Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Caracterização molecular de isolados de *Giardia* de
amostras de água e esgoto provenientes do Estado de
São Paulo.**

Licia Natal Fernandes

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Saúde Pública.**

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Associada Maria Helena Matté

São Paulo

2009

Caracterização molecular de isolados de *Giardia* de amostras de água e esgoto provenientes do Estado de São Paulo.

Licia Natal Fernandes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Associada Maria Helena Matté

São Paulo

2009

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Delsio e Elvira;
à minha irmã, Thaís;
e ao meu marido, Marcelo.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Helena Matté, por estar presente em todas as etapas do estudo realizado, pela constante fonte de ânimo, pela confiança em meu trabalho e pelo incentivo de meu desenvolvimento profissional.

À FINEP (Financiadora de Estudos e projetos), pelo financiamento do projeto “Detecção e genotipagem de *Aeromonas*, *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras ambientais –LSPSA”, por meio do qual foi possível a realização do presente trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos concedida.

À equipe do Laboratório de Saúde Pública: Milena Dropa, Miriam Lopes Silva, Elisabeth Mendes Martins de Moura, Cintia Carolina da Silva Mayer, Camila Fonseca Rizek, Kélvin Anahí Gonzales Sábio, Helena Mayumi Muranaka, Danielle Escudeiro de Oliveira, Livia Carminato Balsalobre, Martha Virginia Ribeiro Rojas, Fabiana Bispo Martins e Cristiane Macegoza Marques da Silva, pela ajuda em diferentes etapas do presente trabalho, e especialmente à Ronalda Silva de Araújo, pelas contribuições intelectuais, e à Patrícia Pereira de Souza, pelo auxílio na realização dos procedimentos laboratoriais.

Ao Professor Associado Glavur Rogério Matté, pelas sugestões dadas desde o início do presente trabalho.

À Profa. Dra. Maria Tereza Peppe Razzolini, à Dra. Silvana Audrá Cutolo, à CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento

Ambiental) e à equipe do Instituto de Botânica, pelo fornecimento das amostras analisadas.

À Dra. Maria Inês Zanolli Sato, pela atenção e disposição em colaborar com a realização do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelo auxílio na padronização das reações no início do desenvolvimento desse trabalho e nos procedimentos de análise filogenética, e pelas sugestões e correções apontadas.

À Profa. Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini, pela atenção, sugestões, ensinamentos e dados disponibilizados.

À Dra. Therezinha Travassos Ribeiro de Carvalho, pelas correções que contribuíram para melhorar a qualidade do presente trabalho.

À Elayse Maria Hachich, pela organização do fornecimento das amostras encaminhadas pela Cetesb e pelos dados disponibilizados.

À Mikaela Renata Funada, pelo auxílio na padronização das reações no início desse estudo.

Aos meus pais, Delsio e Elvira, a minha irmã, Thais, ao meu marido, Marcelo, por estarem comigo em todos os momentos, pelo amor, carinho e incentivo.

Aos amigos Andrei, Misi e Ana Luísa, pelo interesse no desenvolvimento desse trabalho e pelo encorajamento.

À Deus, pela saúde e pela força para a realização do presente estudo.

RESUMO

Fernandes LN. **Caracterização molecular de isolados de *Giardia* de amostras de água e esgoto provenientes do Estado de São Paulo** [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2009.

Introdução - *Giardia* é um protozoário que parasita o intestino de quase todas as classes de vertebrados, podendo causar giardíase. Dentre os sete agrupamentos da espécie *G. duodenalis*, nomeados de A a G, apenas A e B foram encontrados no homem. Por se tratar de um patógeno de veiculação hídrica, a pesquisa de cistos desse microorganismo em água e esgoto é de interesse para a saúde pública. Uma vez que os métodos convencionais utilizados para a detecção desse protozoário em amostras ambientais não permitem diferenciar os isolados de *Giardia* potencialmente patogênicos para o homem dos demais, o emprego de técnicas que possibilitam a caracterização molecular do parasita em questão se torna necessário, principalmente no Brasil, onde as informações sobre os genótipos de *Giardia* do ambiente são escassas. **Objetivos** - Detectar a presença e identificar os genótipos de *Giardia* sp. em amostras de água e esgoto provenientes do estado de São Paulo, discutindo a importância dos achados para a saúde pública, bem como elaborar uma estratégia que possibilite a realização de tal proposta. **Método** - Amostras de esgoto bruto (5) e tratado (6), de águas superficiais (11), de poço (3) e de nascente (1) foram coletadas e concentradas pela técnica de membrana filtrante modificada ou por centrifugação. O DNA genômico foi extraído pelo método de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico. A amplificação do fragmento de 890pb do gene *gdh*, que codifica a produção de glutamato desidrogenase, foi realizada por nested PCR, seguida por clonagem e sequenciamento de nucleotídeos. **Resultados** - Onze dentre as vinte e seis amostras analisadas (42,3%) foram confirmadas como sendo positivas para a presença de *Giardia duodenalis*. Os agrupamentos A, genótipo AII, e B foram encontrados. **Conclusão** - Esses achados indicam que, no estado de São Paulo, isolados

de *Giardia* associados a giardíase humana estão presentes em esgoto tratado e em água superficial e de poço, de modo que o contato com esse tipo de matriz pode representar risco para a saúde pública. Além disso, a estratégia proposta possibilita a caracterização molecular de isolados de *Giardia* de amostras de água e esgoto.

Descritores: *Giardia*, água, esgoto, saúde pública, genotipagem.

ABSTRACT

Fernandes LN. **Molecular characterization of *Giardia* isolates in water and sewage samples from São Paulo State** [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2009.

Introduction - *Giardia* is a protozoan that parasitizes almost all classes of vertebrates, causing giardiasis. Among the seven assemblages of *G. duodenalis*, named A to G, only A and B have been found in humans by this moment. As considered a waterborne pathogen, the detection of cysts in water and sewage samples is of interest for public health. Once conventional methods are not able to distinguish Assemblages A and B of *G. duodenalis* from others, the application of techniques that allow a molecular characterization of *Giardia* isolates is an important issue, especially in Brazil, where there is scarce information about the genotypes of this parasite in the environment. **Objective** - To detect and identify *Giardia* genotypes in water and sewage samples from São Paulo state, discussing the importance of findings for public health, as well as develop a strategy that makes it possible. **Method** - Raw (5) and treated (6) sewage, surface (11), well (3) and spring (1) water samples were collected and concentrated by modified membrane filtration technique or centrifugation. Genomic DNA was extracted using phenol/chloroform/isoamyl alcohol method. A 890bp fragment of *gdh* gene, that codes the glutamate dehydrogenase production, was amplified by nested PCR. Cloning and sequencing were subsequently done. **Results** - 11 out of 26 (42,3%) samples were confirmed to be positive for the presence of *G. duodenalis*. Assemblages A, genotype All, and B were found. **Conclusions** - These findings indicate that, in São Paulo state, *Giardia* isolates associated to human giardiasis are present in treated sewage and in surface and well water. Thereby, the contact with these matrices can offer risk for public health. Besides, the approach described here allows the molecular characterization of *Giardia* isolates from water and sewage samples.

Descriptors: *Giardia*, water, sewage, Public Health, genotyping.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Histórico.....	17
1.2 Taxonomia.....	20
1.3 Ciclo de vida, transmissão e sintomatologia.....	25
1.4 Epidemiologia.....	28
1.5 Biologia molecular no estudo de <i>Giardia</i>	34
1.6 Justificativa.....	46
2 OBJETIVOS.....	47
2.1 Objetivo geral.....	47
2.2 Objetivos específicos.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 Coleta das amostras de água e esgoto.....	48
3.2 Concentração das amostras de água e esgoto.....	56
3.3 Purificação das amostras de água e esgoto.....	58
3.4 Extração do DNA genômico.....	59
3.5 PCR, eletroforese em gel de agarose e purificação do amplicon.....	60
3.6 Clonagem.....	63
3.7 Sequenciamento do fragmento amplificado do gene GDH....	64
3.8 Análise das seqüências de nucleotídeos.....	65
4 RESULTADOS.....	66
4.1 Detecção de <i>Giardia</i> em amostras de água e esgoto.....	66
4.2 PCR.....	66
4.3 Clonagem, sequenciamento e análise filogenética.....	72
5 DISCUSSÃO.....	76
6 CONCLUSÕES.....	90
7 RECOMENDAÇÕES.....	91
8 REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Espécies do gênero <i>Giardia</i> atualmente reconhecidas e seus respectivos hospedeiros.	20
Quadro 2 -	Agrupamentos observados dentro da espécie <i>G. duodenalis</i> e seus respectivos hospedeiros.	21
Quadro 3 -	Nova classificação de <i>Giardia</i> proposta por MONIS et al. (2009).	24
Quadro 4 -	Deteção, concentração e caracterização molecular de cistos de <i>Giardia</i> de amostras de água e esgoto provenientes de diferentes locais.	39
Quadro 5 -	Pesquisas realizadas em diferentes países, nas quais a caracterização molecular de isolados de <i>Giardia</i> de fezes humanas foi realizada.	43
Quadro 6 -	Amostras de água e esgoto coletadas e seus respectivos locais de coleta e volume.	49
Quadro 7 -	Resultados da PCR realizada com DNA em diferentes diluições.	68
Quadro 8 -	Resultados da PCR realizada em cinco réplicas.	69
Quadro 9 -	Resultados da PCR realizada após armazenar o DNA a 4°C por um ou mais meses a partir de amostras submetidas a técnica de Faust, anteriormente	

consideradas positivas na PCR. 71

Quadro 10 - Número de colônias selecionadas após clonagem,
avaliação da clonagem por PCR, desempenho e
resultado do sequenciamento. 73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do parasito <i>Giardia</i>	27
Figura 2	Quatro principais ciclos de transmissão de <i>Giardia duodenalis</i>	33
Figura 3	Entrada 7 do lago das Garças.	53
Figura 4	Vista da ETE Piracicamirim.	54
Figura 5	Poços localizados no distrito de Palmeiras de São Paulo, Município de Suzano (SP).	55
Figura 6	Técnica de membrana filtrante modificada (Araújo et al 2006).	57
Figura 7	Extração do DNA genômico, realizada pelo método do fenol/clorofórmio modificado (Araújo et al., 2006)... ..	60
Figura 8	DNA extraído de uma amostra de água superficial após concentração pela técnica de membrana filtrante modificada e purificação pela técnica de Faust (A) e após o mesmo método de concentração, porém sem realização de purificação (B).	70
Figura 9	Foto de eletroforese em gel de agarose a 1,8%, corado com brometo de etídio e realizado após a segunda etapa da nested PCR para visualização do fragmento de 890pb amplificado do gene <i>gdh</i> de	

	<i>Giardia</i>	72
Figura 10	Foto de eletroforese em gel de agarose a 1,8% realizada após PCR com os iniciadores M13 (direto e reverso) a partir das colônias oriundas da clonagem...	74
Figura 11	Eletroforese em gel de agarose do produto da extração de plasmídeo das células que receberam o inserto durante a clonagem.	74
Figura 12	Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de cerca de 825pb das seqüências do gene <i>gdh</i> dos isolados de <i>Giardia</i> obtidos no presente trabalho e de seqüências provenientes do Genbank.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β giardina	beta giardina
BSA	soro albumina bovina
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CIEP	<i>countercurrent immunoelectrophoresis</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<i>ef1α</i>	fator de elongação 1 alfa
EDTA	ácido etileno diamoni tetracético
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
ETE	estação de tratamento de esgoto
FSP	Faculdade de Saúde Pública
<i>g</i>	gravidade terrestre
<i>Gdh</i>	glutamato desidrogenase
HCl	ácido clorídrico
HSA	Departamento de Saúde Ambiental
IFA	ensaio de imunofluorescência
IMS	separação imunomagnética
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
M	Molar
MLGs	genótipos multilocus
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase

PVP	polivinilpirrolidona
qPCR	PCR quantitativa
RFLP	restriction fragment length polymorphism
Sabesp	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEMAE	Serviço Municipal de Água e Esgoto
SNP	single nucleotide polymorphism
<i>SSU rRNA</i>	small subunit ribosomal RNA
UGRHI	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
<i>tpi</i>	triose fosfato isomerase
Tris	hidroximetil aminometano
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Giardia é um protozoário flagelado que parasita o intestino de quase todas as classes de vertebrados, sendo responsável pela doença chamada giardíase, que afeta principalmente crianças de países em desenvolvimento (THOMPSON, 2004; MONIS et al., 2009).

Trata-se de um microorganismo anaeróbio, porém aerotolerante, de organização celular simples, com ausência de mitocôndrias e peroxissomos, mas com um sistema secretório vesicular primitivo (THOMPSON, 2004).

Segundo MONIS et al. (2009), a filogenia desse protozoário ainda é controversa e pode ser explicada por duas teorias diferentes. Uma sugere que a *Giardia* pertence a uma linhagem de eucariotos que divergiu antes da aquisição da mitocôndria (THOMPSON e MONIS, 2004), e a outra propõem que esse protozoário pertence a uma linhagem de eucariotos que se adaptou a condições microaerofílicas (MORRISON et al., 2007).

Esse microorganismo foi observado pela primeira vez por Antony van Leeuwenhoek (1681), mas somente em 1859 foi descrito detalhadamente por Vilem Lambl. A seguir, foi relatado em coelhos por Davaine (1875) e em anfíbios por Kunstler (1882) (citados por FAUBERT, 2000; THOMPSON, 2004; MONIS et al., 2009).

Mais de 50 espécies de *Giardia* já foram descritas principalmente com base na ocorrência em um determinado hospedeiro, no entanto, em 1952, Filice (citado por THOMPSON, 2004; MONIS et al., 2009) propôs uma nova divisão, baseada em características morfológicas distinguíveis por meio de microscópio óptico, mais especificamente, a forma dos corpos medianos e o formato e comprimento do trofozoíto. Assim, três espécies passaram a ser reconhecidas: *G. duodenalis*, *G. agilis* e *G. muris*.

O conhecimento a respeito do gênero *Giardia* aumentou amplamente na década de 70. Nesse período foi publicado um estudo clínico, no qual os autores detectaram malabsorção e alteração de determinada parte do intestino em indivíduos dos quais esse patógeno havia sido isolado (FAUBERT, 2000).

Devido a associação entre castores infectados e surtos de giardíase em humanos, provocados pela utilização da água onde localizavam-se tais animais, a *Giardia* passou a ser considerada um parasita zoonótico. Além disso, foi adicionada à lista de patógenos parasitários (WHO, 1979 e 1981).

Anos mais tarde, com o emprego do microscópio eletrônico, outras espécies de *Giardia* foram descritas: *G. psittaci*, *G. microti* e *G. ardeae* (ERLANDSEN e BEMRICK, 1987; FEELY, 1988; ERLANDSEN et al. 1990a).

Estudos de transmissão cruzada foram realizados com o objetivo de entender melhor a especificidade de certos isolados de *Giardia* a um hospedeiro e a questão da giardíase como uma zoonose. No entanto, uma limitação desses trabalhos foi o uso de isolados de *Giardia* não caracterizados geneticamente (THOMPSON, 2004; MONIS et al., 2009).

A possibilidade de realizar cultura “in vitro” de isolados de *Giardia* foi um grande avanço para o estudo desse parasita, pois forneceu material suficiente para a caracterização genética pela técnica de análise de isoenzimas. No entanto, uma dificuldade encontrada na aplicação dessa técnica é o fato de nem todos os isolados crescerem em tais culturas, o que dificultou a obtenção de dados representativos (THOMPSON, 2004).

Apesar da limitação da técnica anteriormente relatada, sua aplicação, em conjunto com procedimentos de análise de DNA, revelou diferenças genéticas entre os isolados da espécie *G. duodenalis*, que embora apresentassem similaridade morfológica, passaram a ser enquadrados em grupos, nomeados 1, 2 e 3 na América do Norte, “Polonês” e “Belga” na Europa, e ainda *Assemblages* (agrupamentos) A e B na Austrália (NASH et al., 1985; HOMAM et al., 1992; MAYRHOFER et al., 1995).

Anos mais tarde a heterogeneidade genética em *G. duodenalis* foi confirmada, e, além disso, foi observado que os isolados pertencentes aos

grupos “Polonês”, 1, 2 e *Assemblage* A eram correspondentes, assim como os grupos “Belga”, 3 e *Assemblage* B (MONIS et al., 1996).

Outros autores relataram a existência de isolados de *G. duodenalis* que apresentavam diferenças genéticas em relação aos grupos previamente detectados e que pareciam ser específicos a determinados hospedeiros, sendo esses: *Assemblage* C e D, em cães; E em bovinos, ovinos e suínos; F, em gato e G, em rato doméstico (HOPKINS et al., 1997; EY et al., 1997; MONIS et al., 1998; MONIS et al., 1999).

Dentre os nomes citados acima, utilizados para elucidar a heterogeneidade existente em *G. duodenalis*, o termo *Assemblage* (agrupamento) parece ter maior aceitação entre os pesquisadores, e por essa razão foi adotado nesse trabalho.

Embora a microscopia e os métodos baseados em imunologia sejam reconhecidos na detecção de *Giardia* em amostras clínicas e ambientais, a recente aplicação das técnicas moleculares, que são altamente sensíveis e específicas, tem possibilitado a caracterização genética dos isolados de *Giardia*, auxiliando na taxonomia e na epidemiologia desse protozoário (MONIS e ANDREWS, 1998; THOMPSON, 2004).

Outro aspecto relevante sobre esse parasita se deu em 2004, com sua inclusão na “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da Organização Mundial da Saúde, que busca estratégias de controle para doenças que ocorrem principalmente em países em desenvolvimento (SAVIOLI et al., 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Portaria nº518, de 25 de março de 2004, recomendou a inclusão da pesquisa de *Giardia* em água para consumo humano, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência de cistos desse protozoário, estimulando as empresas de tratamento de água para maior atenção acerca desse parasita.

Por fim, um destaque no estudo desse microorganismo se deu recentemente, com o trabalho de MORRISON et al. (2007), que sequenciaram o genoma de *G. duodenalis* WB clone C6 (ATCC 50803), cujo tamanho é de 11,7MB, distribuído em cinco cromossomos. Embora os dados

publicados por esses autores contribuam com o entendimento desse protozoário, também levantam questões para as quais serão necessários estudos futuros, tais como o número e a distribuição de íntrons, a manutenção de homozigose apesar da existência de dois núcleos e a função dos genes descobertos.

1.2 TAXONOMIA

Os organismos do gênero *Giardia* pertencem ao Reino Protista, Filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida e Família Hexamitidae (LEVINE et al., 1980).

O Quadro 1 mostra as espécies de *Giardia* reconhecidas atualmente e seus respectivos hospedeiros (THOMPSON, 2004).

Quadro 1. Espécies do gênero *Giardia* atualmente reconhecidas e seus respectivos hospedeiros.

Espécie	Hospedeiro
<i>G. duodenalis</i>	Homem e mamíferos domésticos e silvestres
<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: Thompson, 2004 (adaptado).

