente 511 pb, foi utilizado um par de oligonucleotídeos interno em relação aos primeiros, desenvolvidos por Lalle et al. (2005). Os oligonucleotídeos empregados foram:

BG-Nst-F (senso): 5' GAA CGA ACG AGA TCG AGG TCC G 3'

BG-Nst-R (anti-senso): 5' CTC GAC GAG CTT CGT GTT 3'

O protocolo de reação utilizou 45 µL de mix de reagente (38,6 µL água mQ; 1 µL dNTP a 10 mM; 1 µL de cada oligonucleotídeo a 10 pmol/ µL; 5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL MgCl a 50 mM; 0,4 µL taq Polimerase a 5U/ µL) do fabricante (Invitrogen, USA) e 1 µL do produto da amplificação primária resultando um volume final de 50 µL em cada microtubo que foi levado ao termociclador.

Os parâmetros para o termociclador foram: aquecimento inicial de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 60 segundos, seguidos de um aquecimento final de 72 °C por 7 minutos.

3.2.6.2 Visualização e purificação do produto amplificado

Os fragmentos amplificados pela seminested-PCR e nested-PCR, do gene *bg*, foram visualizados por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em cuba horizontal, previamente imerso em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA pH 8,0 1 mM).

Após a corrida eletroforética, executada a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10 V/cm de gel), o gel foi corado em solução de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL durante 20 minutos. Para a visualização dos produtos amplificados o gel foi observado em transluminador ultravioleta.

As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

Logo após a separação dos produtos amplificados pela eletroforese, as bandas de interesse foram recortadas do gel e então purificadas com o auxílio de kit comercial, seguindo instruções do fabricante (GFX-GEL Purification kit, Amershan - CSA, USA).

3.2.6.3 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento automático foi utilizado o *kit* comercial ABI Prism *BigDyeTM terminator – cycle sequencing ready reaction* – (Applied Biosystems, CA, USA) O DNA obtido de cada produto de PCR após a reação de purificação descrita no item anterior foi utilizado como amostra para a reação de

sequenciamento. Cada produto de PCR foi sequenciado em duplicata, com os *primers* senso e anti-senso para cada reação.

A reação de sequenciamento foi executada utilizando-se para cada amostra 4 μL *Sequencing buffer*, 2 μL de *BigDye*[™] e 1 μL primer. A quantidade de DNA colocada foi de 13 μL , totalizando um volume final de 20 μL .

O ciclo de sequenciamento foi efetuado no termociclador *Mastercycler Gradient Eppendorf* com a utilização do seguinte programa:

Desnaturação inicial: 96 °C por 1 minuto

Desnaturação: 96 °C por 15 segundos

Rampa: 1,0 °C/s

Hibridização: 50 °C por 15 segundos

Rampa: 1,0 °C/s

Extensão: 60 °C por 4 minutos

Rampa: 1,0 °C/s

O ciclo foi repetido por 39 vezes a partir da etapa de desnaturação (segunda etapa).

3.2.6.4 Precipitação do DNA amplificado

Após a reação de sequenciamento os produtos foram purificados por precipitação em etanol. Em cada amostra foi adicionado 80 μL de isopropanol a 65%. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em local protegido da luz por 30 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas a 16.000 g por 30 minutos. O isopropanol foi descartado por inversão de tubo e o sedimento foi homogeneizado com 300 μL de etanol a 60%. Uma nova centrifugação foi realizada a 16.000 g por 15 minutos. O excesso de etanol foi cuidadosamente aspirado com o auxílio de pipeta e os microtubos foram levados ao banho-seco a 90°C por 5 minutos.

As amostras precipitadas foram mantidas a -20 °C até o momento do sequenciamento.

3.2.6.5 Eletroforese de sequenciamento

As amostras precipitadas foram homogeneizadas com 3,4 µL de formamida e Blue Dextran-EDTA (*Applied Biosystems*) na proporção de 5:1, colocadas em banho seco a 95 °C por 3 minutos e depois refrigeradas a 4 °C por 2 minutos. Em seguida foram aplicadas na placa de sequenciamento por meio do protocolo do manual técnico do equipamento ABI Prism™ 377 DNA Sequencers (*Applied Biosystems*).

3.2.7 Análise das sequências

A qualidade dos produtos sequenciados, bem como a montagem da sequência final de cada amostra foi realizada utilizando-se o programa *Phred-Phrap*, contido na suíte *Codoncode Aligner*.

Para o agrupamento A foram usadas as seguintes sequências de referência: EU014381; AY072723; EU0143878; EU014393; EU014384; M36728; EU014385; EU014386; DQ116619; XM001705373; EU014394; EU014383; EU014390 e X85958. Para o agrupamento B as sequências de referência utilizadas foram: EU014392; EU 14389; HQ179582; FJ 560581 EU014388; EU014391; EU014382; AY072727 e DQ 090523.

Determinadas as sequências de nucleotídeos das amostras, foi realizado o alinhamento com sequências homólogas disponíveis no GenBank por meio do programa Clustal W, contido na suíte *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados do exame protoparasitológico

Das 6717 amostras coletadas e analisadas pelas técnicas de Ritchie e Hoffman modificado, habitualmente utilizadas no laboratório de parasitologia do SLC-HU-US, 843 apresentaram um ou mais parasitos. Portanto, o índice de positividade de tais amostras foi de 12,5% em relação ao total estudado.

