

VALDIR AZEVEDO DOS SANTOS

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

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

Área de concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw

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

São Paulo
2011

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fonte: Adaptado de Thompson, 2004

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

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

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

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

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

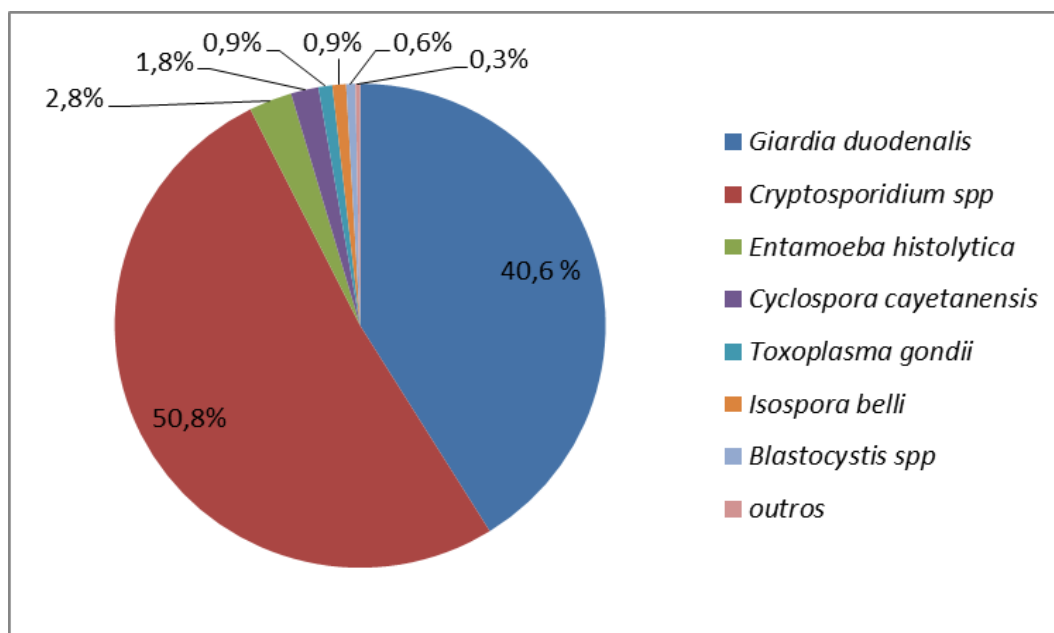


Figura 1 – Protozoários patogênicos através da veiculação hídrica.
Fonte: Adaptado de Karanis et al., 2007.

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

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

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

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

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

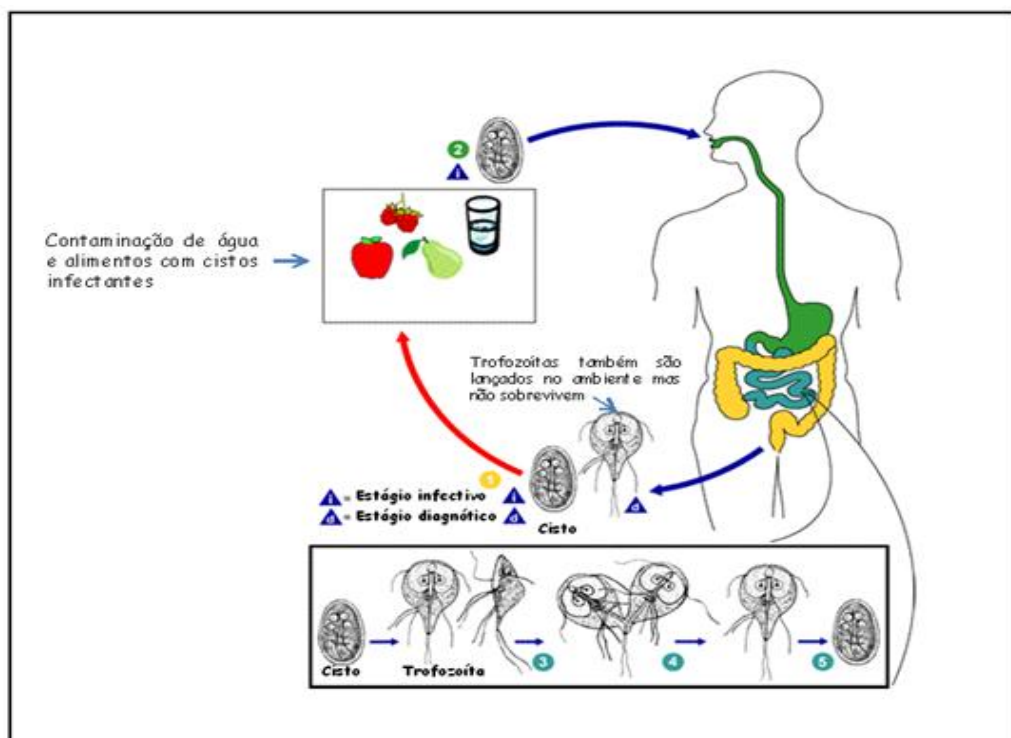


Figura 2 - Ciclo de vida do parasito *Giardia* spp.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