Dentre essas espécies, somente *Giardia duodenalis* foi encontrada no homem, no entanto também foi detectada em outros mamíferos, domésticos e silvestres (THOMPSON et al., 2000).

O Quadro 2 mostra os sete agrupamentos de *G. duodenalis* e seus respectivos hospedeiros.

Quadro 2. Agrupamentos observados dentro da espécie *G. duodenalis* e seus respectivos hospedeiros.

Agrupamento	Hospedeiros	Fonte
A	Homem, bovinos, gato, cão, castor	Homan et al, 1992; Nash et al 1995; Mayhofer et al, 1995; Monis et al., 1996
B	Homem, cão, castor, rato	
C	Cão	Hopckins et al., 1997; Monis et al., 1998
D	Cão	
E	Bovinos, ovinos, suínos	Ey et al., 1997; Monis et al., 1999
F	Gato	
G	Rato doméstico	

Fonte: THOMPSON, 2004 (adaptado).

Até recentemente apenas os agrupamentos A e B foram observados no homem, mas também em outros mamíferos (LALLE et al. 2005a; SMITH et al., 2006; ROBERTSON et al., 2007; SOUZA et al., 2007; MINVIELLE et al., 2008), sendo por isso conhecidos como zoonóticos. Os demais agrupamentos apresentam especificidade a grupos restritos de hospedeiros. Em 2004, THOMPSON, em sua revisão, apontou que, dentre os agrupamentos de importância para saúde pública, A consistia de dois genótipos mais comumente relatados: AI, encontrado no homem e em outros animais e AII, composto de isolados humanos. Segundo esse autor, os isolados do agrupamento B poderiam ser separados principalmente em dois genótipos, nomeados BIII e BIV. Entretanto, outros pesquisadores não confirmam essa estruturação do agrupamento B (van der GIESSEN et al, 2006; SOUZA et al., 2007).

Outros genótipos mencionados na literatura são: A1 a 7 e 9, B1 a 4, 7, 8 e 19, isolados de fezes humanas e caracterizados pela análise do gene β

giardina (CACCIÒ et al., 2002; LALLE et al., 2005a; GELANEW et al., 2007) e WA1 a 5 e WB1 a 10, detectados em esgoto bruto e identificados após análise de fragmento do gene *tpi* (SULAIMAN et al., 2004). Esses relatos mostram que a nomenclatura dos genótipos de *Giardia duodenalis* ainda não está totalmente definida.

ROBERTSON et al. (2006, 2007), após realizarem a caracterização molecular de isolados de *Giardia* de amostras fecais humanas pelos genes *gdh*, β *giardina* e *tpi*, obtiveram algumas seqüências que, em geral, apresentavam diferenças de até quatro SNPs em relação às seqüências dos genótipos de *Giardia* previamente descritas. Esses pesquisadores levantaram questão sobre quais seriam os critérios adequados para descrever novos genótipos, e embora não o tenham feito, citaram os autores LALLE et al. (2005a), que descreveram um novo genótipo com base em um único SNP.

ROBERTSON et al. (2006) apontaram outra problemática devido a achados em seu estudo. Um mesmo isolado podia ser enquadrado em genótipos diferentes se caracterizado por mais de um gene. Um exemplo foi o de certo isolado identificado como B3 pelo gene β *giardina* e como B2 pelo *gdh*. À esses achados os autores atribuíram a possibilidade de presença de mais de um isolado em uma mesma amostra ou de heterozigose de seqüência alélica. Além disso, recomendaram cuidado na caracterização de determinado isolado por apenas um gene e ressaltaram que mais atenção deve ser dada a esse tópico em pesquisas futuras. No entanto, READ et al. (2004), ao analisarem isolados de *Giardia* de fezes de cães e gatos por meio dos genes *gdh* e *SSU rRNA*, já haviam detectado achados semelhantes, que foram explicados pela possível presença de infecções mistas, de modo que um isolado teria sido preferencialmente amplificado em um dos genes.

Embora a presença de mais de um isolado em uma mesma amostra seja a explicação mais aceita para resultados como os de READ et al. (2004) e ROBERTSON et al. (2006, 2007), uma vez que foi observado que o genoma de *Giardia* apresenta baixo nível de heterozigose de seqüência alélica, evidências recentes de recombinação genética nesse protozoário

levantaram uma outra hipótese para entender tais dados: a de reprodução sexuada (RAMESH et al., 2005; MORRISON et al., 2007; COOPER et al., 2007; POXLEITNER et al., 2008; CACCIÒ et al., 2009).

Recentemente, CACCIÒ et al. (2008) estudaram o nível de variação genética dentro de isolados dos agrupamentos A e B, obtidos a partir de amostras clínicas de humanos e animais, com base em quatro marcadores moleculares (*SSU rRNA*, β *giardina*, *gdh*, *tpi*). Assim, para isolados do agrupamento A, foi possível definir três subagrupamentos (AI, AII e AIII) e seis genótipos (A1 a 6) quando a análise foi realizada por meio de cada marcador, sendo uma exceção o gene *SSU rRNA*. Além disso, a análise simultânea dos resultados de genotipagem obtidos pelo emprego dos três marcadores permitiu identificar 10 genótipos multilocus (MLGs) (AI-1 e 2, AII-1 a 7 e AIII-1). Nesse trabalho não foi possível definir MLGs para o agrupamento B.

Embora a pesquisa de CACCIÒ et al. (2008) auxilie a esclarecer problemas relacionados à estruturação e nomenclatura dentro do agrupamento A de *G. duodenalis*, bem como ao enquadramento de um isolado em determinado agrupamento ou genótipo, sua aceitação por outros pesquisadores é necessária.

No presente trabalho, a classificação em MLGs não pode ser realizada pois empregou-se apenas o gene *gdh* para a análise dos isolados de *Giardia*. A estruturação do agrupamento A em três subagrupamentos e seis genótipos também não foi utilizada.

Ainda em relação aos agrupamentos A e B, a distância genética que divide esses dois grupos é maior que a usada para separar algumas espécies de protozoários, de modo que há alguns anos é considerada a possibilidade de serem espécies diferentes (THOMPSON e MONIS, 2004). No entanto, foi só recentemente que MONIS et al. (2009) propuseram uma revisão da taxonomia desse protozoário, separando os diferentes agrupamentos de *G. duodenalis* em novas espécies, revisão essa justificada por duas razões: a necessidade de reconhecer as diferenças biológicas e evolucionárias dos isolados de *G. duodenalis*, principalmente a

especificidade a um determinado hospedeiro, e o fato de que o reconhecimento dos agrupamentos como espécies diferentes pode afetar o posicionamento das autoridades frente ao potencial zoonótico e a ameaça à saúde humana. O Quadro 3 mostra a nova classificação proposta.

Quadro 3. Nova classificação de *Giardia* proposta por MONIS et al. (2009).

Espécie (= agrupamento)	Hospedeiro
<i>G. duodenalis</i> (= agrupamento A)	Homem e outros primatas, cães, gatos, bovinos, roedores, outros mamíferos silvestres
<i>G. enterica</i> (= agrupamento B)	Homem e outros primatas, cães, algumas espécies de mamíferos silvestres
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. canis</i> (= agrupamento C e D)	Cães, outros canídeos
<i>G. cati</i> (= agrupamento F)	Gatos
<i>G. bovis</i> (= agrupamento E)	Bovinos, ovinos, suínos
<i>G. simondi</i> (= agrupamento G)	Ratos

Fonte: MONIS et al., 2009 (adaptado).

Esses autores esperam que sua proposta seja discutida por outros grupos, originando um consenso e uma nova nomenclatura para os agrupamentos de *Giardia duodenalis*.

1.3 CICLO DE VIDA, TRANSMISSÃO E SINTOMATOLOGIA

Giardia é um protozoário eurixeno, de ciclo biológico monoxeno, que apresenta duas formas evolutivas, os cistos e os trofozoítos (ADAM, 1991).

Os cistos são estruturas ovais de 8 a 14µm de comprimento por 7 a 10µm de largura. Apresentam membrana cística, dois a quatro núcleos, dois pares de corpos parabasais e axonema. São encontrados nas fezes de seu hospedeiro e no ambiente, sendo considerados a forma infectante e de resistência ambiental, podendo permanecer viáveis por até três meses em água a 4°C (ADAM, 1991; FAUBERT, 2000).

Essa forma pode apresentar resistência a alguns processos convencionais de tratamento de água destinada ao consumo humano, tal como as barreiras físicas, em menor escala, e as etapas de desinfecção (que geralmente consistem do emprego de cloro, cloraminas, dióxido de cloro, ozônio e radiação UV) (SMITH et al., 2006; WHO, 2006). Um estudo mostrou que, em condições operacionais ótimas, a remoção de cistos após a etapa de filtração fica em torno de 99% (FRICKER e CRABB, 1998), o que indica que pequena parcela dessas estruturas pode passar por esse obstáculo. Em outro estudo, CARMENA et al. (2007) analisaram amostras de água de torneira (82), tratada apenas por cloração, e de água bruta (31) e tratada (26) de pequenas estações de tratamento de água, que adotavam processos de filtração rápida e/ou cloração. Cistos de *Giardia* foram detectados em 26,8%, 42,5% e 19,2% de tais amostras, respectivamente.

Os trofozoítos apresentam dimensões de 12 a 15µm de comprimento e 6 a 8µm de largura. Apresentam formato de pêra e possuem dois núcleos, um par de axonemas, um par de corpos parabasais, disco adesivo e quatro pares de flagelos. Trata-se da forma móvel desse parasita, sendo considerado não invasivo, é encontrado em fezes líquidas e no intestino de seus hospedeiros (THOMPSON, 2004).

A transmissão da giardíase se dá pela via fecal-oral e pode ocorrer de forma direta, pelo contato pessoa-pessoa, ou indireta, pela ingestão de

água ou alimentos contaminados com cistos de *Giardia* (THOMPSON, 2004; SLIFKO et al., 2000). A dose infectante é de 10 a 100 cistos e o período de incubação pode variar de 3 a 25 dias (Rendtorff, 1954 citado por SMITH et al., 2006; FURNESS et al., 2000). Uma vez ingeridos, os cistos sofrem o processo de excistação ao chegarem no duodeno. Assim, cada cisto origina dois trofozoítos que se aderem à parede do intestino, onde passam a se alimentar por pinocitose e a se reproduzir por divisão binária. Em dado momento os trofozoítos sofrem o processo de encistação e são eliminados de maneira intermitente nas fezes do hospedeiro, permanecendo no ambiente e reiniciando o ciclo (FAUBERT, 2000). Os trofozoítos também podem ser eliminados nas fezes líquidas, porém, como não conseguem sobreviver no ambiente não são capazes de infectar novos hospedeiros. Um homem infectado pode liberar até 2×10^6 cistos por grama de fezes (SMITH et al., 2006).

Atualmente há algumas evidências de reprodução sexuada em *Giardia*. MELONI et al. (1995) realizaram um estudo de genética populacional de *Giardia* em comunidades endêmicas, com alta frequência de transmissão, e detectaram evidências de troca de material genético nesse protozoário. Anos mais tarde esses achados foram confirmados pelos estudos de RAMESH et al. (2005), COOPER et al. (2007) e POXTELEITNER et al. (2008). MONIS et al. (2009) concluem que é possível que os eventos de recombinação em *Giardia* sejam raros e que outros estudos de genética populacional devem ser realizados em locais onde a frequência de transmissão é alta.

Na Figura 1 observa-se o ciclo de vida de *Giardia*.

Figura 1. Ciclo de vida do parasita *Giardia*.

Fonte: CDC (www.medicine.mcgill.ca)/(adaptado).

O diagnóstico da infecção é feito pela detecção de cistos e trofozoítos nas fezes do hospedeiro. A técnica mais utilizada para tal é a microscopia, embora existam outras, como os imunodiagnósticos e a PCR (THOMPSON, 2004; SAVIOLI et al., 2006).

Os indivíduos portadores desse protozoário podem ser assintomáticos ou sintomáticos, e nesses últimos os principais sintomas são diarreia aguda ou crônica, dor abdominal, perda de peso, desidratação, má absorção dos nutrientes, fadiga e crescimento e desenvolvimento cognitivo afetado, no caso de crianças. A severidade da doença dependerá dos fatores de virulência do parasita, da idade, estado imunológico e nutricional do hospedeiro e do número de cistos ingeridos (FAUBERT, 2000; THOMPSON, 2004; SAVIOLI et al., 2006).

Ainda não se sabe porque alguns indivíduos apresentam manifestações clínicas e outros não (SAVIOLI et al., 2006). No entanto, foi observado que apesar de não se conhecer nenhum fator de virulência ou

toxina, é possível que a expressão variável de proteínas superficiais possibilitem evasão de respostas imunes do hospedeiro e adaptação a diferentes ambientes (MORRISON et al., 2007; MONIS et al., 2009).

Alguns pesquisadores estudaram a relação entre o genótipo responsável pela infecção e os sintomas apresentados pelo hospedeiro.

HOMAN E MANK (2001) encontraram associação do agrupamento A com diarreia intermitente e do B com diarreia persistente. READ et al. (2002), relataram que crianças infectadas pelo agrupamento A apresentavam maior probabilidade de ter diarreia do que as que abrigavam o agrupamento B. Em outros dois trabalhos o agrupamento A foi associado a sintomas de diarreia e B a infecções assintomáticas (AYDIN et al., 2004; HAQUE et al., 2005). Por fim, GELANEW et al., em 2007, observaram que o agrupamento B estava mais associado a infecções sintomáticas do que o A. Por outro lado, esse tipo de associação não foi observada em outras pesquisas (HOPKINS et al., 1997; LALLE et al., 2005a), de modo que os autores concordam que estudos futuros a esse respeito sejam necessários.

Embora existam drogas eficazes no tratamento da giardíase, tais como os Nitroimidazóis e os Benzimidazóis, a re-infecção pode ocorrer se a fonte de contaminação ambiental não for eliminada (THOMPSON, 2004).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

A espécie *Giardia duodenalis* apresenta distribuição global. Estima-se que cerca de 280 milhões de infecções anuais sejam causadas no homem por esse protozoário (LANE e LLOID, 2002). Trata-se do parasita intestinal humano mais comum em países desenvolvidos, sendo a incidência da giardíase, nos Estados Unidos, estimada em 2,5 milhões de casos por ano (FURNESS et al., 2000). Na África, Ásia e América Latina cerca de 200 milhões de pessoas apresentam giardíase sintomática e há 500 mil casos novos notificados a cada ano (WHO, 1996).

A prevalência de indivíduos com exame de fezes positivo para esse parasita é de 2 a 5% em países desenvolvidos e de 20 a 30% em países em desenvolvimento (ALMEIDA et al., 2006).

Pesquisas recentes investigaram a presença desse protozoário em crianças de diferentes estados do Brasil.

MASCARINI E DONALÍSIO (2006) realizaram dois estudos transversais com crianças em creches municipais de Botucatu (SP) e detectaram prevalência de giardíase de 23,7% em 2002 e 21,4% em 2003.

PITTNER et al. (2007) avaliaram a prevalência de enteroparasitoses em escolares no Paraná. O maior índice de infecção se deu por *Giardia*, e foi de 50,73%.

CARVALHO-COSTA et al. (2007) estimaram a frequência de parasitas intestinais em 218 crianças com diarreia aguda e desidratação grave, internadas em um hospital pediátrico localizado no Rio de Janeiro. *Giardia* foi o segundo parasita mais frequente, encontrado em 4,7% das amostras.

Outros pesquisadores determinaram a prevalência de *Giardia* em crianças hospitalizadas com diarreia em Goiânia (GO), detectando 9,9% das fezes analisadas positivas para *Giardia* (PEREIRA et al., 2007).

No Rio Grande do Sul, a variação da prevalência de enteroparasitoses foi investigada em escolares, durante 35 anos. Dentre os 9.787 exames de fezes analisados, 24% foram positivos para *Giardia*. Nesse trabalho foi constatado que, embora uma redução na prevalência de outros parasitas durante esse período tenha sido observada, não houve alteração significativa na prevalência de giardíase, provavelmente pelo fato dos hospedeiros infectados por esse protozoário eliminarem cistos infectantes nas fezes, permitindo uma contaminação interpessoal, mesmo em ambientes saneados (BASSO et al., 2008).

Em outra pesquisa, a ocorrência de *Giardia* em crianças foi de 27,5%, em Minas Gerais (MACHADO et al., 2008).

Nesse mesmo estado, SILVA et al. (2009) encontraram prevalência de *Giardia* de 26,3% também em infantes, e observaram associação de fatores socioeconômicos e ambientais à infecção por esse protozoário.

Um estudo transversal realizado na Bahia detectou *Giardia* em 13,5% das 629 crianças participantes (MATOS et al., 2008).

Por fim, em Presidente Bernardes (SP), um grupo de pesquisadores, ao analisar amostras de fezes de crianças que freqüentam determinada creche, detectou prevalência de giardíase de 16%. A análise das fezes dos familiares de tais crianças e dos funcionários da creche também foi realizada. Algumas mães e irmãos estavam sendo parasitados por esse protozoário. No entanto, como a técnica de RAPD foi empregada, foi possível concluir que as crianças provavelmente adquiriram essa parasitose durante o período de estada na creche, pelo contato pessoal entre elas, já que a maioria dos isolados dessas crianças foi enquadrado em um dentre os três grupos genéticos encontrados, e os isolados dos familiares nos outros dois grupos (TASHIMA et al., 2009).

A *Giardia* tem sido considerada um patógeno re-emergente devido ao seu crescente papel em surtos de diarreia em crianças que freqüentam creches e pelas altas taxas de giardíase em animais como bezerros, cães e gatos (THOMPSON, 2000).

Dentre os surtos de giardíase documentados nos Estados Unidos, 90% ocorrem por meio de água contaminada com cistos infectantes, e somente 10% pela contaminação de alimentos (ROSE e SLIFKO, 1999).

Nesse país, a análise de um período de dez anos de vigilância revelou que os surtos de gastroenterite humana reportados, associados à água recreacional e potável, tiveram *Giardia* como agente em 9,4% e 16,2%, respectivamente (HLAVSA et al., 2005).

Em uma revisão, KARANIS et al. (2007) relataram que 325 surtos, associados à transmissão de protozoários patogênicos pela água, foram documentados principalmente na América do Norte e Europa. Desses, 104, ou seja, 32%, estavam associados à contaminação de sistemas de água potável por *Giardia duodenalis*.

A presença desse parasita é documentada em amostras de água e esgoto no Brasil (Quadro 4).

No estado de São Paulo, a detecção de *Giardia* foi de 100% e 58,3% em esgoto bruto, nos trabalhos de DIAS JÚNIOR (1999) e FRANÇA e FRANCO (2006), respectivamente. Em Minas Gerais, a presença desse parasita foi encontrada em 100% das amostras de esgoto bruto analisadas por HELLER et al. (2004).