As amostras positivas, em muitos casos apresentaram infecção mista, ou seja, uma mesma amostra apresentou, muitas vezes, mais de uma espécie de parasito. Assim, para que fosse possível a análise da ocorrência de cada diferente tipo de parasito encontrado, cada um deles foi quantificado por evento de aparecimento.

Os quadros 3, 4 e 5 apresentam a prevalência de cada um dos parasitos encontrados nas amostras pesquisadas:

Quadro 3 – Parasitos encontrados

Grupo	Espécie	Nº de ocorrências	Total de ocorrências
Helmintos	<i>Ascaris lumbricoides</i>	12	91 (8,7%)
	<i>Ancilostomideos spp</i>	7	
	<i>Enterobius vermicularis</i>	1	
	<i>Hymenolepis nana</i>	1	
	<i>Schistosoma mansoni</i>	12	
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	50	
	<i>Taenia spp</i>	4	
	<i>Trichuris trichiura</i>	4	
Protozoários	<i>Blastocystis hominis</i>	42	960 (91,3%)
	<i>Chilomastix mesnili</i>	3	
	<i>Endolimax nana</i>	402	
	<i>Entamoeba coli</i>	359	
	<i>E. histolyca/dispar</i>	57	
	<i>G. duodenalis</i>	97	

Os resultados apresentados demonstram que, na população estudada, a maioria das infecções parasitárias foi devida a protozoários. Porém é importante ressaltar que a maioria dos agentes diagnosticados neste estudo é composta por parasitos não-patogênicos, dentre eles *E. nana* e *E.coli*, que apesar de serem protozoários comumente encontrados no trato intestinal, são classificados como comensais.

Quadro 4 – Prevalência de cada helminto em relação ao total de helmintos observados.

Espécie	Nº de ocorrências	% em relação ao grupo
<i>Ascaris lumbricoides</i>	12	13,2
<i>Ancilostomideos spp</i>	7	7,7
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	1,1
<i>Hymenolepis nana</i>	1	1,1
<i>Schistosoma mansoni</i>	12	13,2
<i>Strongyloides stercoralis</i>	50	55,0
<i>Taenia spp</i>	4	4,4
<i>Trichuris trichiura</i>	4	4,4
Total	91	100

Os resultados apresentados no quadro 4 revelam uma maior positividade de *S. stercoralis* em relação ao total de casos de helmintíase. Sua apresentação clínica é extremamente variável podendo ir de casos assintomático até quadros mórbidos fatais.

Quadro 5 – Prevalência de cada protozoário em relação ao total de protozoários observados.

Espécie	Nº de ocorrências	% em relação ao grupo
<i>Blastocystis hominis</i>	42	4,4
<i>Chilomastix mesnili</i>	3	0,3
<i>Endolimax nana</i>	402	41,9
<i>Entamoeba coli</i>	359	37,4
<i>E. histolytica/dispar</i>	57	5,9
<i>G. duodenalis</i>	97	10,1
Total	960	100

Além dos comensais *E. nana* e *E. coli*, o *B. hominis* é também um parasita comum em fezes humanas; todavia sua patogenicidade é ainda controversa entre os estudiosos.

Dentre os protozoários intestinais patogênicos observados neste estudo, os de maior importância são *E. histolytica* e *G. duodenalis* (quadro 5). Entretanto, a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. díspar* por métodos de microscopia é extremamente difícil, o que dificultou a certificação da patogenicidade das amostras diagnosticadas com parasitas do gênero *Entamoeba* spp. Dentre os protozoários patogênicos, a *G. duodenalis* figurou como o mais frequente.

O quadro 6 apresenta dados relativos às amostras positivas para *G. duodenalis*.

Quadro 6 – Dados das amostras positivas para *G. duodenalis* (Legenda: masc: masculino; fem: feminino; ns: não amplificado)

Nº amostra	Idade	Sexo	Consistência Fecal	Aspecto Fecal	Quantidade de cistos por campo	Agrupamento
1	3	Masc	Pastosa	Normal	3+	B (ASH ou Inf. Mista)
2	36	Fem	Formada	Normal	2+	NS
3	18	Masc	Formada	Normal	1+	NS
4	11	Masc	Pastosa	Normal	3+	All
5	2	Fem	Formada	Normal	3+	All
6	53	Fem	Formada	Normal	4+	Provável All-3I
7	44	Masc	Formada	Normal	3+	B
8	1	Masc	Formada	Normal	3+	All