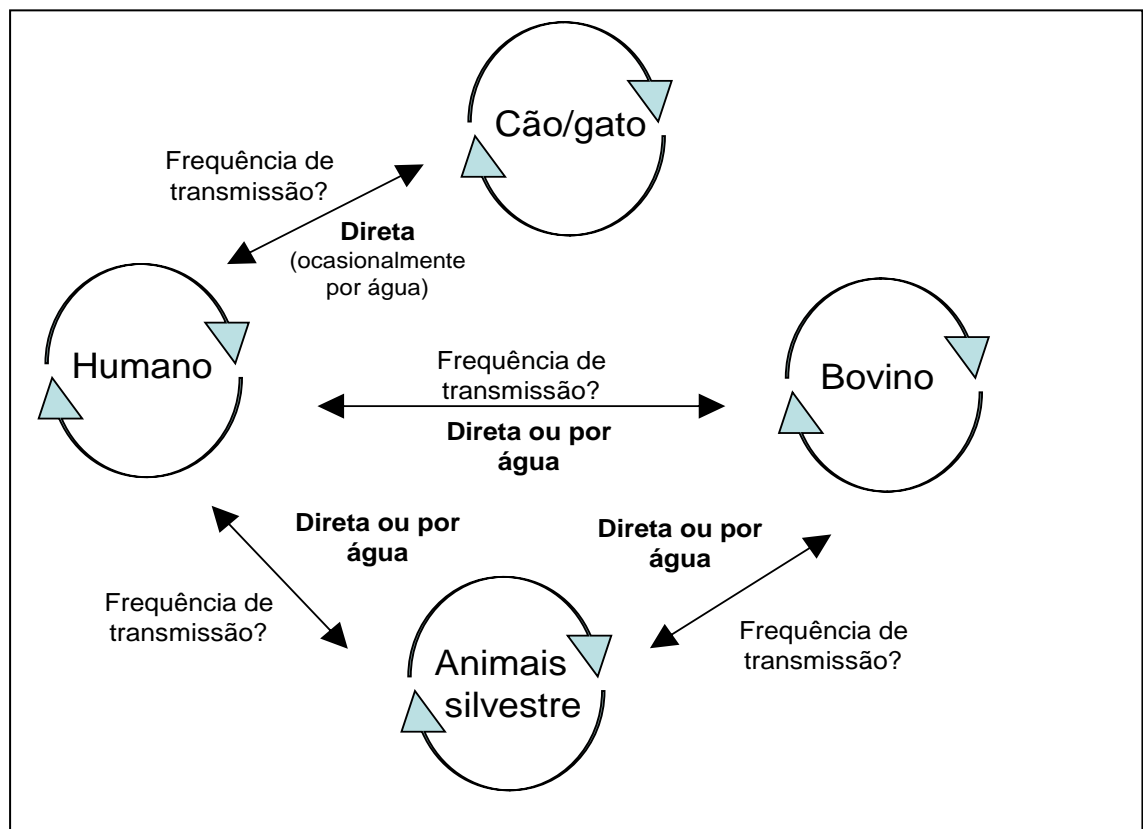


Figura 3 - Quatro principais ciclos de transmissão de *G. duodenalis*.
Fonte: Adaptado de Monis et al.; 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 CONCLUSÃO

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

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

REFERÊNCIAS*

- ADAM, R. D. Biology of *G. duodenalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 447-475, 2001.
- ALMEIDA, A. A.; DELGADO, M.L.; SOARES, S.C.; CASTRO, A. O.; MOREIRA, M. J.; MENDONÇA, C. M; CANADA N.B, DA COSTA, J. M. Genotypes analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. **J Eukaryot Microbiology**, v. 53 p. 177-178, 2006.
- APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.
- BURKE, J.A. Giardiasis in childhood. **American Journal Diseases of Children**, v. 129: p. 1304-1310, 1975.
- CACCIÒ, S. M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the *beta-giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *G. duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 1023-1030, 2002.
- CACCIÒ, S. M.; BECK, R.; LALLE, M.; MARINCULIC, A.; POZIO, E. Multilocus genotyping of *G. duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1523-1531, 2008.
- CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75-80, 2008.
- CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.
- CARMENA, D.; AGUINAGALDE, X.; ZIGORRAGA, C.; FERNÁNDEZ-CRESPO J. C.; OCIO, J. A. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 619-629, 2007.
- CARVALHO-COSTA, F.A.; GONÇALVES, A.Q.; LASSANCE, S. L.; ALBUQUERQUE, C. P.; LEITE, J. P. G.; BÓIA, M. N. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 346-348, 2007.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention, acesso em 11 de junho de 2011.

* De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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