Em diversos estudos também é relatada a presença do protozoário em questão em águas superficiais, e nesses casos, a positividade das amostras variou de 27 a 100% (DIAS JÚNIOR et al., 1999; FRANCO et al., 2001; HELLER et al., 2004; HACHICH et al., 2004; CANTUSIO NETO e FRANCO, 2004; OLIVEIRA, 2005; NISHI et al., 2007).

Em outros países também há diversos relatos de *Giardia* em amostras ambientais (Quadro 4). No entanto, a importância para a saúde pública de cistos de *Giardia* presentes em água e esgoto ainda não é totalmente conhecida, uma vez que em poucos estudos é realizada a caracterização molecular de cistos provenientes do ambiente. Isso faz com que as autoridades assumam que qualquer cisto de *Giardia* encontrado nesse tipo de amostra seja considerado potencialmente infeccioso para o homem. Assim, a identificação molecular de tais cistos poderia trazer benefícios econômicos e maior significado para saúde (SULAIMAN et al., 2004; PLUTZER et al., 2008).

Uma das fontes de cistos de *Giardia* em água são os esgotos (SAVIOLI et al., 2006), que mesmo quando tratados ainda podem representar risco de contaminação para o ambiente, pois os tratamentos comumente empregados podem não remover totalmente essas estruturas (CACCIÒ et al., 2003; CASTRO-HERMIDA et al., 2008).

Tais dados alertam para os riscos envolvidos no uso de água residuária tratada para fins agrícolas, pois esse ato pode levar a contaminação de alimentos e conseqüente infecção em animais, que mesmo sem apresentar sintomas, podem amplificar o número de patógenos e os disseminar no ambiente, inclusive em águas superficiais, ou ainda transmitir o protozoário

diretamente para o homem (HANCOCK et al., 2001; ENRIQUEZ et al., 2001).

Durante os processos de tratamento de água residuária, os cistos de *Giardia* precipitam, de modo que o lodo de esgoto gerado pode apresentar de 10^5 a 10^6 cistos/kg⁻¹ (STRAUB et al., 1993; THIRIAT et al., 1997). Um estudo realizado em Campinas (SP) apontou a presença de *Giardia* em 100% das amostras de lodo de esgoto analisadas. Assim, o depósito desse material em terras agrícolas pode ocasionar contaminação de pastos e águas superficiais, colocando em risco a saúde humana e de animais (STRAUB et al., 1993; BONATTI et al., 2007).

O papel dos animais na contaminação da água por esse protozoário vem sendo discutida por diferentes autores. Algumas epidemias na América do Norte foram relacionadas à contaminação da água com cistos de *Giardia* excretados por animais como castores e ratos almiscarados (ERLANDSEN et al., 1990b; KARANIS et al., 1996). No entanto, THOMPSON (2004), em sua revisão, observou que é pouco provável que animais domésticos e silvestres sejam considerados a fonte de contaminação da água no caso de surtos, e que provavelmente é o homem que contamina a água. Como consequência, os mamíferos aquáticos tornam-se infectados e amplificam o número de isolados de *Giardia* no meio ambiente.

Outra questão epidemiológica freqüentemente investigada e discutida por diversos autores é o potencial zoonótico do parasita em questão.

HUNTER e THOMPSON (2005), em uma revisão, identificaram oito estudos do tipo caso-controle, relatados desde o início dos anos 90 em países desenvolvidos. Tais autores observaram que temas recorrentes relacionados a giardíase eram: viajar, nadar em águas superficiais, beber água e ter contato com crianças que usam fralda. Apenas um estudo teve associação significativa com o contato de animais de fazenda e de estimação. Ainda nesse trabalho, cinco estudos realizados em países em desenvolvimento foram revisados, estudos esses que relataram o saneamento e a higiene pessoal como sendo os principais fatores de risco para a giardíase. Para esses autores tais achados sugerem que a

transmissão zoonótica não é a principal forma de disseminação dessa doença.

Apesar disso, a aplicação de técnicas de biologia molecular em estudos epidemiológicos mostrou a existência de quatro ciclos principais de transmissão do protozoário em questão (Figura 2), bem como evidências de interação entre esses ciclos, o que poderia ocasionar uma zoonose (THOMPSON, 2004; HUNTER e THOMPSON, 2005; MONIS et al., 2009).

Figura 2. Quatro principais ciclos de transmissão de *Giardia duodenalis*.
Fonte: Monis et al., 2009 (adaptado).

Alguns estudos de genotipagem de isolados de *Giardia* indicam o potencial zoonótico desse protozoário por terem revelado o mesmo genótipo presente no homem e em animais.

VAN KEULEN et al. (2002), após analisarem uma sequência do gene *SSU rRNA* por meio de PCR-RFLP, encontraram os agrupamentos A e B de *G. duodenalis* em amostras de fezes humanas, de animais de estimação, de fazenda e silvestres e em amostras ambientais. Para esses autores, isso

mostra que diversos animais produzem cistos que podem ser infecciosos para o homem.

LALLE et al. (2005a) encontraram isolados dos agrupamentos A e B em humanos, cães e gado após análise molecular do gene que codifica a produção da proteína β -giardina.

TRAUB et al. (2004) e INPANKAEW et al. (2007) ressaltaram que cães domésticos podem ter papel importante na transmissão zoonótica de giardíase, uma vez que detectaram isolados de *Giardia* de um mesmo agrupamento em cachorros e homens que vivem em um mesmo local.

Assim, embora existam evidências de que a transmissão zoonótica de *Giardia* ocorra, diversos autores concordam que dados sobre a frequência dessa transmissão são escassos e recomendam a obtenção dos mesmos por meio de estudos epidemiológicos que genotipem os isolados de *Giardia* de hospedeiros em focos endêmicos e de casos positivos em pesquisas de vigilância longitudinal (HUNTER e THOMPSON, 2005; THOMPSON, 2004; MONIS et al., 2009).

1.5 BIOLOGIA MOLECULAR NO ESTUDO DE *Giardia*

O método clássico para a detecção de *Giardia* em amostras de fezes é a microscopia, cuja sensibilidade foi estimada entre 50 e 70% (BURKE, 1975). Uma vantagem dessa técnica é que permite a detecção simultânea de outros parasitas. No entanto, uma limitação para seu uso é o fato de sua sensibilidade depender das habilidades do microscopista (JOHNSTON et al., 2003; SCHUURMAN et al., 2007).

Recentemente imunodiagnósticos (testes baseados na coloração com anticorpos fluorescentes e ensaios imunoenzimáticos) mostraram ser uma possível alternativa para a microscopia, mas embora sensíveis, requerem muitos reagentes, procedimentos de lavagem e etapas de incubação (MANK et al., 1997; SCHUURMAN et al., 2007).

Os métodos convencionais empregados para a detecção de *Giardia* em amostras de água e esgoto são compostos de três etapas: concentração, purificação e detecção (ANCENO et al., 2007).

O Método 1623, último a ser validado pela USEPA (2005), para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia*, consiste de filtração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência. Limitações desse método são a perda de (oo) cistos em suas diferentes etapas, e principalmente, seu alto custo (FONTAINE e GUILLOT, 2003).

O emprego da PCR na detecção de *Giardia* tem sido fundamental, pois sua associação a outras técnicas, como a RFLP e o sequenciamento, possibilita a caracterização molecular dos isolados de amostras clínicas e ambientais (THOMPSON, 2004).

Além disso, as técnicas moleculares são altamente sensíveis, específicas e de fácil interpretação (MAHBUBANI et al., 1992; MCGLADE et al., 2003).

Alguns marcadores moleculares utilizados em estudos de caracterização molecular de *Giardia* são o *SSU rRNA* e genes que codificam a produção de glutamato desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), beta giardina (β *giardina*) e fator de alongação 1 α (*ef1 α*) (SMITH et al., 2006).

O gene *gdh* possui o código para a produção da enzima glutamato desidrogenase, que catalisa a desaminação do glutamato, sendo encontrada em eubactérias e eucariotos (BENACHENHOU-LAHFA et al., 1993). Trata-se de um gene de cópia única no genoma de *Giardia*, no qual apresenta um alto grau de polimorfismo, o que permite diferenciar os isolados em nível genotípico e intragenotípico (YEE e DENNIS, 1992; PLUTZER et al., 2008).

Diversos trabalhos que aplicaram a PCR na análise de amostras ambientais foram documentados na Europa (Quadro 4).

Em 2001, RIMHANEN-FINNE padronizaram uma metodologia, baseada em separação imunomagnética e PCR, para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de lodo de esgoto. O agrupamento B1 de *G. duodenalis* foi detectado nesse tipo de amostra. Os autores

concluíram que a metodologia padronizada poderia ser usada para monitorar a presença de giardíase e cryptosporidiose em uma comunidade, além de determinar a contaminação do solo pelo tipo de material analisado.

Dois anos depois os agrupamentos A e B de *G. duodenalis* foram encontrados na Itália, em amostras de esgoto bruto (CACCIÓ et al, 2003). Os pesquisadores alertaram sobre os riscos associados ao reuso de águas residuárias.

ROBERTSON et al. (2006), suspeitavam que a fonte de infecção de um surto de giardíase, ocorrido na Noruega no ano de 2004, era um tanque séptico. No entanto, a caracterização molecular de amostra desse tanque mostrou presença de *Giardia* pertencente ao agrupamento A, enquanto as amostras clínicas de humanos apresentaram isolados identificados como pertencentes ao agrupamento B. Assim, a possibilidade inicial foi descartada.

Na França, BERTRAND e SCHWARTZBROD (2007), ao compararem a presença dos agrupamentos A, B e E em amostras de água residuária de duas plantas de tratamento municipais e de um abatedouro, encontraram os agrupamentos A e B no primeiro tipo de amostra e A e E no segundo. Concluíram que a combinação dos agrupamentos A e B parecem indicar uma contaminação de origem humana enquanto a de A e E, de origem bovina.

A análise dos genótipos de *Giardia* presentes em amostras de águas superficiais e esgoto provenientes da Hungria revelou a presença do agrupamento A em sete amostras, do B em uma e de A e B em quatro (PLUTZER et al., 2008). Esses autores concluem que a aplicação de IFA, IMS e PCR deve se dar em conjunto para melhorar a sensibilidade de detecção e possibilitar a determinação genotípica, o que auxiliaria as autoridades a conhecer a importância para a saúde pública da presença de tais protozoários na água, bem como a definir as fontes de contaminação.

CASTRO-HERMIDA et al. (2008), ao realizarem um trabalho na Espanha, analisaram amostras do afluente e efluente de plantas de tratamento de esgoto, cujo efluente é liberado em águas utilizadas para fins

recreativos, e detectaram os genótipo AI e AII, bem como o agrupamento E, alertando as autoridades responsáveis para maior atenção com os níveis de contaminação por esse protozoário.

A pesquisa na literatura também revelou estudos, realizados na América do Norte, nos quais isolados de *Giardia* de amostras ambientais foram caracterizados molecularmente (Quadro 4).

Em 2002, VAN KEULEN et al (2002) analisou amostras de esgoto e água coletadas no Canadá, encontrando os agrupamentos A e B, também detectados em amostras clínicas de humanos e animais. Assim, concluíram que esses agrupamentos são possivelmente zoonóticos.

SULAIMAN et al. (2004), após genotiparem 131 isolados de amostras de esgoto bruto provenientes dos Estados Unidos, por meio da análise de um fragmento do gene *tpi*, enquadraram 111 no agrupamento A e 20 no agrupamento B. Cinco tipos de seqüência do gene *tpi* foram detectadas entre os isolados do agrupamento A, e os subgenótipos correspondentes a tais seqüências foram nomeados WA1 a 5, dos quais quatro foram considerados novos (WA2 a 5). Dentre os 111 isolados do agrupamento A, 107 foram pertencentes ao subgenótipo WA1 e os demais aos subgenótipos WA2, 3, 4 e 5. Os 20 isolados do agrupamento B foram divididos em 10 subgenótipos (WB1 a 10). Assim, concluíram que o agrupamento B de *G. duodenalis* apresenta alto grau de polimorfismo genético enquanto o A parece ser mais conservado. Outra conclusão obtida pelo grupo foi que a fonte de contaminação provavelmente era humana, e não de roedores, como esperavam, uma vez que não detectaram isolados desse tipo de hospedeiro, e que possivelmente o genótipo WA1 é mais infeccioso para o homem do que os demais.

No Brasil, o estudo de PAULINO (2005) empregou a PCR na detecção de *G. duodenalis* em amostras de águas superficiais destinadas a captação e tratamento para consumo humano, no estado do Paraná. No entanto, embora tenha tido sucesso na amplificação do DNA proveniente de algumas amostras, não há relatos de que tenha genotipado os isolados que encontrou.

Recentemente, um grupo de pesquisa do estado de São Paulo (DURIGAN et al., 2008), detectou a presença dos agrupamentos A e B em duas dentre 18 amostras clínicas e ambientais provenientes da região de Campinas. A caracterização molecular foi realizada por um fragmento do gene *gdh*.

Embora existam diversos trabalhos de genotipagem de isolados de *Giardia duodenalis* de amostras ambientais realizados em outros países, no Brasil, esse tipo de pesquisa ainda é escasso, e a maioria dos estudos emprega a técnica de IFA (Quadro 4).

Quadro 4. Detecção, concentração e caracterização molecular de cistos de *Giardia* de amostras de água e esgoto provenientes de diferentes locais.

Origem da amostra	LOCAL	Técnica	N° de amostras positivas (%)	N° de cistos/L	Genotipagem *		Fonte
					Marcador	Agrupamento ou Genótipo	
Esgoto bruto	Brasil (SP)	IFA	2/2 (100)	2.222		Nr	Dias Júnior (1999)
	Canadá	IFA	81/166 (49)	170 a 3.980		Nr	Heitman et al. (2002)
	Itália	IFA	16/16 (100)	2,1x10 ³ a 4,2x10 ⁴	<i>β giardina</i>	A = 8	Cacció et al. (2003)
					PCR-RFLP e seq	A e B = 8	
	EUA	IFA	52/52 (100)	520 a 8920	<i>Tpi</i>	A = 111	Sulaiman et al. (2004)
					Nested PCR e seq	B = 20	
						**	
	Brasil (MG)	IFA	30/30 (100)	10 ³ a 10 ⁵		Nr	Heller et al. (2004)
	Brasil (SP)	IFA	14/24 (58)	6,6 x 10 ⁴ a 6 x 10 ⁶		Nr	França e Franco (2006)
	Bulgária	IFA	1/1 (100)	139		Nr	Karanis et al. (2006)
	Canadá	IFA	6/6 (100)	2.380 a 9.900	<i>β giardina</i>	A e B = 6	Guy et al. (2003)
		qPCR e seq	6/6 (100)	2.653 a 13.408			
	Thailândia	qPCR e seq	2/2 (100)	598 a 937	<i>β giardina</i>	A e B = 2	Anceno et al. (2007)
	França	IFA	24/24 (100)	530 a 11.000	<i>Tpi</i>	A = 8	Bertrand e Schwartzbrod (2007)
						B = 1	
		q PCR	24/24 (100)	620 a 9.700		A e B = 15	
	Espanha	IFA	12/12 (100)	89 a 8.305	<i>β giardina</i> Semi nested PCR e seq	AI = 2	Castro Hermida et al. (2008)
						AI e E = 5	
						AII = 3	
						AII e E = 2	

Continua

Quadro 4. Detecção, concentração e caracterização molecular de cistos de *Giardia* de amostras de água e esgoto provenientes de diferentes locais.

Continuação

Origem da amostra	LOCAL	Técnica	N° de amostras positivas (%)	N° de cistos/L	Genotipagem *		Fonte
					Marcador	Agrupamento ou Genótipo	
Esgoto bruto	Hungria	IFA	6/6 (100)	320 a 5.760	<i>gdh</i>	All = 3	Plutzer et al. (2008)
					Semi nested PCR e seq	All e BIII = 2	
						All e BIV = 1	
					SSU rRNA	A = 5	
					Nested PCR e seq	A e B = 1	
Esgoto tratado	Bulgária	IFA	2/2 (100)	190 a 604		Nr	Karanis et al. (2006)
	EUA	IFA	33/77 (43)	0,0046 a 2,11		Nr	Ryu et al. (2007)
	Tailândia	qPCR	8/10 (80)	20 a 295	<i>β giardina</i>	A e B = 8	Anceno et al. (2007)
	Espanha	IFA	12/12 (100)	79 a 2469	<i>β giardina</i> Semi nested PCR e seq	AI = 2	Castro Hermida et al. (2008)
						AI e E = 5	
						All = 3	
						All e E = 2	
	Hungria	IFA	4/4 (100)	0,66 a 37,5	SSU rRNA Nested PCR e seq	A = 1	Plutzer et al. (2008)
Água superficial	Austrália	CF	12/39 (31)	0,1 a 0,7		Nr	Thurmann et al. (1998)
	Brasil (SP)	IFA	8/12 (67)	10 a 298		Nr	Dias Júnior (1999)
	Brasil (SP)	IFA	3/3 (100)	66 a 190		Nr	Franco et al. (2001)
	Brasil (MG)	IFA	(75)	4 a 7		Nr	Heller et al. (2004)
	Brasil (SP)	IFA	76/278 (27)	1 a 521		Nr	Hachich et al. (2004)

Continua

Quadro 4. Detecção, concentração e caracterização molecular de cistos de *Giardia* de amostras de água e esgoto provenientes de diferentes locais.

Continuação

Origem da amostra	LOCAL	Técnica	N° de amostras positivas (%)	N° de cistos/L	Genotipagem *		Fonte
					Marcador	Agrupamento ou Genótipo	
Água superficial	Brasil (SP)	IFA	45/48 (94)	10 a 75		Nr	Cantusio Neto e Franco (2004)
	Brasil (SP)	IFA	32/50 (64)	14 a 240		Nr	Oliveira (2005)
	Paris	IFA	38/57 (66)	0,1 a 16,5		Nr	Coupe et al. (2006)
	Brasil (PR)	IFA	3/7 (43)	2,57		Nr	Nishi et al. (2007)
	Rússia e Bulgária	IFA	7/18 (38)	0,004 a 178,5		Nr	Karanis et al. (2006)
	Tailândia	qPCR	17/20 (85)	243 a 4.103	<i>β giardina</i>	A e B = 17	Anceno et al. (2007)
	Espanha	IFA	68/88 (77)	0,633 a 65,228		Nr	Carmena et al. (2007)
	Amsterdam	IFA	51/87 (58)	0,1 a 15,7		Nr	Schets et al. (2008)
	Hungria	IFA	15/26 (57)	0,1 a 17	<i>gdh</i>	All = 2	Plutzer et al. (2008)
					Semi nested PCR e seq	AI e BIV = 1	
					SSU rRNA	A = 3	
					Nested PCR e seq	B = 2	
Água de poço	Itália	MF	4/7 (57)	0,01 a 0,08		Nr	Vernile et al. (2008)
	Bulgária	IFA	2/5 (40)	0,016 a 127,5		Nr	Karanis et al. (2006)
	Brasil (SP)	IFA	0	0		Nr	Re (1999)
Água de nascente	Brasil (PR)	IFA	0	0		Nr	Nishi et al. (2007)
	Brasil (SP)	IFA	2/12 (16)	0,07 a 0,1		Nr	Branco (2006)

No quadro: * = O número de amostras analisadas pela técnica de IFA nem sempre é o mesmo que o número de amostras encaminhadas para genotipagem, além disso, são relatados apenas os resultados de genotipagem que apresentaram sucesso; ** = diferentes genótipos encontrados; nr = não realizada; CF = citometria de fluxo; MF = microscopia de fluorescência.