9	74	Masc	Formada	Normal	2+	B (ASH ou Inf. Mista)
10	55	Masc	Formada	Normal	1+	NS
11	8	Masc	Pastosa	Normal	3+	AI ou All
12	3	Masc	Pastosa	Normal	2+	B (ASH ou Inf. Mista)
13	4	Masc	Pastosa	Normal	1+	NS
14	5	Masc	Pastosa	Normal	2+	NS
15	2	Masc	Pastosa	Normal	3+	All
16	3	Fem	Pastosa	Normal	3+	All
17	11	Fem	Pastosa	Normal	3+	All
18	11	Fem	Pastosa	Normal	3+	All
19	9	Fem	Pastosa	Normal	3+	All-3
20	2	Fem	Pastosa	Normal	2+	All
21	1	Fem	Pastosa	Normal	1+	NS
22	4	Fem	Diarreica	Normal	4+	All-3
23	61	Masc	Diarreica	Normal	2+	NS
24	6	Fem	Diarreica	Normal	1+	NS
25	66	Masc	Pastosa	Normal	2+	All
26	11	Fem	Formada	Normal	1+	NS
27	4	Masc	Formada	Normal	3+	All
28	10	Fem	Formada	Normal	3+	AI ou All
29	5	Masc	Formada	Normal	3+	All-3
30	69	Masc	Diarreica	Normal	4+	B (ASH ou Inf. Mista)
31	10	Fem	Formada	Normal	2+	All
32	46	Fem	Formada	Normal	2+	B
33	3	Masc	Diarreica	Normal	4+	All
34	10	Fem	Formada	Normal	1+	NS
35	41	Masc	Formada	Normal	1+	NS
36	70	Fem	Formada	Normal	1+	NS
37	4	Fem	Formada	Normal	2+	NS
38	39	Masc	Pastosa	Normal	1+	NS
39	48	Masc	Pastosa	Normal	2+	B (ASH ou Inf. Mista)
40	54	Masc	Formada	Normal	2+	B (ASH ou Inf. Mista)
41	7	Fem	Pastosa	Normal	3+	B
42	19	Masc	Pastosa	Normal	4+	All

43	13	Masc	Formada	Normal	2+	NS
44	3	Masc	Pastosa	Normal	4+	A (ASH ou Inf. Mista)
45	18	Fem	Formada	Normal	1+	NS
46	5	Fem	Pastosa	Normal	1+	NS
47	2	Masc	Pastosa	Normal	2+	B (ASH ou Inf. Mista)
48	31	Fem	Formada	Normal	1+	NS
49	28	Masc	Pastosa	Normal	3+	All-3
50	13	Fem	Pastosa	Normal	3+	Provável All-3
51	7	Masc	Formada	Normal	3+	All
52	8	Fem	Pastosa	Normal	1+	NS
53	6	Masc	Formada	Normal	1+	NS
54	7	Masc	Formada	Normal	1+	NS
55	4	Fem	Formada	Normal	2+	All
56	6	Masc	Formada	Normal	3+	B
57	42	Masc	Formada	Normal	2+	All
58	26	Fem	Formada	Normal	4+	All
59	27	Fem	Formada	Normal	2+	A (ASH ou Inf. Mista).
60	3	Masc	Formada	Normal	1+	NS
61	45	Masc	Formada	Normal	2+	B
62	3	Masc	Pastosa	Normal	2+	B
63	3	Masc	Cíbalos	Normal	1+	NS
64	5	Fem	Diarreica	Normal	3+	All
65	25	Masc	Formada	Normal	1+	NS
66	12	Masc	Formada	Normal	2+	B
67	6	Masc	Pastosa	Normal	3+	All
68	37	Fem	Pastosa	Normal	2+	B
69	23	Masc	Formada	Normal	2+	NS
70	35	Masc	Formada	Normal	2+	All-3
71	28	Masc	Formada	Normal	1+	NS
72	2	Fem	Cíbalos	Normal	3+	B
73	45	Masc	Formada	Normal	2+	All
74	3	Masc	Formada	Normal	3+	All
75	24	Masc	Formada	Normal	1+	NS
76	7	Masc	Pastosa	Normal	2+	NS

77	2	Masc	Pastosa	Normal	2+	NS
78	7	Fem	Formada	Normal	4+	B
79	30	Fem	Formada	Normal	2+	NS
80	53	Masc	Formada	Normal	2+	All
81	40	Masc	Formada	Normal	1+	All
82	27	Masc	Diarreica	Normal	2+	NS
83	5	Masc	Formada	Normal	4+	NS
84	67	Masc	Formada	Normal	1+	NS
85	24	Fem	Diarreica	Normal	4+	All
86	43	Masc	Formada	Normal	1+	NS
87	1	Masc	Formada	Normal	4+	A (ASH ou Inf. Mista)
88	22	Masc	Diarreica	Normal	3+	B
89	2	Masc	Formada	Normal	2+	All-3
90	43	Masc	Pastosa	Normal	2+	A (ASH ou Inf. Mista)
91	4	Masc	Pastosa	Normal	2+	B
92	47	Fem	Pastosa	Normal	1+	NS
93	48	Masc	Formada	Normal	1+	NS
94	30	Masc	Formada	Normal	1+	NS
95	3	Fem	Pastosa	Normal	1+	NS
96	26	Masc	Formada	Normal	3+	B
97	3	Masc	Pastosa	Normal	2+	B

Fonte: SLC-HU/USP e Laboratório de Biologia Molecular da FMVZ da USP, 2009–2011.

No exame macroscópico foram analisados a consistência e o aspecto fecal das amostras, sendo verificado que 52 (53,6%) eram formadas, 34 (36,1%) pastosas, 9 (9,2%) diarreicas e 2 (9,1%) cíbalos (quadro 6). Em relação ao aspecto fecal, observou-se que todas eram normais, ou seja, não apresentavam muco ou sangue.

A avaliação dos dados de sexo e faixa etária dos indivíduos que tiveram resultado positivo para *G. duodenalis* foi realizada compondo-se quatro grupos segundo gênero e faixa etária, seguindo a padronização do Serviço Médico do Hospital Universitário onde que indivíduos de ambos os sexos e faixa etária até 15 anos, são atendidos na Clínica Pediátrica e indivíduos com idade acima de 15 anos e um dia, são atendidos na Clínica Médica. Os resultados dessa análise revelaram que, na faixa etária até 15 anos, 31 dos indivíduos, ou 31,9% do total de casos,

eram do sexo masculino e 23 ou 23,7% do total de casos, do sexo feminino. Dos indivíduos com idade acima de 15 anos, 31 (31,9% do total de casos), eram do sexo masculino e 12 (12,4% do total de casos) do sexo feminino. Portanto, entre os homens, não foi observada diferença do número de casos em relação à faixa etária. Já entre as mulheres, observou-se uma diminuição significativa do número de casos em idades acima de 15 anos, principalmente em relação aos homens (quase três vezes menos), o que pode estar relacionado a hábitos de higiene e atividade ocupacional (Tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência dos casos de giardíase por faixa etária e sexo.

Sexo/ Faixa etária	Nº de casos	%
Feminino ≤ 15	23/97	23,7%
Masculino ≤ 15	31/97	31,9%
Feminino ≥ 15	12/97	12,4%
Masculino ≥ 15	31/97	31,9%

Fonte: SLC-HU/USP.

4.2 Pesquisa dos cistos de *G. duodenalis*

Em todas as 97 amostras positivas à microscopia para *G. duodenalis* preparadas pelas técnicas de Hoffman, Ritchie e Sheater modificada houve visualização dos cistos no material processado pelas três técnicas. Na leitura microscópica da última técnica, os cistos foram quantificados por campo no aumento de 400 vezes e os resultados expressos em cruzes distribuindo-se conforme descrito a seguir (dados do quadro 6):

- Positivo (+): 28,86% das amostras;
- Positivo (++) : 34,02% das amostras;
- Positivo (+++) : 25,77 das amostras;
- Positivo (++++): 11,34% das amostras.

4.3 Análise do gene codificador da beta giardina (*bg*)

As 97 amostras positivas microscopicamente para *G. duodenalis*, foram submetidas à extração de DNA e à reação de amplificação pelo gene *bg* conforme protocolo descrito nos itens 3.5 a 3.6. Em 59 amostras (60,8%) foi possível a amplificação do fragmento alvo (Figura 3). Nas demais 38 amostras (39,2%) o fragmento esperado no gel de agarose não amplificaram.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos amplificados a partir do gene *bg*. Cada coluna dupla representa amplificações dos produtos de nested-PCR de aproximadamente 511pb, a partir de amostras fecais de humanos infectados com *G. duodenalis*. La: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de bases, Cn: Controle negativo.

As amostras em que a amplificação não ocorreu como esperado foram: 2, 3, 10, 13, 14, 21, 23, 24, 26, 34, 35, 36, 37, 38, 43, 45, 46, 48, 52, 53, 54, 60, 63, 65, 69, 71, 75, 76, 77, 79, 82, 83, 84, 86, 92, 93, 94 e 95.

Na análise da classificação semi-quantitativa dos cistos de *G. duodenalis* (quadro 6) verificou-se que, das amostras em que não houve amplificação, 27 (71,0%) foram consideradas “positivo (+)”, 10 (26,3%) “positivo (++)” e apenas 1 (2,6%) “positivo (+++++)”. Com base nesses resultados, é possível cogitar que o número de cistos presentes na amostra é determinante para que a análise molecular seja bem sucedida. Assim, a não amplificação pode ter ocorrido devido à baixa quantidade de cistos presentes nas amostras, ações de inibidores ou pela sua perda em alguma das etapas dos processos de recuperação e/ou extração.

O sequenciamento dos fragmentos da PCR foi possível em 59 amostras usando sequências de referência de isolados de *G. duodenalis* para o gene *bg* demonstrando a formação de grupos heterogêneos em relação às amostras analisadas.

Após análise molecular, duas linhagens genéticas foram identificadas, sendo 38 isolados de *G. duodenalis* pertencentes ao Agrupamento A e 21 ao Agrupamento B (Figuras 5 e 6).

	162	255	354	378	411	421	429	444	462	502	534	564	567	582	690
<i>Giardia</i> spp. mRNA	C	C	T	T	C	C	T	T	A	G	G	T	C	A	A
A1 EU014390	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A2 EU014393	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G
A3 EU014381	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	T	.	G
A4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
A5	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A6	T	.	C	C	.	.	C	C	G	.	A	C	.	G	.
B44	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	-	-	-	-
B87;	.	.	.	.	.	Y	Y	.	.	.	.	-	-	-	-
B28; B28; B11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-
B27, B58; B05; B08; B16; B33; B67; B15; B16; B42; B17; B73; B18; B74; B20; B80; B81; B25; B55; B85; B57; B31; B51; B04; B64	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G
B50;	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	-	-	-	-
B90	.	S	.	.	.	T	C	.	.	.	.	-	-	-	-
B06;	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	T	.	-
B59	.	.	.	.	.	Y	Y	.	.	.	.	.	T	.	G
B29; B70; B19; B49; B22; B89	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	T	.	G

Figura 5 – Agrupamento A – identificação dos genótipos de *G. duodenalis*, através do gene *bg*, baseado na análise de SNPs. Legenda: (-): sítio não identificado. (Y); pico duplo de nucleotídeo sendo C ou T; (S): pico duplo de nucleotídeo sendo G ou C.