O emprego da PCR na detecção de *Giardia* em amostras clínicas em laboratórios de rotina vem sendo discutido.

Em 2000, GOSH et al. compararam uma Nested PCR, que tem como alvo uma região do espaço intergênico do gene *rRNA*, com as técnicas de ELISA e CIEP na detecção do protozoário em questão em fezes, concluindo que, por apresentar maior sensibilidade, a Nested PCR deveria ser aplicada na rotina.

NANTAVISAI et al. (2007) após compararem a aplicação da PCR e da IFA na detecção de amostras de fezes não encontraram diferença significativa entre as duas técnicas, no que se diz respeito a sensibilidade e a especificidade.

Por fim, dois grupos de pesquisadores recomendaram recentemente que a microscopia deve continuar sendo a principal ferramenta diagnóstica na rotina. Isso pois, segundo SCHUURMAN et al. (2007), tal técnica apresenta a possibilidade de detectar vários parasitas intestinais simultaneamente. No estudo desses autores a PCR apresentou maior sensibilidade que a microscopia, no entanto, menor especificidade, associada a resultados falso-negativos. Já MEIRELES et al. (2008), constataram que a PCR apresentou menor sensibilidade do que a microscopia ótica empregada após a técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, uma vez que foram encontrados resultados falso-negativos quando a primeira técnica foi aplicada, ao que os autores atribuem a presença de inibidores da PCR nas amostras ou ainda ao desempenho dos iniciadores escolhidos. No entanto, esses autores concordam que a PCR deve ser usada como uma técnica complementar a microscopia.

Apesar disso, na pesquisa, a aplicação da PCR na detecção de *Giardia* em amostras clínicas vem sendo amplamente empregada em diversos estudos em nível mundial (Quadro 5).

Quadro 5. Pesquisas realizadas em diferentes países, nas quais a caracterização molecular de isolados de *Giardia* de fezes humanas foi realizada.

LOCAL	Número de amostras	MARCADOR	Agrupamento/Genótipo		FONTE
			A	B	
China	8	Seq <i>SSU rRNA</i>	4	4	Yong et al. (2000)
Coréia	7	Seq <i>SSU rRNA</i>	7	-	
Holanda	18	PCR-RFLP <i>gdh</i>	9	9	Homan e Mank (2001)
Reino Unido	33	PCR-RFLP <i>tpi</i>	All: 9	21	Amar et al. (2002)
			All e B: 3		
México	19	PCR-RFLP <i>vsp</i>	All: 19	-	Ponce-Macotella et al. (2002)
Austrália	23	Seq <i>SSU rRNA</i>	7	16	Read et al. (2002)
	13	PCR-RFLP β <i>giardina</i>	A2 ou A3: 10	BI-BIV: 3	Cacciò et al. (2002)
			All: 10	B3: 1	
Itália	16	Seq β <i>giardina</i>	AIII: 2	B4: 2	
			All e AIII: 1		
	30	Seq <i>SSU rRNA</i>	24	6	
Turquia	44	PCR-RFLP <i>tpi</i>	19	25	Aydin et al. (2004)
Austrália	8	PCR-RFLP Seq <i>gdh</i>	AI: 1 All: 1	BIV: 6	Read et al. (2004)
	3	Seq <i>SSU rRNA</i>	2	1	Abe et al. (2005)
Japão		Seq <i>gdh</i>	All : 2	1	
	1	Seq <i>gdh</i> e β <i>giardina</i>	-	1	Matsubayashi et al. (2005)
			All : 8	BIII : 8	Bertrand et al. (2005)
	25	PCR-RFLP <i>tpi</i>		BIV : 5	
França			?: 4		
	20	PCR-RFLP <i>gdh</i>	7	13	
	14	PCR-RFLP <i>tpi</i> e <i>gdh</i>	-	BIII: 14	

Continua

Quadro 5. Pesquisas realizadas em diferentes países, nas quais a caracterização molecular de isolados de *Giardia* de fezes humanas foi realizada.

Continuação

LOCAL	Número de amostras	MARCADOR	Agrupamento/Genótipo		FONTE
			A	B	
Itália	37	Seq <i>β giardina</i>	16	10	Lalle et al.(2005) a*
			11		
	17	PCR-RFLP Seq <i>β giardina</i>	A1: 15 A3: 2	-	Lalle et al. (2005) b
México			A : 9		
	20	Seq <i>SSU rRNA</i>	AI : 3 AII : 4 AIII : 4	-	García et al., 2005
	98	PCR para A e B <i>gdh</i>	34	64	
Holanda	89	PCR-RFLP <i>gdh</i>	33	55	Van Der Giessen et al. (2006)
			1		
	94	Seq <i>SSU rRNA</i>	34	60	
Albânia	22	Seq <i>SSU rRNA</i>	10	12	Berrili et al. (2006)
Brasil (SP)	37	Seq <i>gdh</i>	AII : 29	8	Souza et al. (2007)
Brasil (RJ)	62	PCR-RFLP Seq <i>β giardina</i>	AI : 60 AII : 2	-	Volotão et al. (2007)
	63	Seq <i>gdh</i>	3	60	
Noruega	14	Seq <i>tpi</i>	2	12	Robertson et al. (2007)*
	39	Seq <i>β giardina</i>	3	36	
			35	13	
Etiópia	59	PCR-RFLP Seq <i>β giardina</i>	A e B: 8		Gelanew et al. (2008)*
			A e ?: 3		

Continua

Quadro 5. Pesquisas realizadas em diferentes países, nas quais a caracterização molecular de isolados de *Giardia* de fezes humanas foi realizada.

Continuação

LOCAL	Número de amostras	MARCADOR	Agrupamento/Genótipo		FONTE
			A	B	
Argentina	43	PCR-RFLP <i>tpi</i>	All: 3	40	Minvielle et al. (2008)

Fonte: SOUZA, 2007 (adaptado).

No quadro: Seq = sequenciamento de nucleotídeos; ? = dúvida quanto ao genótipo no qual se enquadra um isolado; * = mais do que quatro genótipos identificados em um agrupamento.

A PCR também vem sendo empregada na detecção e caracterização molecular de *Giardia* em amostras de fezes de animais (KUHN et al., 2002; ABE et al., 2003; READ et al., 2004; TRAUB et al., 2004; ABE et al., 2005; VAN DER GIESSEN et al., 2006; SOUZA et al., 2007).

Com base nos trabalhos mencionados anteriormente é possível observar que a caracterização molecular dos isolados de *Giardia* de amostras clínicas e ambientais contribui para um melhor entendimento da taxonomia, por esclarecer a divisão existente dentro da espécie *G. duodenalis*, e da epidemiologia desse protozoário, uma vez que possibilita um melhor conhecimento de sua dinâmica de transmissão e da fonte de contaminação ambiental e de infecção, em surtos e casos isolados. Também auxilia a compreender a especificidade dos isolados a um hospedeiro e a questão da giardíase como uma zoonose.

Além disso, a caracterização molecular contribui para o conhecimento de uma possível associação entre os sintomas de determinada infecção e o genótipo por ela responsável, assim como das relações entre genótipo e fenótipo (por exemplo, a patogenicidade e a resistência a drogas de certos isolados).

Em tais estudos também é enfatizado que a genotipagem dos isolados desse parasita permite conhecer a importância para saúde pública da presença de cistos de *Giardia* em amostras de água e esgoto, alertando as autoridades para os cuidados no tratamento dessas matrizes e para os riscos do reuso de águas residuárias, possibilitando medidas de prevenção e controle da giardíase.

Embora o sequenciamento do genoma de *Giardia* tenha contribuído amplamente para seu estudo, MONIS et al. (2009) ressaltam a necessidade de se obter informações do proteoma desse protozoário, a fim de identificar proteínas associadas às características fenotípicas diferentes entre os isolados, como as associadas aos traços da doença e à infectividade ao hospedeiro.

1.6 JUSTIFICATIVA

Como visto anteriormente a presença de *Giardia* ainda é pouco documentada em águas superficiais e esgoto no Brasil. Além disso, em nosso país, os estudos que relataram a ocorrência desse protozoário nesse tipo de amostra não realizaram a caracterização molecular dos isolados encontrados, não sendo possível saber se os genótipos presentes são aqueles associados a giardíase humana. Assim, por meio desse trabalho será possível conhecer a importância para saúde pública dos cistos de *Giardia* encontrados no ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Detectar a presença e identificar os genótipos de *Giardia* sp. em amostras de água e esgoto provenientes do estado de São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

1. Elaborar uma estratégia que possibilite a caracterização molecular dos isolados de *Giardia* sp. provenientes de amostras de água e esgoto.
2. Conhecer a variabilidade de genótipos de *Giardia duodenalis* presentes nas amostras a serem analisadas, verificando a presença daqueles associados a giardíase humana.
3. Discutir a importância dos achados para a saúde pública.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Saúde Pública do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E ESGOTO

Um total de vinte e seis amostras de água e esgoto, provenientes do estado de São Paulo, foram coletadas no período de maio de 2008 a março de 2009. Dessas, cinco foram de esgoto bruto, seis de esgoto tratado, onze de águas superficiais, três de água de poço e uma de água de nascente.

Diferentes volumes de água e esgoto foram coletados de acordo com o tipo de amostra, sendo que a variação foi de 500ml a 20l, o que pode ser observado mais detalhadamente no Quadro 6.

As amostras de esgoto bruto foram nomeadas de EB1 a 5, as de esgoto tratado de ET1 a 6, as de águas superficiais de AS1 a 11, as de água de poço de AP1 a 3 e a de água de nascente de AN. Tais amostras foram coletadas em diferentes locais (Quadro 6).

Quadro 6. Amostras de água e esgoto coletadas e seus respectivos locais de coleta e volume.

Amostra	Local de coleta	Volume coletado
Esgoto bruto		
EB1	ETE 1*	500ml
EB2	ETE 1*	500ml
EB3	ETE 2*	500ml
EB4	Lago das Garças – Entrada 7	5L
EB5	ETE CECAP	1L
Esgoto tratado		
ET1	ETE 3*	500ml
ET2	ETE 4*	500ml
ET3	ETE Piracicamirim	20l
ET4	ETE Piracicamirim – após UV	20l
ET5	ETE CECAP	20l
ET6	ETE CECAP – após cloração	20l
Águas superficiais		
AS1	Manancial 1*	10l
AS2	Manancial 1*	10l
AS3	Manancial 1*	10l
AS4	Manancial 1*	10l
AS5	Manancial 1*	10l
AS6	Manancial 1*	10l
AS7	Manancial 1*	10l
AS8	Manancial 1*	20l
AS9	Manancial 1*	10l
AS10	Manancial 1*	10l
AS11	Manancial 1*	10l
Água de poço		
AP1	Assentamento periurbano (Vila Ipelândia)	10l
AP2	Assentamento periurbano (V Divisão)	10l
AP3	Assentamento periurbano (Jardim Nova Ipelândia)	10l
Água de nascente		
AN	Lago das Garças – entrada 6	10l

* A identificação da unidade de coleta foi preservada.

As amostras foram coletadas por diferentes equipes: EB1 a 3 e ET1 e 2 foram coletadas pela CETESB; EB4 e AN foram coletadas por equipe do Instituto de Botânica; EB5 e ET3 a 6 foram coletadas por equipe do Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da USP [sob supervisão da Bióloga Dra. Silvana Audrá Cutolo e do Professor Assoc. Roque Passos Piveli em decorrência do Projeto Temático “Uso de efluentes de esgotos tratados por processos biológicos (lagoas de estabilização e reatores UASB/lodos ativados) em solos agrícolas” sob coordenação do Prof. Dr. Adolpho José Melfi do NUPEGEL/ESALQ/USP, com financiamento da FAPESP – Processo 04/14315-4], e por fim, as amostras de águas superficiais e de poço, coletadas por equipe do Laboratório de Análises Microbiológicas do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da USP, como parte dos respectivos projetos: “Detecção de protozoários *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em amostras de águas brutas e tratadas provenientes de Estação de Tratamento de Água para consumo humano”, coordenado pela Profª Drª Maria Tereza Pepe Razzolini (FAPESP:06/00280-0) e “Qualidade microbiológica de águas de consumo humano em assentamento periurbano, Município de Suzano (SP)”, coordenado pela Profª Associada Maria Regina Alves Cardoso (FAPESP:06/05011-7).

O material coletado foi armazenado em frascos de polipropileno estéreis e encaminhado para o Laboratório de Saúde Pública, onde foi processado em até 24 horas após a coleta.

Abaixo estão descritas algumas características dos locais de coleta:

- ETE 1

Abrange área de 8.620m² e está inserida em zona densamente ocupada, abrigando residências, edifícios comerciais e estabelecimentos industriais.

A estação tem capacidade total de tratamento de aproximadamente 90l/s, tratamento esse que se dá por dois sistemas em paralelo: lodos ativados e reator anaeróbio de fluxo ascendente.

- ETE 2

Localizada em município de cerca de doze mil habitantes, essa estação é constituída por duas lagoas em série, sendo a primeira anaeróbia e a segunda facultativa.

O esgoto afluente é encaminhado a ETE por meio de uma elevatória até o canal de entrada e caixa de areia com uma vazão média de 13L/s. Em seguida, é lançado na lagoa anaeróbia, que apresenta volume aproximado de 7.500,00m³ e tempo de detenção hidráulico de 6,68 dias. Após esse período, o efluente é lançado na lagoa facultativa, que possui volume aproximado de 23.600,00m³ e tempo de detenção hidráulico de 21 dias.

- ETE 3

Essa estação está localizada em região metropolitana e seu processo de tratamento de esgoto ocorre pelo sistema de lodo ativado por alimentação escalonada e em nível secundário. A eficiência de remoção da carga orgânica é de 90%. A vazão atual dessa ETE é de 1,2 mil litros por segundo.

- ETE 4

Com vazão de 1,3 mil litros por segundo, o esgoto que chega nessa estação é tratado pelo processo de lodo ativado convencional e em nível secundário, com grau de eficiência de remoção de carga orgânica de 90%.

Essa ETE atende à seis cidades localizadas em região metropolitana.

- Lago das Garças

Localiza-se no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), região sudeste da cidade de São Paulo, em área sob jurisdição do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (BICUDO et al., 2002).

Construído inicialmente para acumular água para abastecimento da população da região sul da cidade de São Paulo, mas devido a poluição de suas águas e por terem sido realizadas obras mais adequadas para o abastecimento de água nessa região da cidade, sua função como reservatório foi interrompida. Atualmente apresenta sete entradas (BICUDO et al., 2002).

No presente trabalho coletou-se material das entradas 6 e 7. A entrada 6 consiste de um córrego de leito argiloso, que flui entre a vegetação e as áreas alagadas até encontrar o reservatório, e cuja nascente localiza-se em área pertencente ao Instituto do Botânica. A entrada 7 (Figura 3) recebe descargas de esgoto provenientes da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (BICUDO et al., 2002).

Figura 3. Entrada 7 do lago das Garças.

Fonte: Danielle Escudeiro de Oliveira (Laboratório de Saúde Pública/FSP/USP)

- ETE CECAP

A ETE CECAP recebe esgoto doméstico e industrial da cidade de Piracicaba, que é tratado por um sistema de lagoas de estabilização cuja produção de efluente, lançado no Ribeirão Piracicamirim, é de $14,3\text{L/s}^{-1}$ (<http://hydro.cria.org.br/database/consulta>).

- ETE Piracicamirim

Inaugurada em 1998 pelo SEMAE, é atualmente a principal planta de tratamento de esgoto doméstico da cidade de Piracicaba, apresentando capacidade para tratar esgoto de uma população de até 90 mil pessoas. Essa estação (Figura 4) é composta pelas seguintes etapas de tratamento: gradeamento, caixa de areia, reator anaeróbio (UASB) e lagoa aerada. O efluente tratado é lançado no ribeirão do Piracicamirim (Vedroni, 2007; <http://www.piracicaba.sp.gov.br>).

Figura 4. Vista da ETE Piracicamirim.

Fonte: <http://www.comeng.com.br>

- Manancial 1

Localizado em região metropolitana, ocupa área de cerca de 600km². Suas águas são destinadas à captação e tratamento para consumo humano, suprindo alguns milhões de pessoas e sendo também utilizadas para lazer. A crescente urbanização, o aparecimento de loteamentos e ocupações irregulares em suas redondezas e a ausência de saneamento básico têm levado a uma diminuição da qualidade das águas desse manancial.

As coletas realizadas nesse reservatório se deram no ponto onde ocorre a captação de água pela ETA.

- Assentamentos periurbanos

As amostras de água de poço foram coletadas em comunidades periurbanas (Vila Ipelândia, V Divisão e Jardim Nova Ipelândia), assentadas irregularmente em áreas do distrito de Palmeiras de São Paulo, município de Suzano (SP).

O município de Suzano está inserido na Bacia do Alto Tietê (UGRHI 6), sub-bacia Alto Tietê – Cabeceiras. 64% de seu território localiza-se em área

de proteção de manancial (APM), onde os serviços da Sabesp, referentes a abastecimento de água e esgotamento sanitário, não podem ser efetuados (Lei Estadual 898/75).

Dessa forma, no distrito de Palmeiras de São Paulo, 76,4% dos domicílios são abastecidos por água de poços e nascentes (ver Figura 5) e o esgotamento sanitário se dá pela disposição em fossas rudimentares (53,6%), fossas sépticas (28,9%) e lançamentos em rios e córregos (7,9%).

Figura 5. Poço localizado no distrito de Palmeiras de São Paulo, Município de Suzano (SP).

Fonte: Prof^a Dr^a Maria Tereza Pepe Razzolini (HSA/FSP/USP)

3.2 CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E ESGOTO

3.2.1 Técnica de membrana filtrante modificada

Para a concentração de parte das amostras utilizou-se a Técnica de membrana filtrante modificada (Araújo et al 2006), cujos passos podem ser observados na Figura 6. Dessa forma, a amostra coletada, após ser homogeneizada, foi disposta em vasilhame de pressão e filtrada em membrana de éster de celulose de 142mm de diâmetro e poros de 0,45 micrômetros (Millipore®Brasil) mediante sistema da Millipore. Para a filtração de algumas amostras empregou-se membrana com poro de 1µm e em alguns casos foi necessário o uso do pré-filtro. A membrana saturada foi recolhida em um saco plástico do tipo “zip lock” contendo cerca de 200ml da amostra e Tween 80 em uma concentração final de 0,1%. O mesmo saco foi levado ao banho ultra-sônico por 15 minutos. Após esse período, o conteúdo líquido contendo o material aderido à membrana foi transferido para tubos cônicos de centrifuga com capacidade para 50ml, que foram centrifugados a 5.000rpm ($7.428 \times g$)/15'/4°C. O sobrenadante foi descartado, restando apenas parte desse para que o sedimento fosse ressuspensionado e passado para um único tubo cônico de centrifuga. Esse foi submetido à centrifugação 5.000rpm ($7.428 \times g$)/15'/4° e teve o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspensionado em até 1,5ml de água ultra pura estéril (MilliQ®) e armazenado em 2 a 4 microtubos de 1,5ml, de modo que ao final do procedimento cada microtubo deveria conter aproximadamente 300µl de amostra concentrada, sendo que em alguns casos, para a obtenção desse volume, foi necessária a centrifugação 13.000rpm ($19.313 \times g$)/3'/24°C desses microtubos, com descarte de parte do sobrenadante. Por fim, armazenou-se o material concentrado a -20°C para posterior extração de DNA.