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária, 2011.

	129	173	195	204	210	228	237	324	354	369	438	516	564	609	645	654
EU014392	T	C	C	G	T	A	G	C	T	T	C	T	T	C	C	C
AY072727	C	.	.	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.
DQ090523	C	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.
B32	-	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.
B01	-	.	.	.	Y	.	.	.	Y	C	.	.	.	.	.	.
B30	-	.	.	.	C	.	.	.	Y	C	.	.	.	.	.	.
B09	C	.	.	.	C	.	.	.	C	C	.	.	Y	.	.	.
B62; B56; B61	C	.	.	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.
B68	-	-	-	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.
B40	C	Y	.	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.
B88	C	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	C	.	.	.
B96	C	.	.	.	C	G	.	.	.	C	.	.	C	T	T	T
B97	C	.	.	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	-	-	-
	-	.	Y	.	C	G	.	.	Y	C	.	.	C	-	-	-
B39	C	.	T	.	C	G	.	Y	C	C	.	.	C	T	T	T
B47	C	.	.	A	.	G	R	.	.	C	.	.	.	.	.	.
B91; B07; B41	-	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	C	.	-	-	-
B66; B78; B72	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.

Figura 6 – Agrupamento B – identificação dos genótipos de *G. duodenalis*, através do gene *bg*. Legenda: (-): sítio não identificado. (Y); pico duplo de nucleotídeo sendo C ou T; (R): pico duplo de nucleotídeo sendo A ou G.

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária, 2011.

No Agrupamento A, 24 isolados de *G. duodenalis* (amostras B04; B05; B08; B15; B16; B17; B18; B20; B25; B27; B31; B33; B42; B51; B55; B57; B58; B64; B67; B73; B74; B80; B81 e B85) foram classificados como genótipo All, apresentando sequências idênticas àquelas encontradas na literatura.

Outros seis isolados (amostra B19; B22; B29; B49; B70 e B89) foram classificados como a All-3, sendo diferenciado do agrupamento All pela análise de SNPs, por substituições nos nucleotídeos nas posições 421 e 429.

Os isolados das amostras B06 e B50 foram classificados como prováveis All-3 devido às posições dos nucleotídeos T e C nos sítios 421 e 429 e por não terem sido contemplados os sítios que permitem a discriminação entre os dois (567 e 690).

Nos isolados (amostras B11 e B28) classificados como AI ou All, a determinação dos genótipos foi não possível, por não terem sido contemplados os sítios que permitem a discriminação entre os dois (567 e 690).

Em quatro isolados (amostras B44; B59; B87; B90) foi notada heterogeneidade de sequência alélica ou infecção mista já que foram observados duplos picos de nucleotídeos nos cromatogramas.

Vinte e um isolados de *G. duodenalis* (amostras B01; B07; B09; B12; B30; B32; B39; B40; B41; B47; B56; B61; B62; B66; 68; B72; B78; B88; B91; B96 e B97) foram identificadas como pertencentes ao agrupamento B. Deste, sete isolados (amostras B01; B09; B12; B30, B39; B40 e B47) apresentaram heterogeneidade de sequência uma vez que foram observados picos duplos de nucleotídeos nos cromatogramas. Esse achado é mais frequente nesse agrupamento (GELANEW et al., 2007).

Do total de fezes diarréicas (9 amostras), 4 (44,4%) eram pertencentes ao agrupamento A e 2 (22,2%) ao agrupamento B e 3 (33,3%) não foram amplificadas.

A avaliação da prevalência dos casos de *G. duodenalis* por faixa etária e Agrupamento, foi realizada compondo-se 4 grupos. Os resultados dessa análise revelaram que, na faixa etária até 5 anos, 31 dos indivíduos, ou 31,9% dos casos, sendo 15 isolados pertencentes ao agrupamento A, 7 ao Agrupamento B e 9 não amplificaram. Na faixa etária, entre 6 e 15 anos, 22 dos indivíduos, ou 22,7% dos casos, sendo 10 isolados pertencentes ao agrupamento A, 4 ao agrupamento B e 8 não amplificaram. Na faixa etária, entre 16 e 39 anos, 21 dos indivíduos, ou 21,6 dos casos, sendo 6 isolados pertencentes ao agrupamento A, 3 ao agrupamento B e 12 não amplificaram. Na faixa etária entre 40 e 75 anos, 23 dos indivíduos, ou 23,7% dos casos, sendo 7 isolados pertencentes ao agrupamento A, 7 pertencentes ao agrupamento B e 9 não amplificaram. Quando comparado com o estudo de Yang et al., (2010), ambos estudos, os resultados foram concordante na faixa etária até 5 anos, por apresentarem maior positividade para este parasita. Referente aos Agrupamentos, o nosso estudo mostrou que o agrupamento A, é o mais prevalente, enquanto que no estudo Australiano, o agrupamento B mais prevalente (tabela 2).

Tabela 02 - Prevalência dos casos de *G. duodenalis* por faixa etária e agrupamento.

Faixa etária (anos)	Nº de casos	%	Agrupamentos		<i>β giardina</i> (MLGs)		Não amplificadas
			A	B	AII	AII-3	
≤ 5	31/97	31,9%	15	07	10	3	09
06 – 15	22/97	22,7%	10	04	07	01	08
16 – 39	21/97	21,6%	06	03	03	02	12
40 – 75	23/97	23,7%	07	07	07	-	09
Total			38	21	24	06	38

Fonte: SLC-HU/USP e Laboratório de Biologia Molecular da FMVZ da USP, 2009–2011.

A população analisada neste estudo, composta por moradores da zona urbana da maior metrópole da América do Sul e atendida no SLC-HU/USP, apresentou apenas 1,4% de prevalência de *G. duodenalis* do total das amostras analisadas e 10,1% de prevalência em relação ao total de protozoários, fato este que difere de outros estudos em países sul-americanos, a exemplo do realizado com moradores também de área urbana na Argentina, no qual apresentou 46,4% de positividade para o parasita (MOLINA et. al., 2011), bem como em zona rural da Venezuela onde (HAGEL et. al. 2011) diagnosticaram 59% de positividade de *G. duodenalis*. Observa-se que mesmo em países com características de desenvolvimento similares, a taxa de ocorrência de *G. duodenalis* se difere de país e região geográfica.

Outro fator importante para a baixa prevalência neste estudo é o método de escolha para o diagnóstico de *G. duodenalis* em amostras de fezes humanas, sendo que a microscopia possui sensibilidade estimada entre 50 e 70% (BURKE et. al. 1975), além de permitir a identificação vários parasitas ao mesmo tempo, mas a sensibilidade da técnica depende da habilidade do microscopista (JOHNSTON et. al. 2003; SCHUURMAN et. al. 2007) e, como se sabe, os cistos de *G. duodenalis* são eliminados de maneira intermitentes nas fezes, sendo assim, um indivíduo parasitado pode apresentar exames parasitológico positivo e negativo. Mas quando coletadas três amostras com intervalos de 48 a 72 horas a sensibilidade da microscopia pode chegar a 83% (STAAT et. al., 2011). O nosso estudo limitou-se a análise de uma única amostra, fato este que pode ter influenciado nos resultados coproparasitológicos.

O perfil socioeconômico dos indivíduos analisados neste estudo é variado, já que esse grupo engloba estudantes e funcionários da USP e moradores da região do Butantã e adjacência, que abriga famílias de classe alta, média e baixa (moradores de favela com esgoto a céu aberto). Todos com solicitação médica de coproparasitológico.

Estudos realizados em vários países confirmam que somente os agrupamentos A e B são capazes de causar infecções em humanos e a prevalência de cada agrupamento oscila entre os países sendo o agrupamento A encontrados em 35%, agrupamento B em 60% e A + B em 5% dos países analisados. (CACCIÒ e RYAN, 2008; FENG e XIAO, 2011).

Neste estudo o agrupamento A foi mais prevalente do que o agrupamento B, os resultados encontrados foram concordantes com os dados de outros países como Nova Zelândia, Egito, Itália, Etiópia e México (CACCIÒ e RYAN, 2008; CEDILLO-RIVERA, 2003; FENG e XIAO, 2011; HELM et al., 2009), demonstrando compatibilidade desses subgrupos da Oceania, europeus e africanos com os achados latino-americanos, nos quais podemos reportar os estudos realizados por (VOLOTÃO et al. 2007; 2011) que diagnosticou o agrupamento A como mais comum dentre as amostras analisadas no Rio de Janeiro e São Paulo. Outro trabalho realizado no Brasil também relata o agrupamento A como mais prevalente em seu estudo realizado também em São Paulo (SOUZA et al., 2007). O agrupamento B diagnosticado neste estudo foi também reportado por (SAHAGUN et al.; 2008; SOUZA et al., 2007), já (VOLATÃO et al. 2007; 2011), não encontrou esse agrupamento em seus estudos brasileiros.

É sabido que os agrupamentos A e B estão associados à importância no papel zoonótico das giardíases (LALLE et al., 2005; FENG e XIAO 2011). Num estudo realizado por (YANG et al., 2009) na Austrália 2009, no qual analisaram amostras fecais de humanos, marsupiais e de uma raposa, identificaram os subgrupos BIII e BIV do agrupamento B, indicando transmissão zoonótica em potencial. Apesar de alguns autores separar o agrupamento B em dois subgrupos (MONISs et al., 1999; THOMPSON, 2004), outros autores não confirmam essa separação (SOUZA et al., 2007; VAN DER GIESSEN et al., 2006), neste estudo, essa separação não foi observada.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse estudo de amostras fecais de indivíduos atendidos no HU/USP, podemos sugerir que:

- ✓ A análise de 6717 amostras de fezes proveniente de indivíduos atendido no HU/USP revelou positividade de 12,5%.
- ✓ A maioria das infecções parasitária foi devida a protozoários comensais na população estudada.
- ✓ *Strongyloides stercoralis* e *G. duodenalis* respectivamente como o helminto e o protozoário patogênico de maior prevalência na população estudada.
- ✓ A avaliação por faixa etária, *G. duodenalis*, apresentou maior prevalência em indivíduos com até 5 anos de idade.
- ✓ A avaliação por sexo e faixa etária, *G. duodenalis*, apresentou maior prevalência em indivíduos do sexo masculino e com idade acima de 15 anos em relação ao sexo feminino.
- ✓ Os resultados obtidos indicam que, na região do Butantã e adjacências, o Agrupamento A, genótipo AII é o mais prevalente associado à giardíase em humanos.
- ✓ O Agrupamento B oferece maior risco para uma transmissão zoonótica em potencial.