Figura 6. Técnica de membrana filtrante modificada (Araújo et al 2006).
Fonte: Laboratório de Saúde Pública/FSP/USP.

3.2.2 Técnica de concentração por centrifugação

As amostras processadas em pequeno volume (de 100 a 300ml) foram concentradas apenas por centrifugação, de modo que foram colocadas em tubos cônicos de centrífuga com capacidade para 50ml, centrifugados a 5.000rpm ($7.428 \times g$)/15'/4°C. O sobrenadante foi descartado, restando apenas parte desse para que o sedimento fosse ressuspendido e passado para um único tubo cônico de centrífuga. Esse foi submetido à centrifugação 5.000rpm ($7.428 \times g$)/15'/4° e teve o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em até 1,5ml de água ultra pura estéril (MilliQ®) e armazenado em 2 a 4 microtubos de 1,5ml, de modo que ao final do procedimento cada microtubo deveria conter aproximadamente 300µl de amostra concentrada, sendo que em alguns casos, para a obtenção desse volume, foi necessária a centrifugação 13.000rpm ($19.313 \times g$)/3'/24°C desses microtubos, com descarte de parte

do sobrenadante. Por fim, armazenou-se o material concentrado a -20°C para posterior extração de DNA.

3.3 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E ESGOTO

A aplicação da técnica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (FAUST et al., 1938) se deu com o objetivo de purificar algumas amostras de água e esgoto após a concentração das mesmas pela técnica da membrana filtrante modificada.

Assim, após descartar o sobrenadante na última etapa (em que o material ainda se encontra em tubo cônico de centrifuga) da técnica descrita anteriormente, o sedimento foi lavado adicionando-se aproximadamente 50ml de água ultra pura estéril (MilliQ[®]) no tubo cônico de centrifuga contendo tal sedimento. Realizou-se homogeneização do conteúdo do tubo e centrifugação 5.000rpm ($7.428 \times g$)/15'/ 24°C . Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 10ml de solução de sulfato de zinco a 33%. Após homogeneizar novamente o conteúdo do tubo, este foi centrifugado 2.500rpm ($3.714 \times g$)/3'/ 24°C . Com uma pipeta de 10ml, a região inferior do material foi retirada do tubo e descartada, restando aproximadamente 2ml do material. Realizaram-se duas lavagens desse material com água ultra pura estéril (MilliQ[®]), como descrito na etapa inicial dessa técnica. Por fim o sedimento final foi ressuspendido em 1,5ml de água ultra pura e transferido para microtubos de 1,5ml. Cada amostra resultou em dois a quatro microtubos de 1,5ml contendo aproximadamente 300 μl de amostra. Em alguns casos, para se obter esse volume foi necessário uma centrifugação 13.000rpm ($19.313 \times g$)/3'/ 24°C , com descarte de parte do sobrenadante. Esses tubos foram armazenados em freezer (-20°C), e todos foram encaminhados para a extração de DNA.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico foi realizada pelo método do fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico segundo Araújo et al. (2006), visualizado na Figura 7.

Em microtubo de 1,5ml contendo aproximadamente 300µl da amostra, adicionou-se 500µl de solução de lise, composta de 50µl de 100mM Tris-HCl (pH=8), 50µl de 50mM EDTA (pH=8), 50µl de SDS 10%, 3,5µl de 70mM β mercaptoetanol, 346,5µl de água ultra pura estéril (MilliQ®) e 1µl de PVP a 1%. Homogeneizou-se o conteúdo do microtubo e incubou-se o mesmo em banho-maria a 65°C por uma hora e vinte minutos. Em seguida adicionou-se 20µl de proteinase K (20mg/ml) e após homogeneização o microtubo foi levado a novo banho a 65°C por uma hora e vinte minutos. Acrescentou-se 500µl de solução de extração (250µl de fenol, 240µl de clorofórmio e 10µl de álcool-isoamílico) ao microtubo e homogeneizou-se vigorosamente. O conteúdo do microtubo foi transferido para um novo microtubo do tipo phase lock gel, levado à centrifuga 12000rpm (17.828 x g)/5min/4°C. O sobrenadante obtido foi transferido cuidadosamente para um novo microtubo de 1,5ml, ao qual adicionou-se 500µl de clorofórmio. Homogeneizou-se e realizou-se nova centrifugação 12000rpm (17.828 x g)/15min/4°C. O sobrenadante foi transferido mais uma vez para um novo microtubo e 500µl de isopropanol foram adicionados. Realizou-se movimentos rotatórios com o microtubo, após dez minutos em banho de gelo, a fim de se obter a precipitação do DNA. O microtubo foi mais uma vez submetido a centrifuga 12000rpm (17.828 x g)/3min/4°C. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 500µl de etanol 70% e ressuspendeu-se o pellet. Após última centrifugação 1200rpm (17.828 x g)/3min/4°C, descartou-se o sobrenadante e o microtubo foi levado aberto para secagem à vácuo por até 12h. Por fim o DNA, dos dois a quatro tubos referentes a uma mesma amostra, foi re-

hidratado com 50 µl de TE II (10mM Tris, pH=8; 1mM EDTA, pH=8), obtendo-se 50µl de DNA de cada amostra, que foi armazenado a 4°C.

Figura 7. Extração do DNA genômico, realizada pelo método do fenol/clorofórmio modificado (Araújo et al., 2006).
Fonte: Laboratório de Saúde Pública/FSP/USP.

3.5 PCR, ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E PURIFICAÇÃO DO AMPLICON

A amplificação do DNA foi realizada por meio de uma PCR dupla (Nested PCR), realizada imediatamente após ressuspender o DNA.

Para realizar a primeira etapa da Nested PCR foram utilizados iniciadores descritos por SOUZA et al. (2007), que amplificam um fragmento de aproximadamente 1.190pb do gene GDH, que tem o código para a produção da enzima glutamato desidrogenase. Esses são GdhR (senso)

5'CGAGCGCGAGCCGAAGTATATCC3' e #579II (anti-senso)
5'GATGTTYGCRCCCATCTGRTAGTTC3'.

A reação de amplificação conteve 25ng de DNA, tampão 10x, 2mM de Cloreto de Magnésio, PVP a 1%, 300μM de DNTP, 0,5μM de cada iniciador, 1,25U de *Tth* DNA polimerase (Biotools® Madrid Spain) e água ultra pura estéril (MilliQ®) em quantidade suficiente para completar o volume final volume de 25μl.

Os parâmetros para o termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf®) foram: Um ciclo a 95°C por 7min ("hot start"), para desnaturação; 40 ciclos de 95°C por 2min, para desnaturação; 50°C por 1min, para emparelhamento e 72°C por 1,5min, para extensão. Por fim, um aquecimento de 72°C por 5min, para uma extensão final.

Para a segunda etapa da Nested PCR utilizou-se os iniciadores GDH-FI (senso) 5' AAYGAGGTYATGCGCTTCTGCCA 3' e #579II (anti-senso), segundo SOUZA et al. (2007), com a finalidade de se obter um fragmento de cerca de 890pb. O reação de amplificação foi igual a utilizada na amplificação do fragmento de 1.190pb, porém sem PVP e com 5 μl do amplicon obtido após a primeira etapa. Além disso, os parâmetros para o termociclador foram: Um ciclo a 94°C por 2min, 30 ciclos de 94°C por 35s, 56°C por 35s e 72°C por 1min e por fim um ciclo a 72°C por 5min.

Num primeiro momento a Nested PCR foi realizada com o DNA não diluído e também nas seguintes diluições: 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000. Essa etapa foi empregada a fim de se detectar em qual dessas diluições a ação dos inibidores estaria minimizada, porém com DNA em concentração suficiente para a amplificação por PCR.

O produto da Nested PCR, de aproximadamente 890pb, foi observado após uma eletroforese em gel de agarose (Amersham Biosciences) a 1,8%, preparado com o tampão tris-acetado-EDTA (TAE 1x). O gel foi corado com brometo de etídio e imerso em tampão TAE 1X. Para cada 4μl de amplicon pipetado no gel utilizou-se 2μl de tampão carregador de amostra (glicerina e azul de bromofenol). Em cada poço do gel foram adicionados 8μl de

amplicon. Empregou-se o marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas) e intensidade de corrente de 6v/cm.

O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302nm, por meio de transiluminador. Com o auxílio do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e do Software Labworks (UVP) obteve-se a imagem.

Verificou-se se as bandas obtidas no gel correspondiam ao tamanho de 890pb. As amostras que apresentaram tal banda foram consideradas positivas para a presença de *Giardia* sp, sendo purificadas por meio do kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE® Healthcare, UK), e encaminhadas para o procedimento de clonagem. Para algumas amostras, antes da realização da purificação foi necessário realizar um gel de agarose, do qual foi recortado o produto de interesse, a fim de eliminar as bandas inespecíficas.

No caso da amplificação do fragmento desejado não ser detectada, a Nested PCR era repetida em cinco replicas com o DNA não diluído. Para a realização da Nested PCR em quintuplicata, 5µl de DNA de uma determinada amostra foram distribuídos em cinco microtubos de polipropileno. Após finalização da primeira etapa da Nested PCR, o amplicon dos cinco tubos foi transferido para um microtubo de 1,5ml e foi purificado com o kit de purificação. O amplicon purificado foi distribuído em 5 tubos de PCR, cada um contendo 5µl de tal produto. Realizou-se a segunda etapa da Nested PCR e da mesma maneira, o amplicon obtido após a realização da segunda etapa foi purificado com o emprego do mesmo kit. Por fim realizou-se o gel de agarose, como descrito anteriormente.

3.6 CLONAGEM

As amostras positivas para a presença de *Giardia*, que tiveram o amplicon previamente purificado, foram submetidas a clonagem em vetor plasmidial para posterior sequenciamento.

A clonagem foi realizada com o emprego do Kit pGEM®-T Easy Vector System (Promega) e consistiu das etapas descritas a seguir.

Para a ligação do fragmento de 890pb ao plasmídio, adicionou-se a um microtubo de polipropileno 3µl do produto de PCR purificado, 1µl do vetor plasmidial comercial e 1µl da enzima T4 DNA ligase. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e o mesmo foi incubado a 10°C por 18h.

Para a etapa de transformação, transferiu-se cuidadosamente 50µl de células competentes de *E. Coli* (JM 109) na concentração de 10^8 células/ml para o tubo contendo a ligação e homogeneizou-se delicadamente o material. O tubo foi encaminhado para banho de gelo por 20 minutos, seguido por banho-maria a 42°C por 50s e banho de gelo por 2min. O produto da transformação foi adicionado a um tubo cônico de centrifuga com capacidade para 15ml contendo 1ml de caldo SOC com aditivo, que foi incubado a 37°C por 90 min em agitador térmico. Em seguida, homogeneizou-se o conteúdo do tubo e distribuiu-se 50µl do material para cada placa de Petri contendo ágar Laix (ágar lúria 0,5% adicionado de 100µg/ml de ampicilina, 0,5mM de IPTG e 80 µg /ml de X-gal), sendo que para cada amostra foram preparadas 3 placas. As placas foram incubadas a 37°C por 16-24h. Selecionou-se primeiramente as colônias brancas, e na ausência dessas, as de centro azul e borda branca.

Para confirmação da transformação realizou-se PCR das colônias selecionadas, com o auxílio dos iniciadores M13 direto (5' TGTAACGACGGCCAGT 3') e M13 reverso (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'), correspondentes as regiões de flanco do vetor plasmidial. Para isso, parte da colônia foi transferida para um tubo de PCR contendo 5µl de água ultra pura estéril (MilliQ®), ao qual adicionou-se

20µl de mistura de PCR, que continha: tampão 10X, 2mM de cloreto de magnésio, 300µM de DNTP, 0,5µM de cada iniciador, 1,25U de *Tth* DNA polimerase (Biotools® Madrid Spain) e água ultra pura em quantidade suficiente para completar o volume final. Os parâmetros para o termociclador foram os mesmos empregados para a segunda etapa do PCR do gene *gdh*.

O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1,8% e considerou-se a ligação com sucesso no caso de se observar uma banda de aproximadamente 1.100pb.

As colônias que apresentaram sucesso na transformação foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2ml de caldo lúria adicionada de 100µg/ml de ampicilina, encaminhados para estufa 37°C/16-24h. 500µl desse caldo foram transferidos para um microtubo com 500µl glicerol 70%, armazenado em freezer -80°C, paralelamente, realizou-se extração de plasmídio com 1,5ml do caldo restante das 10 primeiras colônias de cada amostras. Para a extração do plasmídio utilizou-se o kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega), sendo o produto obtido armazenado em freezer a -20°C. Por fim, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% e corrida a 6V/cm, com o produto da extração de plasmídio, a fim de confirmar esse procedimento.

3.7 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO DO GENE GDH

Após a extração dos plasmídios contendo o fragmento de interesse, 500ng desse material foi encaminhado para sequenciamento, juntamente com 3,2pmol/µl do iniciador M13 direto. O material de interesse também foi seqüenciado com o primer M13 reverso.

As amostras foram seqüenciadas pela empresa Genomic Engenharia Molecular Ltda., pelo método de Sanger (Sanger et al., 1997), utilizando o sequenciador 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS

As seqüências de nucleotídeos obtidas nesse trabalho foram comparadas com seqüências padrão de *Giardia*, anteriormente depositadas no Genbank (<http://www.ncbi-nml.nih.gov/genbank/>), por meio do sistema BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) e por alinhamento manual, com o auxílio do programa BioEdit (Biological sequence alignment editor, disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>).

A reconstrução filogenética foi realizada utilizando-se o programa MEGA 4.1 Beta (disponível em <http://www.megasoftware.net/mega41.html>).

Assim, o enquadramento de determinada seqüência em um agrupamento ou genótipo se deu de acordo com a similaridade que apresentou com as seqüências padrão presentes no Genbank.

O número de acesso do Genbank das seqüências padrão adotadas foi: All (EF685688, AY178736, AY178737), Al (AY178735, M846004), B (AY178738, AY178739, AY178749, AY178750, AY178751, AY178752, AY178753, AY178754, AY178755, AY178756), C (U60982, U60983), D (U60986), E (AY178740, AY178741), F (AY178742, AY178743, AY178744, AF069057), G (AY178745, AY178746, AY178747, AY178748, AF069058).

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DE *Giardia* EM AMOSTRAS DE ÁGUA E ESGOTO

Dentre as vinte e seis amostras de água e esgoto analisadas, quatorze foram consideradas positivas para a presença de *Giardia* sp. por PCR. Dessas, doze foram encaminhadas para sequenciamento, sendo confirmada a detecção desse protozoário em onze (42,3%). O genótipo All foi observado em dez amostras, sendo três de esgoto bruto, uma de esgoto tratado, quatro de águas superficiais e duas de água de poço. O agrupamento B foi detectado em uma amostra de esgoto bruto.

4.2 PCR

De um total de vinte e seis amostras de água e esgoto analisadas, quatorze (53,8%) foram consideradas positivas por PCR para a presença de *Giardia* sp. por terem apresentado um produto de 890pb no gel de agarose, indicando que a amplificação do fragmento do gene *gdh* ocorreu com sucesso na PCR realizada. Dentre as amostras positivas, 4/5 foram de esgoto bruto, 4/6 de esgoto tratado, 4/11 de águas superficiais e 2/3 de água de poço. A única amostra de água de nascente analisada não apresentou o fragmento esperado no gel de agarose (Quadro 6 e 7).

Inicialmente, cada amostra teve a PCR realizada com o DNA não diluído e em diferentes diluições (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000). Essa etapa teve a finalidade de identificar em qual dessas diluições a ação dos inibidores estaria minimizada, porém com DNA em concentração suficiente para ser amplificado. O Quadro 7 mostra os resultados da PCR realizada com o DNA

em diferentes diluições, indicando a diluição em que houve sucesso na amplificação do fragmento de 890pb de cada amostra.

As amostras que apresentaram resultado negativo na PCR realizada com o DNA em diferentes diluições foram encaminhadas para a PCR em cinco réplicas. A amostra EB1 foi a única que, apesar de já ter apresentado resultado positivo na PCR com DNA em diferentes diluições, foi submetida a PCR em cinco réplicas. Os resultados dessa etapa encontram-se no Quadro 8.

Quadro 7. Resultados da PCR realizada com DNA em diferentes diluições.

Amostra		Volume Processado	Técnica de concentração	Técnica de Faust	Resultado da PCR	Diluição do DNA ⁺
Esgoto bruto	EB1	100ml	MFM*	-	P	1:1000
		100ml	C	-	P	1:1000
	EB2	100ml	C	-	P	1:10.000
		100ml	C	X	N	-
	EB3	100ml	C	-	N	-
		100ml	C	X	N	-
	EB4	100ml	C	-	N	-
		100ml	C	X	N	-
	EB5	100ml	C	-	N	-
		100ml	C	X	N	-
Esgoto tratado	ET1	300ml	C	-	N	-
	ET2	100ml	C	-	N	-
		100ml	C	X	N	-
	ET3	10l	MFM**, ***	-	?	-
		10l	MFM**, ***	X	N	-
	ET4	10l	MFM**, ***	-	?	-
		10l	MFM**, ***	X	N	-
	ET5	10l	MFM**, ***	X	N	-
Água superficial	AS1	10l	MFM	-	P	1:1000
	AS2	10l	MFM	-	N*	-
	AS3	10l	MFM	-	N*	-
	AS4	10l	MFM	-	N*	-
	AS5	10l	MFM	-	N	-
	AS6	10l	MFM	-	N	-
	AS7	10l	MFM	X	P	1:1000
	AS8	10l	MFM**	-	N	-
		10l	MFM**	X	N	-
	AS9	10l	MFM**	X	N	-
	AS10	10l	MFM**	X	N	-
	AS11	10l	MFM**	X	N	-
Água de poço	AP1	10l	MFM	-	N	-
	AP2	10l	MFM	X	P	1:1000
	AP3	10l	MFM	X	N	-
Nascente	AN	10l	MFM	X	N	-

No quadro, ⁺ = única diluição em que ocorreu amplificação do fragmento esperado, MFM = Técnica de membrana filtrante modificada, C = Técnica de concentração por centrifugação, * = amostra filtrada por sistema Millipore®, em membrana de 47mm de diâmetro e poro de 0,45µm, ** = amostra filtrada em membrana de 1µm, *** = uso de pré-filtro durante a etapa de filtração, ? = inconclusivo, P = amostra positiva, N = amostra negativa, * = essa amostra teve o DNA armazenado a 4°C por período de 12 a 60 dias antes da realização da PCR.

Quadro 8. Resultados da PCR realizada em cinco réplicas.

Amostra		Volume processado	Técnica de Concentração	Técnica de Faust	Resultado da PCR em 5r
Esgoto bruto	EB1	100ml	MFM*	-	N
		100ml	C	-	N
	EB3	100ml	C	-	P
		100ml	C	X	P
	EB4	100ml	C	-	P
		100ml	C	X	P
	EB5	100ml	C	-	N
		100ml	C	X	N
Esgoto tratado	ET2	100ml	C	X	P
	ET3	10l	MFM ^{***}	-	?
		10l	MFM ^{***}	X	P
	ET4	10l	MFM ^{***}	-	?
		10l	MFM ^{***}	X	P
	ET5	10l	MFM ^{***}	X	P
Água superficial	AS2	10l	MFM	-	N*
	AS3	10l	MFM	-	N*
	AS6	10l	MFM	-	N
	AS8	10l	MFM ^{**}	-	N
		10l	MFM ^{**}	X	P
	AS9	10l	MFM ^{**}	X	P
	AS10	10l	MFM ^{**}	X	N
	AS11	10l	MFM ^{**}	X	N
Água de poço	AP1	10l	MFM	-	N
	AP3	10l	MFM	X	P
Água de Nascente	AN	10l	MFM	X	N

No quadro, 5r = cinco réplicas, MFM = Técnica de membrana filtrante modificada, C = Técnica de concentração por centrifugação, * = amostra filtrada por sistema Millipore®, em membrana de 47mm de diâmetro e poro de 0,45µm, ** = amostra filtrada em membrana de 1µm, *** = uso de pré-filtro durante a etapa de filtração, P = amostra positiva, N = amostra negativa, ? = inconclusivo, * = essa amostra teve o DNA armazenado a 4°C por período de 12 a 60 dias antes da realização da PCR.

Como algumas amostras foram processadas por mais de uma maneira, um número de 35 situações de processamento foi gerado (Quadro 7). Dentre essas situações, 17 tiveram o emprego da técnica de Faust e 18 não foram submetidas a esse procedimento de purificação. Nos Quadros 7 e 8, nota-se que os resultados da PCR foram positivos em 64,7% (11/17) das situações em que a técnica de Faust foi aplicada e em apenas 33,3% (6/18) quando tal técnica não foi empregada. Também é possível observar que, dentre as situações em que foram analisadas amostras de água superficial e de poço, a positividade da PCR foi, respectivamente, de 60% (3/5) e 100% (2/2), quando a técnica de Faust foi aplicada e de 14,2% (1/7) e 0% (0/1), na ausência dessa técnica de purificação.

Em relação à extração de DNA, observou-se diferença no aspecto do produto final quando o procedimento se deu após a técnica de concentração e após a mesma seguida por Faust, como observado na Figura 8.

Figura 8. DNA extraído de uma amostra de água superficial após concentração pela técnica de membrana filtrante modificada e purificação pela técnica de Faust (A) e após o mesmo método de concentração, porém sem realização de purificação (B).

As amostras submetidas a técnica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco e PCR positivas tiveram o DNA novamente encaminhado para a PCR, que foi realizada com o DNA em diferentes diluições ou em réplicas, conforme a positividade que cada uma obteve anteriormente

(Quadro 7 e 8), porém após esse material ter sido armazenado a 4°C por um ou mais meses. Nessa etapa observou-se que apenas nas amostras ET2 e 4 ocorreu a amplificação do fragmento de 890pb (Quadro 9).

Quadro 9. Resultados da PCR realizada após armazenar o DNA a 4°C por um ou mais meses a partir de amostras submetidas a técnica de Faust, anteriormente consideradas positivas na PCR.

Amostra		Volume processado	Técnica de Concentração	Técnica de Faust	Resultado da PCR
Esgoto bruto	EB3	100ml	C	X	N
	EB4	100ml	C	X	N
Esgoto tratado	ET2	100ml	C	X	P
	ET3	10l	MFM ^{**} , ^{***}	X	N
	ET4	10l	MFM ^{**} , ^{***}	X	P
	ET5	10l	MFM ^{**} , ^{***}	X	N
Água superficial	AS7	10l	MFM	X	N
	AS8	10l	MFM ^{**}	X	N
	AS9	10l	MFM ^{**}	X	N
Água de nascente	AP2	10l	MFM	X	N
	AP3	10l	MFM	X	N

No quadro, MFM = Técnica de membrana filtrante modificada, C = Técnica de concentração por centrifugação, ^{**} = amostra filtrada em membrana de 1µm, ^{***} = uso de pré-filtro durante a etapa de filtração, P = amostra positiva, N = amostra negativa.

Na Figura 9 é possível visualizar o fragmento de cerca de 890pb resultante da PCR de algumas amostras.

Figura 9. Foto de eletroforese em gel de agarose a 1,8%, corado com brometo de etídio e realizado após a segunda etapa da nested PCR para visualização do fragmento de 890pb amplificado do gene *gdh* de *Giardia*. Linha 1 e 13: Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder Plus – Fermentas), Linha 2: controle positivo, Linha 3: EB1, Linha 4: EB1 1:10, Linha 5: EB1 1:100, Linha 6: EB1 1:1000, Linha 7: EB1 1:10.000, Linha 8: EB1 5r, Linha 9: EB3F 5r, Linha 10: EB3 5r, Linha 11: ET2F 5r, Linha 12: ET4 5r, Linha 14: AS1, Linha 15: AS1 1:10, Linha 16: AS1 1:100, Linha 17: AS1 1:1.000, Linha 18: AS1 1:10.000, Linha 19: AS8F 5r, Linha 20: AS8 5r, Linha 21: AP3F 5r, Linha 22: AP1 5r, Linha 23: AN 5r, Linha 24: branco.

4.3 CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Das 14 amostras positivas por PCR, 12 foram encaminhadas para clonagem e tiveram colônias, obtidas após as etapas de ligação e transformação, selecionadas e triadas por PCR com emprego dos iniciadores M13. O Quadro 10 mostra o desempenho dos procedimentos de clonagem e sequenciamento. Um total de 73 fragmentos clonados e sequenciados foram submetidos a análise das relações filogenética entre si e entre fragmentos do gene *gdh* de *Giardia* previamente depositados no Genbank (Figura 12).

Quadro 10. Número de colônias selecionadas após clonagem, avaliação da clonagem por PCR, desempenho e resultado do sequenciamento.

Amostra		Nº de Colônias Selecionadas	Nº de Colônias PCR positivas	CSS/CES*	Número dos CSS	Agrupamento/ Genótipo
Esgoto bruto	EB1 (C83)	5	5	5/5	1, 2, 3, 4, 5	All
	EB2 (C89)	25	21	10/10	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	B
	EB3 (C90)	65	51	9/9	1, 2, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 6	All
	EB4 (C91)	46	4	4/4	6, 22, 24, 38	All
Esgoto tratado	ET4 (C96)	130	94	9/9	2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12, 15	All
	ET5 (C97)	3	1	0/1	-	-
Água Superficial	AS1 (C88)	17	8	1/8	4	All
	AS7 (C93)	88	47	10/10	1, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 21	All
	AS8 (C98)	18	15	10/10	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12	All
	AS9 (C99)	12	6	6/6	1, 4, 5, 6, 7, 10	All
Água de poço	AP2 (C94)	36	3	3/3	13, 23, 30	All
	AP3 (C95)	61	12	7/7	1, 9, 24, 25, 29, 39, 45	All

* CSS/CES = Clones que obtiveram sucesso no sequenciamento/clones enviados para o sequenciamento.

Na Figura 10 observa-se o resultado obtido após a PCR realizada a partir das colônias selecionadas oriundas da clonagem. Nota-se um fragmento de aproximadamente 1.100pb, que indica a presença do inserto de 890pb no plasmídeo. Os fragmentos de 200pb estão relacionados à ausência do inserto de interesse no plasmídeo, e representam a região do plasmídeo amplificada pelos iniciadores M13, utilizados na reação de PCR em questão.

Figura 10. Foto de eletroforese em gel de agarose a 1,8% realizada após PCR com os iniciadores M13 (direto e reverso) a partir das colônias oriundas da clonagem. Linha 11: marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder Plus – Fermentas); Linhas 1 a 4, 6, 9 e 15 representam plasmídio sem o inserto; Linhas 5, 7, 8, 10, 12-14, 16-19 e 21 representam o fragmento de 890pb inserido no plasmídio.

No gel de agarose visualizado na Figura 11 observa-se plasmídios extraídos das células das colônias que apresentaram sucesso na clonagem, representados pelo fragmento de aproximadamente 4.000pb, referente ao plasmídio de 3.000bp com o inserto de 890pb.

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose do produto da extração de plasmídio das células que receberam o inserto durante a clonagem. Linha 1 a 11, plasmídios com o fragmento de interesse inserido e Linha 12, marcador de peso molecular (1Kb Ladder – Amresco).

Figura 12. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de 825pb das sequências do gene *gdh* dos isolados de *Giardia* obtidos no presente trabalho e de sequências provenientes do Genbank. A reconstrução foi realizada pelo programa MEGA 4.1 Beta, com o emprego do método de Neighbor-joining, do modelo de máxima verossimilhança e de valores de Bootstrap obtidos após 1000 simulações.

5 DISCUSSÃO

A presença de *Giardia* em amostras de água e esgoto tem sido documentada no Brasil e no mundo, como mostra o Quadro 4. Há trabalhos que indicam que este protozoário também está presente em mananciais e esgotos do Estado de São Paulo. Os dados obtidos no presente trabalho confirmam tais achados, uma vez que das vinte e seis amostras, 11 (42,3%) foram consideradas positivas para a presença desse parasita.

A comparação dos dados obtidos nessa pesquisa com os da literatura (Quadro 4) mostrou que em muitos estudos que analisam amostras de água e esgoto, um maior número de amostras positivas é encontrado, principalmente quando se trata de esgoto.

Uma explicação para tais resultados é o fato de a maioria dos estudos empregar a técnica de imunofluorescência ao invés de utilizar apenas a PCR, e quando a primeira não é aplicada nota-se o uso da qPCR. Uma vantagem da aplicação da técnica de IFA é a possibilidade de realizar a contagem do número de cistos de *Giardia* em uma amostra. No entanto, uma desvantagem é que seu emprego favorece reações cruzadas que contribuem para o aparecimento de resultados falso-positivos (MAHBUBANI et al., 1992), o que pode explicar o menor número de amostras positivas obtidas nesse estudo, que aplicou diretamente a PCR. Outra explicação para esse achado seria a presença de resultados falso-negativos, que é uma das limitações da PCR, ocorrendo principalmente pela ação de inibidores. Essa situação foi reportada em alguns trabalhos nos quais amostras positivas por IFA foram negativas após realização de PCR (COUPE et al., 2006; PLUTZER et al., 2008).

O Quadro 4 também mostra que apesar de grande parte dos trabalhos aplicar a técnica de imunofluorescência, principalmente em se tratando de amostras de água superficial, é crescente o emprego da PCR na detecção de *Giardia* em água e esgoto. Embora a PCR só possibilite detectar

presença ou ausência desse protozoário (ANCENO et al., 2007), e não a contagem do número de cistos, essa técnica fornece material para que os isolados de *Giardia* sejam caracterizados molecularmente, o que é importante, pois alguns autores consideram que o conhecimento sobre os genótipos de *Giardia* presentes no ambiente é escasso, e ainda, pois aparentemente nem todos os isolados de *G. duodenalis* causam doença no homem, sendo fundamental determinar o significado para a saúde pública daqueles presentes no ambiente (LOWERY et al., 2000; THOMPSON, 2004; SMITH et al., 2006).

No Brasil, poucos trabalhos realizaram a caracterização molecular de isolados de *Giardia*, e nesses as amostras analisadas foram clínicas (ROCHA et al, 2003; VOLOTÃO et al, 2007; SOUZA et al., 2007). Há um trabalho, realizado no estado do Paraná, no qual a PCR foi empregada, com iniciadores que detectaram *Giardia duodenalis* em amostras de águas destinadas à captação para consumo humano, mas a genotipagem não foi realizada (PAULINO, 2005). DURIGAN et al. (2008) fizeram breve relato sobre a detecção de isolados do agrupamento A e B após PCR e sequenciamento de fragmento do gene *gdh*, mas não especificaram se esses achados dizem respeito a isolados clínicos ou ambientais. Assim, fica claro que, por não se conhecer as espécies ou genótipos de *Giardia* circulantes em água e esgoto no Brasil, não é possível saber se tais cistos são pertencentes aos genótipos associados a giardíase em humanos.

No presente estudo foram detectados os agrupamentos A, genótipo All, e B de *Giardia duodenalis*. Tais achados já eram esperados, uma vez que até o momento apenas a espécie *G. duodenalis* foi observada em água e esgoto nos estudos realizados em outros países (Quadro 4) e no Brasil (PAULINO et al., 2005). Além disso, os genótipos encontrados também já haviam sido relatados nesse tipo de amostra, como observado nos trabalhos de CASTRO-HERMIDA et al. (2008) e PLUTZER et al. (2008).

Assim como em outros trabalhos, no presente estudo, o agrupamento A foi observado em um maior número de amostras do que o agrupamento B. No entanto, embora em tais trabalhos tenha sido detectada a presença de

agrupamentos potencialmente patogênicos para o homem, em alguns casos, a caracterização em nível genotípico não ocorre (VAN KEULEN et al., 2002; CACCIÒ et al., 2003; SULAIMAN et al., 2004; BERTRAND e SCHWARTZBROD, 2007; CASTRO-HERMIDA et al., 2008 e PLUTZER et al., 2008).

Curiosamente, o genótipo AII, obtido na maior parte das amostras da presente pesquisa, foi encontrado em 29 dentre as 37 amostras de fezes humanas analisadas no trabalho de SOUZA et al. (2007), também realizado no estado de São Paulo. Ainda em relação ao estudo desses autores, o agrupamento B foi detectado nas demais amostras clínicas de humanos, o que confirma os dados obtidos no trabalho atual, que encontrou o agrupamento B em um menor número que o agrupamento A. A semelhança entre os achados desses dois trabalhos confirma a circulação desses genótipos em humanos no estado de São Paulo. Embora o presente trabalho não tenha analisado material fecal humano, a caracterização molecular de isolados de *Giardia* em esgoto bruto fornece dados representativos de uma infecção endêmica, pois considera portadores assintomáticos e casos de erros no diagnóstico (CASTRO-HERMIDA et al., 2008).

A presença de genótipos de *Giardia* associados a giardíase humana em amostras de esgoto bruto alerta para os riscos no emprego do lodo gerado nas ETEs durante os processos de tratamento, uma vez que esse material apresenta cerca de 10^5 a 10^6 cistos/kg⁻¹ (STRAUB et al., 1993; THIRIAT et al., 1997). Embora no presente trabalho essa matriz não tenha sido analisada, seria importante que em estudos futuros a caracterização molecular de isolados de *Giardia* encontrados nesse material fosse realizada, principalmente por existirem dados escassos a esse respeito na literatura (RIMHANEN-FINNE et al., 2001).

A detecção dos genótipos AII e B em esgoto tratado ressalta a necessidade de atenção no tratamento de esgotos, visto que muitas vezes os efluentes das ETEs são reutilizados para fins domésticos, agrícolas ou industriais, ou ainda lançados em águas superficiais (PHILIPPI Jr., 2005).

Em águas superficiais, os agrupamentos A e B de *G. duodenalis* representam risco para a saúde pública pois trata-se de uma matriz frequentemente utilizada para fins recreacionais ou para captação e tratamento para consumo humano. O mesmo risco também pode estar presente nos assentamentos periurbanos que tiveram amostras de água de poço analisada, principalmente pois essa água não passa por processos de tratamento anterior ao consumo humano. A contaminação por *Giardia duodenalis* em mananciais e poços pode ser explicada, no primeiro caso, pela recepção de esgotos sanitários não tratados, e no segundo, pelo contato com material proveniente de tanques sépticos (SLIFKO et al., 2000; PHILIPPI Jr., 2005; FRANCO, 2007).

No Brasil, não há legislações que determinem um limite para o número de cistos que podem ser encontrados em efluentes de ETES e águas superficiais, com fins recreacionais e destinadas ao consumo humano. Todavia, há uma recomendação de que a água tratada para consumo humano tenha ausência desse parasita (BRASIL, 2005). Como a presença de isolados de *Giardia* potencialmente patogênicos para o homem foi detectada em águas superficiais e já é conhecido que os cistos podem resistir aos processos de tratamento comumente empregados em ETAs (SMITH et al., 2006), seria necessário que estudos futuros se dedicassem a detecção desse protozoário em amostras de água tratada.

No entanto, não é possível afirmar que somente *G. duodenalis* é encontrada no ambiente, pois na maioria dos estudos de genotipagem os iniciadores utilizados reconhecem apenas essa espécie (CACCIÓ et al., 2003; GUY et al., 2003; ROBERTSON et al., 2006; ANCENO et al., 2007; CASTRO-HERMIDA et al., 2008; BERTRAND e SCHWARTZBROD et al., 2007).

Embora a literatura indique que *G. duodenalis* seja a espécie de importância para saúde pública e que outras espécies desse parasita não foram observadas em amostras clínicas de humanos (VAN KEULEN et al., 1995), VAN KEULEN et al. (2002) relatam que seria importante existir uma

forma de identificar outras espécies desse protozoário a fim de se obter um maior conhecimento acerca de amostras ambientais e de animais.

Entretanto, a escassez de fragmentos de genes de isolados de *Giardia* spp. com os nucleotídeos seqüenciados (sendo uma exceção o gene *SSU rRNA*, conforme consulta realizada no GenBank às 12:30h do dia 20/01/2009) é uma limitação na pesquisa de *Giardia* spp., tanto em amostras ambientais como clínicas, visto que dificulta o desenho de iniciadores que detectem as demais espécies desse protozoário e impede que possíveis seqüências de nucleotídeos dessas espécies, obtidas pelo emprego de iniciadores que aparentemente possuem apenas *G. duodenalis* como alvo, sejam reconhecidas.

A amplificação de DNA de *Giardia muris* por iniciadores (desenhados com base nos genes *SSU rRNA*, β *giardina* e *hsp*) destinados a detecção de *G. duodenalis* foi documentada por ROCHELLE et al. (1997). Um outro grupo de pesquisadores (VAN KEULEN et al., 2002), que trabalhou com o gene *SSU rRNA*, observou que iniciadores, específicos para o genótipo A e B, amplificaram DNA de *G. ardeae* e *microti*, respectivamente. Tais achados levantam questão sobre os fragmentos amplificados por iniciadores específicos para *G. duodenalis*: Se o DNA de outras espécies estivesse sendo amplificado por tais iniciadores, esse fato poderia não ser detectado por falta de seqüências dessas espécies depositadas no GenBank, com exceção de estudos realizados no gene *SSU rRNA*.

Assim, uma alternativa para se conhecer as demais espécies de *Giardia* circulantes no ambiente, e até mesmo em amostras clínicas, seria trabalhar com o gene *SSU rRNA*, que já possui seqüências de outras espécies desse protozoário depositadas no GenBank.

Todavia, algumas pesquisas que analisaram amostras ambientais, apesar de terem empregado iniciadores que têm como alvo fragmentos do gene *SSU rRNA* e que são capazes de identificar outras espécies desse protozoário (VAN KEULEN et al., 2002; PLUTZER et al., 2008), encontraram apenas *G. duodenalis* em tais amostras.

Na presente pesquisa empregou-se o gene *gdh* para a caracterização dos isolados de *Giardia*, que por não ser conservado, é amplamente utilizado em trabalhos de diferenciação entre genótipos do parasita em questão (READ et al., 2004; VAN DER GIESSEN et al., 2006; PLUTZER et al., 2008). No entanto, uma desvantagem do emprego desse gene é o fato de não haver, até o momento, seqüências de nucleotídeos dessa região genômica para as outras espécies de *Giardia* depositadas no genbank (com exceção de uma seqüência de *G. ardeae*).

Assim, em estudos futuros, seria importante a aplicação do gene *SSU r RNA* para a caracterização de isolados de *Giardia*, porém, como alguns autores afirmam tratar-se de um gene que apresenta limitações na diferenciação em nível genotípico desse microorganismo (MONIS et al., 1999; VAN DER GIESSEN et al., 2006), seria interessante o seu emprego aliado a outro gene que apresente um maior polimorfismo genético, como o *gdh*.

A aplicação de mais de um gene nos estudos de genotipagem de *Giardia* também tem sido recomendada para a obtenção de resultados mais confiáveis. Alguns autores relataram que a caracterização molecular de um mesmo isolado pelo emprego de mais de um gene pode resultar em conclusões diferentes quanto ao enquadramento de tal isolado em um genótipo (READ et al., 2004; ROBERTSON et al., 2006; ROBERTSON et al., 2007). READ et al. (2004) explicam que isso pode ter se dado pela presença de infecção mista, de modo que um isolado teria sido preferencialmente amplificado em relação ao outro em um determinado gene. Já o grupo de ROBERTSON et al. (2006 e 2007) levantam questão sobre qual o critério adequado para enquadrar isolados em um determinado genótipo, indicando que futuras pesquisas sobre esse tópico serão necessárias. Além disso, alertam para que se tenha cuidado ao enquadrar um isolado em determinado genótipo com base em uma única seqüência.

O levantamento bibliográfico de trabalhos que realizaram a genotipagem de isolados de *Giardia* de amostras ambientais (Quadro 4)

mostrou que ainda não há um consenso sobre a metodologia a ser empregada nesses casos.

Em relação ao volume de amostra processada, esse pode variar de 2 a 20L para amostras de águas superficiais e de 50ml a 5L para amostras de esgoto, ocorrendo exceções para este último tipo de amostras, nos quais 15-20L e 25-50L foram utilizados nos trabalhos de CACCIÒ et al. (2003) e de CASTRO-HERMIDA et al. (2008), respectivamente.

Embora a etapa de concentração seja composta de centrifugações, precedidas ou não por filtrações, nota-se, em alguns casos, a aplicação de técnicas de purificação, com destaque para a IMS, que é mais observada (SULAIMAN et al., 2004; ROBERTSON et al., 2006; CASTRO-HERMIDA et al., 2008 e PLUTZER et al., 2008). Outros procedimentos utilizados são o de etil acetado e a flutuação em gradiente de percoll-sacarose (BERTRAND E SCHWARTZBROD, 2007).

Para a etapa de extração de DNA, a maioria dos trabalhos utiliza kit, e dentre os outros, GUY et al. (2003) empregaram kit associado a etapas como ciclos de congelamento e descongelamento, proteinase K e sonicação; CACCIÒ et al. (2003) seguiram o protocolo de DA SILVA et al. (1999); VAN KEULEN et al. (2002) realizaram extração de fenol-clorofórmio-isoamílico precedida de fervura da amostra em NaCl a 2,5M e ANCENO et al. (2007) propõe uma nova extração, que consiste no emprego das seguintes etapas: Dnase, isotiocianato de guanidina, ciclos de congelamento e descongelamento, proteinase K, sonicação, Chelex 100 e precipitações com álcool.

Por fim, dentre os trabalhos analisados notou-se a aplicação de diferentes tipos de PCR, tais como a convencional, a semi-nested, a nested e a em tempo real, o que ressalta que não há uma PCR padrão para estudos de caracterização molecular de *Giardia*, fato já observado por NANTAVISAI et al. (2007).

Em 1997, ROCHELLE et al. afirmaram que para a detecção de *Giardia* por PCR ser empregada na rotina seria necessário um consenso sobre os

métodos e iniciadores a serem utilizados, e atualmente essa é uma questão ainda não resolvida, como mostram os trabalhos citados anteriormente.

No presente trabalho, para o processamento das amostras de esgoto bruto adotou-se o volume de 100ml, por ter sido suficiente para as amostras desse estudo e em amostras de outras pesquisas (SULAIMAN et al., 2004). Além disso, trata-se de um volume pequeno, o que facilita o transporte da amostra até o laboratório. A filtração desse tipo de matriz parece não ser necessária, uma vez que quando esta foi realizada (amostra EB1, Quadro 5) a banda de 890pb foi menos intensa do que a da mesma amostra não filtrada.

Uma limitação encontrada em estudos que aplicam a PCR na detecção de *Giardia* em amostras de água e esgoto é a presença de inibidores da PCR em tais amostra. Tais inibidores são compostos fenólicos, encontrados em meio aquático por fontes naturais, pela biodegradação de substâncias húmicas, ligninas e taninos, e por meios artificiais, representados pela degradação de pesticidas e herbicidas, além dos derivados de plásticos (BRUZZONITI et al., 2000).

Em 1997, ROCHELLE et al. relataram que o uso de BSA foi eficiente na remoção da ação dos inibidores, no entanto ressaltou que amostras com alta turbidez provavelmente necessitariam de uma etapa de purificação anterior a PCR.

Outros pesquisadores (GUY et. al, 2003) perceberam que a aplicação de BSA removeu o efeito dos inibidores em algumas amostras, entretanto para outras foi necessário o uso de PVP 360 (2%) seguido de Chelex 100 (a 5 ou 20%), pois somente a aplicação de Chelex 100 não removeu tais inibidores.

Atualmente, a técnica de separação imunomagnética (IMS) parece ser uma alternativa para lidar com essa questão e seu emprego levou ao sucesso na amplificação do DNA de diversas pesquisas (SULAIMAN et al., 2004; ROBERTSON et al., 2006; PLUTZER et al., 2008; CASTRO-HERMIDA et al., 2008), no entanto, apresenta um alto custo, o que dificulta seu emprego, principalmente em países em desenvolvimento (ANCENO et

al., 2007). O trabalho de ANCENO et al. (2007) propõem uma extração de DNA sem a necessidade de empregar a IMS e kit de extração, também considerados dispendiosos.

Embora o procedimento para extração de DNA proposto por ANCENO et al. (2007) pareça promissor, no presente trabalho a técnica adotada para esse procedimento foi a de ARAÚJO et al., 2006. Tal escolha se deu pois essa técnica foi empregada em diversos trabalhos, que com sucesso caracterizaram molecularmente o protozoário *Cryptosporidium* (ARAÚJO et al., 2006 e 2008; GONÇALVES et al., 2008).

Assim, uma tentativa de remoção dos inibidores das amostras foi o uso de PVP durante a extração de DNA e na PCR. Segundo ARAÚJO et al. (2008) esse aditivo é útil na remoção de interferentes das amostras ambientais, além de ser considerado de baixo custo. Sua atuação se dá pela formação de complexos com grupos fenólicos (CULLEN e HIRSCH, 1998). Todavia, ao longo dos experimentos notou-se que outras medidas deveriam ser empregadas para a remoção de tais interferentes.

Dessa forma, optou-se por realizar a PCR com o DNA em diferentes diluições e observou-se que algumas amostras apresentaram resultado positivo nessa reação quando o DNA estava diluído em 1:1.000 ou 1:10.000 (Quadro 7). Nesse caso, entende-se que ao diluir o DNA, diluí-se também os inibidores, de modo que em uma dada diluição os inibidores tem sua ação diminuída, devido a baixa concentração, mas ainda há DNA suficiente para que a reação de amplificação ocorra. Em outra pesquisa, prática semelhante foi observada na tentativa de diminuir a ação de inibidores em amostras de fezes humanas, no entanto esses autores realizaram diluição das fezes em 50 vezes ou mais, alcançando a amplificação de DNA desejada (GOSH et al., 2000). No presente trabalho, esperava-se que mais amostras fossem alcançar a positividade quando o DNA diluído foi empregado, no entanto isso não ocorreu, o que pode ser explicado pela variação da concentração dos grupos fenólicos em diferentes corpos d'água e segundo a sazonalidade (THOSS et al., 2002).

Outra estratégia para driblar a ação dos inibidores foi realizar a PCR imediatamente após a extração de DNA. Tornou-se fundamental a aplicação dessa medida ao observar que amostras com resultado positivo na PCR apresentavam resultado negativo em reação semelhante realizada dias depois, o que pode ser explicado pela ação dos inibidores. Anteriormente o DNA era extraído e armazenado a 4°C por longos períodos, como foi o caso das amostras AS2, 3 e 4, que foram armazenadas por 2 meses (AS2 e 3) e 12 dias (AS4), e só então realizava-se a PCR, o que dificultou a análise dessas amostras (Quadro 7 e 8). Certamente que essa medida não deve ser uma etapa definitiva, sendo interessante buscar alternativas que possibilitem ao pesquisador um maior período entre a extração de DNA da amostra e a PCR, visto que problemas técnicos podem ocorrer.

O método de membrana filtrante modificado, utilizado para a concentração das amostras no presente estudo, é simples e de baixo custo, e, além disso, por possuir poucas etapas, parece propiciar uma menor perda de cistos de *Giardia*, perda essa comum em qualquer método de concentração. Esse método foi utilizado recentemente em alguns trabalhos (ARAÚJO et al., 2006; ARAÚJO, 2008), que tiveram sucesso na detecção molecular de *Cryptosporidium*.

No entanto notou-se que, apesar das medidas já implementadas até então para minimizar o efeito dos inibidores, uma etapa de purificação das amostras, anterior a extração de DNA seria necessária, escolhendo-se para esse propósito a técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (FAUST et al., 1938). Essa faz com que os cistos fiquem na superfície do sulfato de zinco, após esse ter entrado em contato com o sedimento da amostra, reduzindo a quantidade de interferentes encaminhados junto com os cistos para a extração, resultando em um DNA mais puro (Figura 8). Diversos trabalhos relatam que essa técnica apresenta altos níveis de sensibilidade (ZAJAC et al., 2002; LALLO et al., 2003; MEIRELES et al., 2008). Assim, a técnica proposta por FAUST et al. (1938) poderia ser uma alternativa de baixo custo para dificultar a ação dos inibidores.

No presente trabalho, o número de amostras analisadas foi pequeno e a maioria delas não foi processada com e sem o emprego da técnica de Faust, não sendo possível realizar uma comparação entre os dois métodos. No entanto, os dados obtidos indicam que a técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco contribui na remoção dos inibidores na PCR, visto que ocorreram resultados positivos em 64,7% (11/17) das situações em que as amostras foram processadas por essa técnica, em contraposição a apenas 33,3% (6/18) de positividade em sua ausência. Isso pode ser observado principalmente nas matrizes que comumente apresentam baixas concentrações de cistos de *Giardia*, tais como água superficial e água de poço, que apresentaram os respectivos resultados positivos: 14,2% (1/7) e 0% (0/1), na ausência da aplicação da técnica em questão, e 60% (3/5) e 100% (2/2), quando a mesma foi utilizada.

Assim, embora considere-se desnecessário que estudos futuros realizem uma comparação, baseada em análises estatísticas, entre a técnica de membrana filtrante modificada com a mesma seguida pela técnica de FAUST et al. (1938), seria interessante realizar a taxa de recuperação das duas técnicas, com a finalidade de conhecer as perdas implicadas pela técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco nessa situação, uma vez que é esperado que a aplicação da mesma gere maior perda de cistos devido ao aumento do número de etapas. Outra necessidade seria realizar uma comparação entre a aplicação da técnica de membrana filtrante seguida por Faust e a IMS, a fim de se concluir se a primeira poderia ser aplicada como uma alternativa para a técnica de separação imunomagnética.

Apesar da contribuição da técnica de Faust para o presente trabalho, foi observado que sua aplicação não garante que o DNA, armazenado por longos períodos a 4°C, permaneça em condições de ser amplificado (Quadro 9). Por isso, a recomendação de realizar a PCR imediatamente após a extração de DNA foi mantida, mesmo quando a técnica de purificação em questão foi utilizada.

Ainda em relação à técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, é possível que esta realmente leve à perda de cistos, pois observa-se que a

maior parte das amostras processadas por Faust não foram positivas quando o DNA diluído foi utilizado na PCR, mas quando realizou-se PCR em quintuplicata, o que pode indicar baixa concentração de DNA.

Uma outra dificuldade encontrada no presente trabalho foi que algumas amostras, principalmente de águas superficiais, podem apresentar um número muito baixo de cistos de *Giardia* (Quadro 4), e o emprego das técnicas de concentração, que geralmente envolvem perdas de cistos, contribuem para a redução do número dessas estruturas. No método inicial, após a concentração da amostra, apenas 200µl, de um concentrado total de cerca de 1ml, eram encaminhados para a extração. Mas concluiu-se que se a amostra tivesse poucos cistos de *Giardia*, como algumas que apresentam 2 cistos/10L, tais cistos poderiam não ter sido encaminhados para a extração, e a amostra poderia ser dada como negativa. Assim, a alteração realizada, de extrair toda a amostra concentrada, aumentou as chances de todos os cistos presentes na amostra terem o DNA extraído, e a ressuspensão de todo o DNA em apenas um tubo, ao final da extração, possibilitou que todo o DNA presente na amostra fosse encaminhado para a PCR.

Embora a nested PCR seja considerada uma reação altamente sensível (GOSH et al., 2000; MILLER et al., 2007), a maioria das amostras analisadas no presente trabalho precisou ser submetida a uma nested PCR em quintuplicata para atingir sucesso na amplificação do DNA dos isolados de *Giardia*, o que confirmou achados anteriores (ARAÚJO et al., 2006; ARAÚJO et al., 2008). Isso pode ser explicado pelo baixo número de cistos em algumas amostras, ou ainda pela alta concentração de inibidores mascarando a presença de DNA do microorganismo em estudo. A negatividade que algumas amostras (como ET1 e AS 4 e 5) apresentaram na nested PCR pode ser explicada pela ausência da realização de quintuplicata (Quadro 8).

Apesar de não ser uma técnica amplamente relatada na literatura em trabalhos de caracterização molecular de *Giardia*, nesse estudo, o emprego da clonagem foi fundamental. Primeiramente porque permitiu aumentar o

número de cópias do fragmento do gene *gdh* após a PCR, a fim de melhorar a qualidade do material encaminhado para o sequenciamento, como observado no trabalho de ARAÚJO et al. (2008), que realizou genotipagem de isolados de *Cryptosporidium* provenientes de amostras ambientais.

LALLE et al (2005a) analisaram seqüência do gene β *giardina* de isolados de *Giardia* de fezes humanas e encontraram algumas infecções mistas, atribuídas a presença de picos múltiplos nos eletroferogramas. Nesses casos, os autores só diferenciaram os genótipos quando esses eram pertencentes a um mesmo agrupamento. No entanto, quando detectada a ocorrência de agrupamentos diferentes, a identificação em nível genotípico não pode ser realizada devido ao grande número de diferenças nos nucleotídeos.

Outros autores também encontraram presença de dois nucleotídeos em uma mesma posição do gene analisado (HOPKINS et al., 1997; TRAUB et al, 2004; ROBERTSON et al., 2006) e embora a possibilidade de heterozigose também tenha sido levantada para explicar esses achados, o estudos de YU et al. (2002) e de MORRISON et al. (2007) mostraram que a *Giardia* possui um baixo nível de heterozigose de seqüência alélica, de modo que a primeira explicação parece ser a mais aceita.

Assim, uma vez que diferentes genótipos também podem estar presentes em amostras ambientais, o emprego da clonagem nessa pesquisa foi necessário para separar os fragmentos do gene *gdh* amplificados de diferentes isolados de determinada amostra, já que durante esse procedimento, cada plasmídeo recebe apenas um inserto.

Dessa forma o método proposto mostrou ser eficiente na detecção e caracterização molecular de isolados de *Giardia* em amostras ambientais, e apresenta a vantagem de não necessitar da aplicação de kits de separação imunomagnética e de extração, sendo uma alternativa para a realização desses tipos de estudos em países em desenvolvimento.

Embora considerada uma técnica de alto custo, e, portanto, de difícil aplicação em tais países (HAQUE et al., 2007), a PCR em tempo real possui inúmeras vantagens: alta sensibilidade e especificidade, elimina processos

empregados após a realização da PCR, é rápida, possibilita obtenção de resultados quantitativos, permite a análise de grande número de amostras e de estudos de variabilidade genética, podendo ser realizada para diferentes alvos em uma mesma reação. Além disso, em longo prazo pode ser considerada econômica pela diminuição de gastos com reagentes (VERWEIJ et al., 2003 e 2004; GUY et al., 2003 e 2004). Dessa forma seria interessante sua aplicação em estudos futuros.

6 CONCLUSÕES

A estratégia empregada nesse estudo, que consistiu das etapas de concentração pela técnica de membrana filtrante modificada ou por centrifugação, técnica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, extração de DNA genômico pelo método de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico, amplificação de fragmento do gene *gdh* por meio de nested PCR, clonagem e sequenciamento, possibilita a caracterização molecular de isolados de *Giardia* de amostras de água e esgoto.

Os achados obtidos indicam que, no estado de São Paulo, os agrupamentos A, genótipo All, e B de *Giardia duodenalis*, associados a giardíase humana, estão presentes em esgoto tratado e em águas superficiais e de poço.

O contato com as matrizes analisadas pode representar risco para a saúde pública.

7 RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se atenção no tratamento de esgoto e de água para consumo humano, além de cuidado no reuso de águas residuárias e em seu lançamento em mananciais.

Aconselha-se que poços e tanques sépticos sejam construídos por meio de técnicas que impeçam a infiltração de águas superficiais e demais riscos de contaminação.

A realização de estudos de detecção, quantificação e genotipagem de cistos de *Giardia duodenalis* em água e esgoto deve ser estimulada, a fim de proporcionar dados suficientes para tomadas de decisão por parte das autoridades.

8 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. J Vet Med Sci. 2003;65(1):29-33.

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. Jpn J Infect Dis. 2005;58:57-8.

Adam RD. The biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev. 1991; 55(4):706-732.

Almeida AA, Delgado ML, Soares SC, Castro AO, Moreira MJ, Mendonça CM, Canada NB, Da Costa JM. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. J Eukaryot Microbiol. 2006;53:177-178.

Anceno AJ, Katayama H, Houpt ER, Chavalitsheewinkoon-Petmitr P, Chuluun B, Shipin OV. IMS-free DNA extraction for the PCR-based quantification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in surface and waste water. Int J Environ Health Res. 2007;17(4):297-310.

Amar CFL, Dear PH, Pedrasa-díaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. J Clin Microbiol. 2002; 40:446-452.

Araújo RS, Carvalho TTR, Matté GR, Fernandes LN, Balsalobre LC, Matté MH. Modified method for detection of *Cryptosporidium* oocysts using DNA templates extracted from environmental samples. Revista Brasileira de Vigilância Sanitária. 2006; 3:3-4.

Araújo RS. Genotipagem de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras de águas superficiais e recreacionais como fonte de informação de dispersão de espécies no ambiente [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2008.

Aydin AF, Besirbellioglu BA, Aveli IY, Tanyuksel M, Araz Engin, Pahsa A. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;50:147-151.

Basso RMC, Silva-Ribeiro RT, Soligo DS, Ribacki SI, Callegari-Jacques SM, Zoppas BCA. Evolução da prevalência de parasitoses intestinais em

escolares em Caxias do Sul, RS. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(3):263-268.

Benachenhoun-Lahfa 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. J Mol Evol. 1993;36:335-346.

Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. J Clin Microbiol. 2005;43(12):5940-5944.

Bertrand I, Schwartzbrod J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and fecal contamination origin. Water Res. 2007;41(16):3675-82.

Berrili F, Di Cade D, D'Orazi C, Orecchia P, Xhelilaj L, Bejko D, Çaçã P, Bebeci D, Cenko F, Donia D, Divizia M. Prevalence and genotyping of human isolates of *Giardia duodenalis* from Albania. Parasitol Int. 2006;55(4):295-7.

Bicudo DC, Forti MC, Bicudo CEM. Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. São Paulo: Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo; 2002).

Bonatti TR, Franco RMB, Cantusio Neto R. Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brasil. J Water Health. 2007;5(4):609-614.

Branco N. Avaliação da presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas minerais naturais de nascentes e enteroparasitoses em duas comunidades rurais da cidade de Campos do Jordão, SP, Brasil [dissertação de mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº 518/2004/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação geral de Vigilância em Saúde Ambiental – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

Bruzzoniti MC, Sarzanini C, Mentasti E. Preconcentration of contaminants in water analysis. J Chromatogr A. 2000;902:289-309.

Burke JA. Giardiasis in childhood. Am J Dis Child. 1975;129:1304-1310.

Cacciò S, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from faecal samples. *Int J Parasitol.* 2002;32:1023-10310.

Cacciò SM, De Giacomo M, Aulicino FA, Pozio E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(6):3393-3398.

Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A e B. *Int J Parasitol.* 2008;38:1523-1531.

Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implication for taxonomy and molecular epidemiology. *Experimental Parasitology.* 2009 (article in press).

Cantusio Neto R, Franco RMB. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. *Higiene Alimentar.* 2004;18:52-59.

Carmena D, Aguinagalde X, Zigorraga C, Fernández-Crespo JC, Ocio JA. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *Journal Appl Microbiol.* 2007;102:619-629.

Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Albuquerque CP, Leite JPG, Bóia MN. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(3):346-348.

Castro-Hermida JA, García-Presedo I, Almeida A, González-Warleta M, Da Costa JMC, Mezo M. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Res.* 2008;42:3528-3538.

Coupe S, Delabre K, Pouillot R, Houdart S, Santillana-Hayat M, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;47:351-359.

Cooper MA et al. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol.* 2007;17:1984-1988.

Cullen DW, Hirsch PR. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol Biochem.* 1998;30:983-993.

Da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Moura INS, Slemenda SB, Tuttle JL, Pieniazek NJ. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Mol Diagn*. 1999;4:57-64.

Dias Júnior O. Occurrence of *Giardia* spp cysts and *Cryptosporidium* spp oocysts in surface waters and sewage from Araras city, São Paulo, Brazil [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade Presbiteriana Mackenzie; 1999.

Durigan M, Branco N, Gomes JF, Cantusio Neto R, Souza AP, Franco RMB. Caracterização molecular de cistos de *Giardia duodenalis* obtidos de amostras clínicas e ambientais na cidade de Campinas, São Paulo. In: XVI Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2008, Campinas. CD ROM de Resumos do XVI Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2008.

Enriquez C, Nwachuku N, Gerba CP. Direct exposure to animal enteric pathogens. *Rev Environ Health*. 2001;16:117-131.

EPA – Environmental Protection Agency United States. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration/IMS/IFA. 2005. Disponível em <http://www.epa.gov/microbes/> Acesso em 06 de março de 2009.

Erlandsen SL, Bemrick WJ. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J Parasitol*. 1987;73:623-629.

Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, van Keulen H, Jaroll EL. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J Parasitol*. 1990a;76:717-724.

Erlandsen SI, Sherlock SA, Bemrick WJ, Ghobrial H, Jakubowski W. Prevalence of *Giardia* spp. in beaver and muskrat populations in northeastern states and Minnesota: detection of intestinal trophozoites at necropsy provides greater sensitivity than detection of cysts in fecal samples. *Appl Environ Microbiol*. 1990b;56:31-36.

Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohýnková E, Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44(6):626-35.

Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):35-54.

Faust EC, D'Antoni JS, Odom V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie JE, Walker JH. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. *Am J Trop Med.* 1938;18:169-183.

Feely DE. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *J Protozool.* 1988;35(1):52-4.

Fontaine M, Guillot E. An immunomagnetic separation-real time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. *J Microbiol Methods.* 2003;54:29-36.

Franco RM, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2001;43(2):109-111.

Franco RMB. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. *Rev Panam Infectol.* 2007;9(4):36-43.

França RB, Franco RMB. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp em esgoto do Hospital das Clínicas da Unicamp, Campinas, Brasil. In: XIV Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM Empreendedorismo, Inovação Tecnológica e Desenvolvimento Regional; 2006; Campinas.

Fricker CR, Crabb J. Waterborne criptosporidiosis: Detection methods and treatment options. *Adv Parasitol.* 1998;40:241-278.

Furness BW, Beach MJ, Roberts JM. Giardiasis surveillance – United States, 1992-1997. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2000;49:1-13.

García LE, Campos AC, Cardoso EJ. Genotype of *Giardia duodenalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol Res.* 2005;97(1):1-6.

Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Tropica.* 2007;102:92-99.

Gonçalves EMN; Araújo RS; Orban M, Matté GR, Matté MH, Corbett CE. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2008;50(3):165-7.

Gosh S, Debnath A, Sil A, De S, Chattopadhyay DJ, Das P. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Mol Cell Probes.* 2000;14:181-189.

Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA. Real-Time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(9):5178-5185.

Guy RA, Xiao C, Horgen PA. Real-time PCR for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in Stool Specimens. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3317-3320.

Hachich EM, Sato MI, Galvani AT, Menegon JR, Mucci JL. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. *Water Sci Technol.* 2004;50(1):239-45.

Hancock D, Besser T, Lejeune J, Davis M, Rice D. The control of VTEC in aniaml reservoir. *Int J Food Microbiol.* 2001;66:71-78.

Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis.* 2005;192(12):2171-3.

Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman SMM, Mondal D, Houpt E, Petri JR WA. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(4):713-717.

Heitman TL, Frederick LM, Viste JR, Guselle NJ, Morgan UM, Thompson RCA, Olson ME. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Can J Microbiol.* 2002;48:530-541.

Heller L, Bastos RKX, Vieira MBCM, Bevilacqua PD, de Brito LLA, Mota SMM, Oliveira AA, Machado PM, Salvador DP, Cardoso AB. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 2004; 13(2):79-92.

Hlavsa MC, Watson JC, Beach MJ. *Giardia* surveillance-US, 1998-2002. *MMWR CDC Surveillance Summaries.* 2005;54(SS01):9-16.

Homan WL, van Enkevort FH, Limper L, van Eys GJ, Schoone GJ, Kasprzak W, Majewska AC, van knapen F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analisys and recombinant DNA probes. *Parasitol Res.* 1992;78:316-323.

Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 2001;31:822-826.

Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 1997;83:44-51.

Hunter PR, Thompson RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol.* 2005;35:1181-1190.

Inpankaew T, Traub R, Thompson RC, Sukthana Y. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2007;38(2):247-55.

Isaac-Renton JL, Cordeiro C, Safaris K, Shahriari H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J Infect Dis.* 1993;164:31-40.

Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causer L, Wilkins PP. Evaluation of three commercial assays for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 2003;41:623-626.

Karanis P, Opiela K, Renoth S, Seitz HM. The possible implication of muskrats to contaminate surface waters supplies with *Giardia* spp. cysts. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis.* 1996;284:302-306.

Karanis P, Sotiriadou I, Kartashev V, Kourenti C, Tsvetkova N, Stojanova K. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ Res.* 2006;102:260-271.

Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 2007;5(1):1-38.

Kuhn RC, Rock CM, Oshima KH. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande River Valley in southern New Mexico. *Applied Environ Microbiol.* 2002;68(1):161-165.

Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 2005a;35:207-213.

Lalle M, Cardoso EJ, Cacciò SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a β -giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol.* 2005b;91(1):203-205

Lallo MA, Rodrigues LCS, Bondan EF. Giardíase em cães e gatos – revisão. *Clin Vet.* 2003;43:40-44.

Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. Crit Rev Microbiol. 2002;28:371-409.

Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich III AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A Newly revised classification of the protozoa. J Protozool. 1980;7:37-58.

Lowery CJ, Moore JE, Millar BC, Burke DP, McCorry KA, Crothers E, Dooley JSG. Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction. J Med Microbiol. 2000;49:779-785.

Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(6):581-585.

Mahbubani MH, Bej AK, Perlin MH, Schaefer III FW, Jakubowski W, Atlas RM. Diferenciation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using Polymerase Chain Reaction and Gene Probes. J Clin Microbiol. 1992;30(1):74-78.

Mank TG, Zaat JO, Deelder AM, van Eijk JT, Polderman AM. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997;16:615-619.

Mascarini LM, Donalísio MR. Giardíase e Cryptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(6):577-579.

Matos SMA, Assis AMO, Prado MS, Strina A, dos Santos LA, de Jesus SR, Barreto ML. *Giardia duodenalis* infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brasil. Cad Saude Publica. 2008;24(7):1527-1535.

Matsubayashi M, Kimata I, Abe N. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from a human and calf in Japan. Parasitol. 2005;67(3):337-340.

Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. 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*. Parasitol. 1995;111:11-17.

McGlade TR, Robertson ID, Elliott AD, Thompson RCA. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. Vet Parasitol. 2003;110:197-205.

Meireles P, Montiani-Ferreira F, Thomaz-Soccol V. Survey of giardiasis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;152:242-248.

Meloni BP et al. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J Parasitol.* 1995;81:368-383.

Miller KM, Sterling CR. Sensitivity of nested PCR in the detection of low numbers of *Giardia lamblia* cysts. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(18):5949-5950.

Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(1):98-103.

Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetic analyses of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase gene. *Parasitol.* 1996;112:1-12.

Monis PT, Andrews RH. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. *Inter J Parasitol.* 1998;28(6):981-987.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, et al. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analyses of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitol.* 1998;116:7-19.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol.* 1999;16:1135-1144.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol.* 2003;3:29-38.

Monis PT, Caccio SM, Thompson RCA. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2009;25(2):93-100.

Morrison HG, Mc Arthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science.* 2007;317:1921-1926.

Nantavisai k, Mungthing M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of the sensitivities of DNA extration and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. J Clin Microbiol. 2007;45(2):581-583.

Nash TE, Mc Cutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD, Gillin FD. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. J Infect Dis. 1985;152(1):64-73.

Nishi L. Pesquisa da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp em água da cidade de Maringá e Terra Indígena Ivaí, paraná, Brasil [dissertação de mestrado]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2007.

Oliveira PW. Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no rio Atibaia, bacia do rio Piracicaba, Campinas, São Paulo, Brasil [dissertação de mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Paulino RC. Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP [tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

Pereira MGC, Atwill ER, Barbosa AP. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás state, Brazil. Rev Inst Med. 2007;49(3):139-145.

Philippi Jr A. (ed.). Saneamento, Saúde e Ambiente. Barueri, SP: Manole; 2005.

Pittner E, Moraes IF, Sanches HF, Trincaus MR, Raimondo ML, Monteiro MC. Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade escolar na cidade de Guarapuava, PR. Revista Sallus. 2007;1(1):97-100.

Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Torokné A, Márialigeti K. Detection and Characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSU rRNA and GDH genes. Int J Hyg Environ Health. 2008;211(5-6):524-33.

Ponce-macotela M, Martinez-gordillo MN, Bermudez-cruz RM, Salazar-schettino PM, Ortega-pierres G, Ey PL. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* All subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. Int J Parasitol. 2002; 32:1201-1202.

Poxleitner MK et al. Evidence for Karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. Science. 2008; 319:1530-1533.

Ramesh MA et al. A phylogenetic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol*. 2005;15:185-191.

Ré AL. Qualidade microbiológica e parasitológica de águas de consumo humano no município de Araras-SP, com ênfase na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia lamblia* [dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Presbiteriana Mackenzie; 1999.

Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA. Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhea. *Inter J Parasitol*. 2002;32:229-231.

Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol*. 2004(4):125-130.

Rimhanen-Finne R, Ronkainen P, Hanninen M-L. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. *J Appl Microbiol*. 2001;91:1030-1035.

Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand E, Alvsvag JO, Langeland N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(3):2212-2217.

Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Gjerde BK, Langeland N. Molecular characterization of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. *J Infect*. 2007;55:79-88.

Rocha MO, Gomes MA, Costa AO, Furst C, Silva EF. Molecular characterization of brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46:273-278.

Rochelle PA, De Leon R, Stewart MH, Wolfe RL. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(1):106-14.

Rose JB, Slifko TR. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. *J Food Prot*. 1999; 62(9):1059-1070.

Ryu H, Alum A, Mena KD, Abbaszadegan M. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-potable reclaimed water. *Water Sci Technol*. 2007;55(1-2):283-290.

Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Disease Initiative'. Trends Parasitol. 2006;22(5):203-208.

Schets FM, van Wijnen JH, Schijven JF, Schoon H, de Roda Husman AM. Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, The Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these waters. Appl Environ Microbiol. 2008;74(7):2069-2078.

Schuurman T, Lankamp P, van Belkum A, Kooistra-Smid M, van Zwet A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. Clin Microbiol Infect. 2007; 13:1186-1191.

Silva RR, da Silva CAM, Pereira CAJ, Nicolato RLC, Negrão-Corrêa D, Lamounier JA, Carneiro M. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103(5):512-9.

Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol. 2000;30:1379-1393.

Smith HV, Cacciò SM, Tait A, Mclauchlin J, Thompson RCA. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infection in humans. Trends Parasitol. 2006;22(4):160-7.

Souza SLP, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HFJ, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragment of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. Vet Parasitol. 2007; 149(3-4):258-64.

Straub TM, Pepper IL, Gerba CP. Hazards from pathogenic microorganisms in land-disposed sewage sludge. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Ed Ware, GW. 1993, pp55-91. New York: Springer-Verlang.

Sulaiman IM, Jiang J, Singh A, Xiao L. Distribution of *Giardia duodenalis* genotypes and subgenotypes in raw urban wastewater in Milwaukee, Wisconsin. Appl Environ Microbiol. 2004; 70:3776-3780.

Tashima NT, Simoes MJ, Leite CQ, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009;51(1):19-24.

Thiriat L, Bogot V, Schwartzbrod J. Evaluation of a procedure for detection of viable *Giardia* cysts in wastewater sludge. *Water Sci Technol*. 1997;35:377-380.

Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potencial. *Int J Parasitol*. 2000;30:1259-1267.

Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today*. 2000;16:210-213.

Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol*. 2004;126:15-35.

Thompson RCA, Monis PT. Variation in *Giardia*: implication for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol*. 2004;58:69-137.

Thoss V, Baird MS, Lock MA, Court PV. Quantifying the phenolic content of freshwaters using simple assays with different underlying reaction mechanisms. *J Environ Monit*. 2002;4:270-275.

Thurman R, Faulkner B, Veal D, Cramer G, Meiklejohn M. Water quality in rural Australia. *J Appl Microbiol*. 1998;84:627-632.

Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RCA. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitol*. 2004;128:253-262.

Van der Giessen JWB, de Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. Genotyping of *Giardia* in dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J Parasitol*. 2006;36(7):849-858.

Van Keulen H, Homan WL, Erlandsen SL, Jaroll EL. A three nucleotide signature sequence in small subunit rDNA divides human *Giardia* in two different genotypes. *J Euk Microbiol*. 1995;42:392-394.

Van Keulen H, Macechko PT, Wade S, Schaaf S, Wallis PM, Erlandsen SL. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potencial for giardiasis. *Vet Parasitol*. 2002;108:97-107.

Vedroni JW. Estudo de casos sobre a utilização do RCD (resíduos de construção e demolição) em reaterros de valas nos pavimentos de Piracicaba SP [dissertação de mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2007.

Vernile A, Nabi AQ, Bonadonna L, Briancesco R, Massa S. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Italian water supplies. *Environ Monit Assess*. 2009;152(1-4):203-7.

Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen MAA, van Lieshout L, Polderman AM. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes*. 2003;17:223-225.

Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienens EAT, van Rooyen MAA, van Lieshout L, Polderman AM. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1220-1223.

Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop*. 2007;102:10-19.

WHO-World Health Organization. Parasitic Zoonoses - Report of a WHO Expert Committee with the participation of FAO. Report. Geneva; 1979. (WHO - Technical Report Series, 637).

WHO – World Health Organization. Intestinal protozoan and helminthic infections. Report. Geneva, 1981. (WHO - Technical Report Series, 58:666-671).

WHO – World Health Organization. The World Health Report 1996 - Fighting Disease Fostering Development. Report. Geneva; 1996.

WHO – World Health Organization. Guidelines for drinking water-quality [electronic resource]: incorporating first addendum. Vol1, Recommendations. – 3rd edition; 2006.

Yee J, Dennis PP. Isolation and characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the primitive eucaryote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*. 1992;267:7539-44.

Yong TS, Park SJ, Hwang UW, Yang HW, Lee KW, Min DY, Rim HJ, Wang Y, Zheng F. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from humans in China and Korea using ribosomal DNA sequences. *J Parasitol*. 2000; 86:887-891.

Yu LZ, Birky CW, Adam RD. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryotic Cell*. 2002; 1(2):191-199.

Zajac AM, Johnson J, King SE. Evaluation of the importance of the centrifugation a component of zinc sulfate fecal flotation examination. J Am Anim Hosp Assoc. 2002;38(3):221-224.