REFERÊNCIAS*

- ADAM, R. D. Biology of *G. duodenalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 447-475, 2001.
- ALMEIDA, A. A.; DELGADO, M.L.; SOARES, S.C.; CASTRO, A. O.; MOREIRA, M. J.; MENDONÇA, C. M; CANADA N.B, DA COSTA, J. M. Genotypes analysis of *Giardia* isolated from assymptomatic children in northern Portugal. **J Eukaryot Microbiology**, v. 53 p. 177-178, 2006.
- 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.
- BURKE, J.A. Giardiasis in childhood. **American Journal Diseases of Children**, v. 129: p. 1304-1310, 1975.
- CACCIÒ, S. M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the *beta-giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *G. duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 1023-1030, 2002.
- CACCIÒ, S. M.; BECK, R.; LALLE, M.; MARINCULIC, A.; POZIO, E. Multilocus genotyping of *G. duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1523-1531, 2008.
- CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75-80, 2008.
- CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.
- CARMENA, D.; AGUINAGALDE, X.; ZIGORRAGA, C.; FERNÁNDEZ-CRESPO J. C.; OCIO, J. A. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 619-629, 2007.
- CARVALHO-COSTA, F.A.; GONÇALVES, A.Q.; LASSANCE, S. L.; ALBUQUERQUE, C. P.; LEITE, J. P. G.; BÓIA, M. N. Detection of *cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 346-348, 2007.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention, acesso em 11 de junho de 2011.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CEDILLO-RIVERA, R.; DARBY, J. M.; ENCISO-MORENO, J. A.; ORTEGA-PIERRES, G.; EY, P. L. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. **Parasitology Research**, v. 90, n. 2, p. 119-123, 2003.

DE CARVALHO, T. B.; DE CARVALHO, L. R.; MASCARINI, L. M. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (Sao Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *G. duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 269-273, 2006.

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.

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

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiads. **Clinical Microbiology Reviews** p. 110-140, 2011.

GELANEW, T.; LALLE, M.; HAILU, A.; POZIO, E.; CACCIO, S. M. Molecular characterization of human isolation of *G. duodenalis* from Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 102, n.2, p. 92-99, 2007.

GONÇALVES, L. A; BELIZÁRIO, L. T; PIMENTEL, J. B; AMANTE-PENATTI, P. M; PEDROSO, R. S Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44 p. 191-193, 2011.

HAGEL, I.; CABRERA, M.; PUCCIO, F.; SANTAELLA, C.; BUVAT, E.; INFANTE, B.; ZABALA, M.; CORDERO, R.; DI PRISCO, M.C. Co- infection with *Ascaris lumbricoides* modulates protective immune responses against *Giardia duodenalis* in school Venezuelan rural children. **Acta Tropica** v. 117 p. 189-195, 2011

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **Puerto Rico Journal of Public Health Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.

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

JONHSTON, S. P.; BALLARD, M. M.; BEACH, M. J.; CAUSER, L.; WILKINS, P. P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal Clinical Microbiology** v 41, p 623-626, 2003.

KARANIS, KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J Water health**, v. 5 p. 1-38, 2007.

LALLE, M.; BRUSCHI, F.; CASTAGNA, B.; CAMPA, M.; POZIO, E.; CACCIO, S. M. High genetic polymorphism among *G. duodenalis* isolates from Sahrawi children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 8, p. 834-838, 2009.

LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIÒ, S. M. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *G. duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 207-213, 2005.

LEBBAD, M.; ANKARKLEV, J.; TELLEZ, A.; LEIVA, B.; ANDERSSON, J. O.; SVARD, S. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. **Acta Tropica**, v. 106, n. 1, p. 44-53, 2008.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, n. 1, p. 121-155, 1919.

MACHADO, E. R.; SANTOS, D. S.; COSTA-CRUZ, J.M. Enteroparasites and comensais among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 581-585, 2008.

MACHADO, R. C.; MARCARI, E. L.; VECHIATO, S. D. F.; CARARETO, C. M. A. Giardíase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 697-704, 1999.

MASCARINI, L. M.; DONALISIO, M. R.. Giardíase e Cryptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 577-579, 2006.

MATOS, S. M. A.; ASSIS, A. M. O.; PRADO, M. S.; STRINA, A.; DOS SANTOS, L. A.; DE JESUS, S.R.; BARRETO, M.L. *Giardia duodenalis* infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 7, p. 1527-1535, 2008

MANK, T. G.; ZAAT, J. O.; DEELDER, A. M.; VAN EIJK, J. T.; POLLDERMAN, A. M. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 615-619, 1997.

MOHAMMED MAHDY, A. K.; SURIN, J.; WAN, K. L.; MOHD-ADNAN, A.; AL-MEKHLAFI, M. S.; LIM, Y. A. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. **Acta Tropica**, v. 112, n. 1, p. 67-70, 2009.

MOLINA, N.; PEZZANI, B.; CIARMELA, M.; ORDEN, A.; ROSA, D.; APEZTEGUÍA, M.; BASUALDO, J.; MINVIELLE, M. Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso, Argentina. **Original Article**, 2011.

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

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

MONIS, P. T.; CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 93-100, 2009.

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.

NESSELQUIST, E. L.; WELCH, D. M.; SOGIN, M. L. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. Duodenalis* population biology in marine systems. **International Journal for Parasitology**, 2010.

PEREIRA, M. G. C.; ATWILL, E. R.; BARBOSA, A. P. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 49, n. 3, p. 139-145, 2007.

PITTNER E, MORAES I. F; SANCHES, H. F; TRINCAUS, M.R; RAIMONDO, M. L; MONTEIRO, M. C. Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade escolar na cidade de Guarapuava, PR. **Revista Sallus**. v.1 n. 1p. 97-100, 2007.

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

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

REY, L. Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. In:_____. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 30 p. 420, cap. 64 p. 811-816.

ROBERTSON, L. J.; HANEVIK, K.; ESCOBEDO, A. A.; MORCH, K.; LANGE LAND, N. Giardiasis--why do the symptoms sometimes never stop? **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 75-82, 2010.

SAHAGUN, J.; CLAVEL, A.; GONI, P.; SERAL, C.; LLORENTE, M. T.; CASTILLO, F. J.; CAPILLA, S.; ARIAS, A.; GOMEZ-LUS, R. Correlation between the presence of symptoms and the *G. duodenalis* genotype. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 81-83, 2008.

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.

SCOTT, K. G.; MEDDINGS, J. B.; KIRK, D. R.; LEES-MILLER, S. P.; BURET, A. G. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1179-1190, 2002.

SCHUUURMAN, T.; LANKAMP, P.; van BELKUM, A.; KOOISTRA –SMID, M.; van ZWET, A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detections of *Giardia lamblia* in human stool specimens. **Clinical Microbiology infect.** V. 13 p. 1186-1191, 2007.

SHEATER, A. L. The detection of intestinal protozoa and man-geparasites by a flotation technique. **Journal of Comparative Pathology**, v. 36, p. 266-275, 1923.

SMITH, H. V.; CACCIO, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 160-167, 2006.

SOUSA, M. C.; MORAIS, J. B.; MACHADO, J. E.; POIARES-DA-SILVA, J. Genotyping of *G. duodenalis* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. **Journal of Eukaryot Microbiology**, v. 53, p. S174-176, 2006. Suppl 1.

SOUZA, S. L.; GENNARI, S. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; PENA, H. F.; FUNADA, M. R.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R. M. Molecular identification of *G. duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 258-264, 2007.

SPRONG, H.; CACCIO, S. M.; VAN DER GIESSEN, J. W. Identification of zoonotic genotypes of *G. duodenalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. e558, 2009.

STAAT, M. A.; RICE, M.; DONAUER, S.; MUKKADA, S.; HOLLOWAY, M. CASSEDY, M.; KELLEY, J.; SALISBURY, S. Intestinal Parasite Screening in Internationally Adopted Children: Importance of Multiple Stool Specimens. **PEDIATRICS Official journal of the American Academy of Pediatrics**; originally published online august 8, 2011.

TASHIMA, N. T.; SIMOES, M. J.; LEITE, C. Q.; FLUMINHAN, A.; NOGUEIRA, M. A.; MALASPINA, A. C. Classic and molecular study of *G. duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 1, p. 19-24, 2009.

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

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

THOMPSON, R. C.; 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.; MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 69-137, 2004.

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

VAN DER GIESSEN, J. W. B.; 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.

VOLOTÃO, A. C.; COSTA-MACEDO, L. M.; HADDAD, F. S.; BRANDAO, A.; PERALTA, J. M.; FERNANDES, O. Genotyping of *G. duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v. 102, n. 1, p. 10-19, 2007.

VOLOTÃO, A. C.; RAMOS, N. M. D.; FANTINATTI, M.; MORAES, M. V. P.; NETO, H. A.; STORTI-MELO, L. M.; L. M.; GODOY, E. A. M.; ROSSIT, A. R. B.; FERNANDES, O.; MACHADO, R. L. D. Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Elsevier**, 2011.

WIELINGA, C. M.; THOMPSON, R. C. Comparative evaluation of *G. duodenalis* sequence data. **Parasitology**, v. 134, n. pt 12, p. 1795-1821, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996. **The World Health Report**, 1996. World Health Organization, Geneva.

YANG, R.; LEE, J.; NG, J.; RYAN, U. High prevalence *G. duodenalis* assemblage B and potentially zoonotic subtypes in sporadic human cases in Western Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 3, p. 293-297, 2010.

ANEXO – Certificado do Hospital Universitário

Fls. nº _____
CEPIHU-USP _____

São Paulo, 20 de fevereiro de 2009.

Il^{mo}(a). S^{ra}(a).

Prof. Tit. Jeffrey Jon Shaw

Departamento de Parasitologia

Instituto de Ciências Biomédicas - ICB

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Inquérito epidemiológico e caracterização molecular de isolados de *Giardia spp.* provenientes de amostras fecais de origem humana do Hospital Universitário – USP, São Paulo, pela análise de fragmentos do Gene Codificador da Glutamato Desidrogenase (ghd) e Beta-Giardina” – **Co-autor(es)**: Rodrigo Martins Soares, Antonio Francisco Malheiros, Valdir Azevedo dos Santos - **Registro CEP-HU/USP**: 879/09 – **SISNEP CAAE**: 0088.0.198.198-09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 20 de fevereiro de 2009, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2.c.

O primeiro relatório está previsto para 20 de fevereiro de 2010.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP