

José Eduardo de Sousa Cruz Rocha

Caracterização molecular de isolados de *Giardia* e sua aplicação em estudos epidemiológicos

Universidade Fernando Pessoa

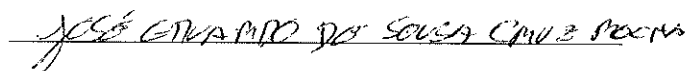
Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2009

José Eduardo de Sousa Cruz Rocha

Caracterização molecular de isolados de *Giardia* e sua aplicação em estudos epidemiológicos

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Farmacêuticas.”

A handwritten signature in black ink, reading 'JOSÉ EDUARDO DE SOUSA CRUZ ROCHA', written over a horizontal line.

Errata

No índice, no ponto 6.1, onde se lê “desesquistamento” dever-se-á ler “desenquistamento”.

No índice, no ponto 2 do Material e Métodos, onde se lê “Giardia” dever-se-á ler “*Giardia*”.

Na página 12, no primeiro e no fim do segundo parágrafo, onde se lê “Giardia” dever-se-á ler “*Giardia*”.

Na página 14, no fim do primeiro parágrafo, onde se lê “contrario” dever-se-á ler “contrário” e onde se lê “contem” dever-se-á ler “contém”.

Na página 18, no início do primeiro parágrafo, onde se lê “detoxificação” dever-se-á ler “destoxificação”.

Na página 20, no segundo parágrafo, a vírgula colocada após a palavra colesterol deverá ser retirada e colocada a seguir à palavra processo.

Na página 22, no fim do terceiro parágrafo, onde se lê “lipidos” dever-se-á ler “lípidos”.

Na página 28, onde se lê “de deriram” dever-se-á ler “que derivam”, e no primeiro parágrafo, onde se lê “de dispomos” dever-se-á ler “que dispomos”.

Na página 31, no segundo parágrafo, onde se lê “Change” dever-se-á ler “Charge”.

Na página 32, onde se lê “Magma Rack” ou “Magma Rock”, dever-se-á ler “Magna Rack”.

Na página 32, onde se lê “Carge” dever-se-á ler “Charge”.

Na página 35, onde se lê “Giardia duodenalis” dever-se-á ler “*Giardia duodenalis*”.

Na página 42, onde se lê “VI- Bibliografia” dever-se-á ler “V- Bibliografia”.

Ao longo do texto, onde se lê “encistamento” dever-se-á ler “enquistamento”, e onde se lê “desencistamento” dever-se-á ler “desenquistamento”.

Sumário

A *Giardia* é um protozoário microscópico que invade a mucosa intestinal, provocando uma atrofia das vilosidades intestinais, alterando a absorção normal dos nutrientes. O quisto é a forma infecciosa, transmitida ao homem pela ingestão de água e alimentos contaminados.

O exame às fezes é a forma clássica de diagnóstico laboratorial de *Giardia*, existindo agora técnicas mais avançadas, que melhoram a qualidade de detecção deste parasita. É considerada como a principal causa de surtos de diarreia com origem na contaminação de água.

A *Giardia* está distribuída mundialmente, em Portugal a sua prevalência varia entre 9% e 28% em crianças e jovens até aos 16 anos, dependendo das condições socioeconómicas e de saneamento.

Neste trabalho foram aplicadas alterações nas metodologias que permitem o isolamento, concentração, extracção e amplificação com objectivo, de obtermos, de uma forma rápida e eficaz, uma boa amostra de DNA genómico. Amplificou-se o gene da β -giardina, proteína considerada única na *Giardia spp.*.

As amostras de três crianças contaminadas foram comparadas com a sequência de uma estirpe de referência (ATCC). Uma das amostras obtidas apresentava diferenças a nível da sequência do gene seleccionado, sugerindo, assim, a presença de estirpes distintas em circulação na comunidade. A aplicação em maior escala deste tipo de metodologia, permitirá novas informações sobre a epidemiologia da giardíase.

Abstract

Giardia is a microscopic protozoa able to invade the intestinal mucosa, causing significant villus atrophy thus altering nutrient absorption. The infectious form of this parasite is the cyst, generally transmitted to men by the ingestion of contaminated water or food.

While there are now several advanced methodologies, which greatly increase Giardia detection, faecal analysis is still the most used technique.

Considered as the main cause of waterborne diarrheic outbreaks, Giardia is distributed worldwide, with a prevalence, in Portugal, ranging from 9 to 28% in children up to 16 years, depending on socio-economic conditions.

In this work, minor alterations to usually used methodologies were applied, aimed at isolating and concentrating the cysts, followed by a process of extraction and amplification of genomic DNA. The β -giardin gene, which expressed a Giardia specific

Samples from three Giardia infected children were obtained and compared with a reference strain (ATCC). One of the samples presented a distinct genomic sequence, thus suggesting that different strains may be circulating among the community. The application of the used methodology in a larger scale would surely provide new and valuable information on Giardia epidemiology.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Nuno Monteiro.
A todas as pessoas que me apoiaram e ajudaram na concretização desta monografia.

Índice

Índice	8
Índice de Tabelas	10
Índice de Figuras	11
I. Enquadramento Teórico	12
1. Classificação de <i>Giardia</i>	12
2. A descoberta do parasita.....	12
3. Taxonomia e classificação de <i>Giardia</i>	13
4. Espécies de <i>Giardia</i> actualmente aceites	14
5. Morfologia.....	14
6. Ciclo de Vida.....	18
6.1 Processo de desesquistamento	19
6.2 Processo de enquistamento.....	20
7. Epidemiologia	21
8. Patofisiologia.....	22
9. Sintomatologia.....	24
10. Diagnóstico laboratorial	25
11. Tratamento.....	27
12. Profilaxia	28
13. Objectivos do estudo	29

II – Material e Métodos	30
1. Amostra	30
2. Purificação de quistos de Giardia por gradiente de sacarose	30
3. Extracção e purificação do DNA.....	31
3.1 Extracção do DNA.....	31
3.2 Separação do DNA	31
3.3 Lavagem do DNA.....	32
3.4 Separação final do DNA.....	32
4. Reacção em cadeia da polimerase	32
5. Electroforese.....	34
6. Purificação e sequenciação.....	34
7. Ajustamento das sequências de DNA	34
III – Resultados	35
IV – Discussão e conclusão	38
V – Bibliografia	42

Índice de Tabelas

Tabela I – Protocolo dos reagentes utilizados no PCR para a identificação de <i>Giardia</i>	33
Tabela II – Constituintes do Master mix	33
Tabela III – Sequências finais de cada amostra.....	36

Índice de figuras

Figura 1 – Fotografia de um trofozoíto (Amp-1000x)	15
Figura 2 – Trofozoíto em divisão (Amp-1000x)	16
Figura 3 – Fotografia de um quisto (Amp-1000x)	18
Figura 4 – DNA de <i>Giardia</i> em electoforese em gel de agarose a 1%.....	35
Figura 5 – DNA de <i>Giardia</i> em electoforese em gel de agarose a 2%.....	36
Figura 6 – Visualização das cinco substituições na amostra 2	37

I-ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. Classificação de *Giardia*

Giardia lamblia é um protozoário entérico responsável pela enteropatia parasitária conhecida como giardíase. É um parasita flagelado, bi-nucleado, que pode estar presente no tracto intestinal dos humanos, e de vários outros mamíferos no mundo inteiro, com maior prevalência em jovens e onde exista uma concentração de hospedeiros susceptíveis (Rosez, 2002).

2. A descoberta do Parasita

O primeiro relato deste parasita (na forma de trofozoíto) foi feito por Van Leeuwenhoek, no ano de 1681, a partir das suas próprias fezes, na forma hoje conhecida como trofozoíto e que ele denominou de animáculo (Meyer, 1990). Posteriormente, em 1859, o Vilem Lambl descreveu o organismo mais detalhadamente e relatou a sua presença no intestino de humanos. Designou-o de *Cercomonas intestinalis* quando observado em humanos e *Dimorphus muris* quando observado em roedores. Blanchard, em 1888, deu o nome de *Lambli* ao género, em homenagem a Lambl (Adam, 2001). Não existem provas que Leeuwenhoek e Lambl tenham descrito o organismo na sua forma cística. Só em 1879, Grassi observou, pela primeira vez, os quistos deste protozoário, mas supôs serem coccídios. Apenas mais tarde, entre 1881 e 1888, os associou à forma flagelada do organismo (Mayer, 1990). Em 1902, a nomenclatura foi modificada por Stiles para *Giardia duodenalis*.

Dezoito anos mais tarde, em 1920, Kofoid e Christiansen sugeriram os nomes de *Giardia lamblia* e *Giardia enterica*. Por fim, em 1952, Felice publicou uma descrição morfológica pormenorizada de *Giardia* e propôs a existência de três espécies que se diferenciam com base na morfologia: *Giardia duodenalis*, *Giardia muris* e *Giardia agilis* (Adam, 2001). A denominação *G. lamblia* tornou-se aceite nos anos setenta mas, já na década de oitenta e noventa, os termos *G. duodenalis* e *G. Intestinalis* ressurgiram. Assim, alguns pesquisadores preferem *G. lamblia* (Adam, 2001), outros *G. intestinalis* (Kulda & Nohýnkova, 1978; Andrews *et al.*, 1989) e outros ainda *G. duodenalis* (Meyer, 1990; Thompson *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 2000). Contudo, de acordo com as regras de nomenclatura científica o nome de *Giardia duodenalis* é o correcto.

3. Taxonomia e classificação de *Giardia*

Outros cientistas encontraram organismos semelhantes em animais aquando da descrição de *Giardia* em humanos por Lambl (1959). Davaine (1875) verificou a presença do parasita em coelhos, Grassi (1979) em ratos e Kunstler (1882) em girinos (Meyer, 1990). Segundo Meyer (1990), um comité da Sociedade de Protozoologistas reconheceu a necessidade de rever a classificação dos organismos do filo Protozoa e publicou uma nova classificação (Honigberg *et al.*, 1964). Posteriormente, com novas informações fornecidas sobre protozoários, principalmente, pela microscopia electrónica, a sociedade de Protozoologistas, liderado por Levine, elaborou uma revisão da classificação de Honigberg *et al.*, 1964 e propôs um nova classificação para estes organismos, que mais tarde foi adoptada pela comunidade científica como a ultima classificação oficial dos protozoários.

Recentemente, Adl *et al.* (2005), tendo em conta as informações obtidas desde 1980 através da microscopia electrónica e dos estudos filogenéticos moleculares, apresentaram uma nova proposta de classificação dos eucariotas, em particular dos protistas. Simpson & Roger 2002, 2004 adoptaram a distribuição dos eucariotas em 6 agrupamentos semelhantes aos reinos das classificações tradicionais. Porém, convém salientar que Adl *et al.*, (2005) aplicaram um sistema hierárquico, mas não usaram as denominações formais das grandes categorias taxonómicas como classe, subclasse, superordem ou ordem e, em relação aos protozoários, actualizaram a classificação de Levine *et al.*, (1980) embora esta última ainda esteja em vigor.

4. Espécies de *Giardia* actualmente aceites

São actualmente reconhecidas cinco espécies de *Giardia* (*G. duodenalis*, *G. agilis*, *G. muris*, *G. ardeae* e *G. psittaci*) embora mais de cinquenta já tenham já sido descritas (Thompson, 2004). A espécie *G. duodenalis* parasita o homem e vários mamíferos selvagens e domésticos. O trofozoíto tem forma piriforme e mede 12 a 15µm por 5 a 9µm. A espécie *G. agilis* parasita anfíbios. O trofozoíto mede 20 a 30 µm por 4 a 5 µm e os corpos medianos tem forma de bastão. A espécie *G. muris* parasita roedores. O trofozoíto mede 9 a 12µm por 5 a 7µm e os corpos medianos tem forma redonda. A espécie *G. ardeae* parasita as aves. O trofozoíto mede 10µm por 6,5µm e tem corpos medianos arredondados. A espécie *G. psittaci* parasita aves. O trofozoíto mede 14µm por 6 µm, tem formato piriforme e uma flage ventro-lateral incompleta (Thompson, 2004). Monis et al.,(2003) identificaram outra nova espécie *G. microti* que parasita os ratos, cujo quisto apresenta no seu interior dois trofozoítos diferenciados ao contrario do quisto das outras espécies que apenas contem um.

5. Morfologia

Giardia apresenta duas formas evolutivas: quisto e trofozoíto. O quisto é a forma que resiste ao ambiente externo e é transmissível aos hospedeiros. O trofozoíto é a forma vegetativa que se instala no intestino delgado do hospedeiro e causa a doença giardíase. É a forma móvel do parasita, tem formato piriforme e simetria bilateral (Figura 1 e 2), medindo aproximadamente 12 a 15µm por 5 a 9µm e apresenta a superfície dorsal convexa (Thompson, 2004).

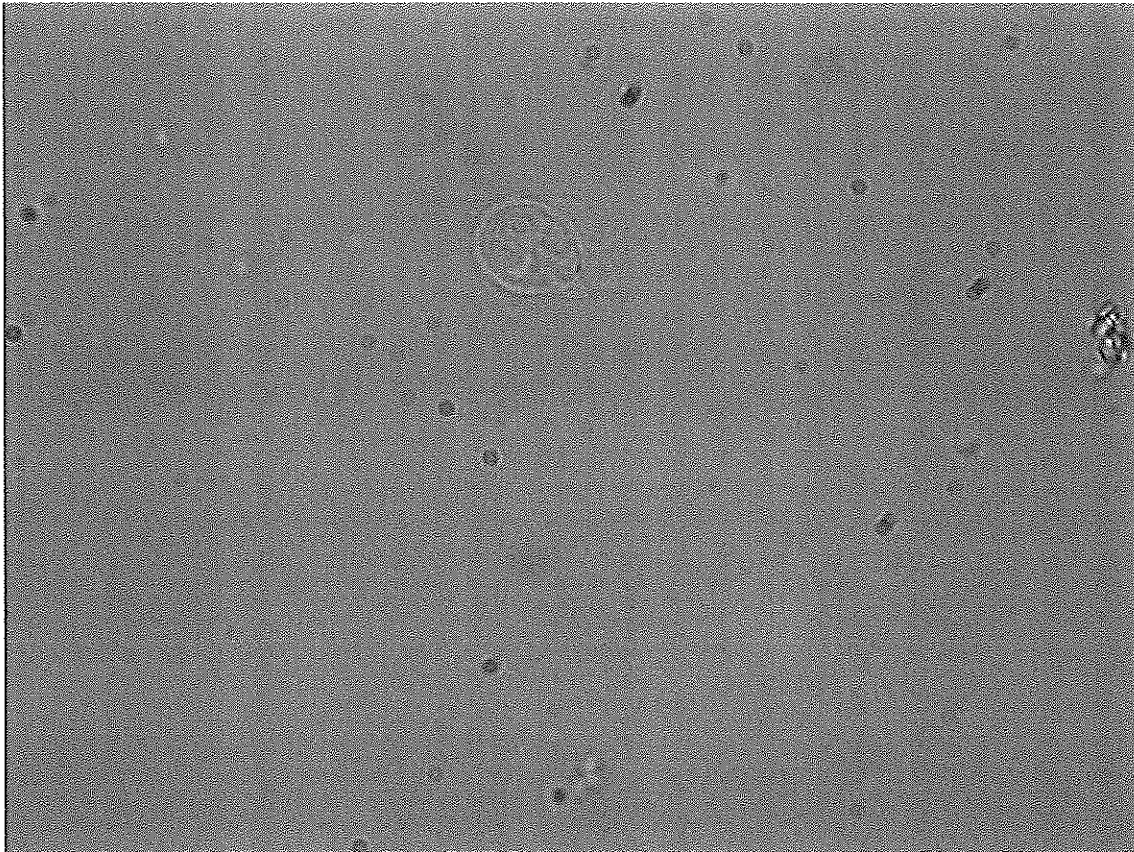


Figura 1 – Fotografia de um trofozoíto (Amp-1000x)

O citoesqueleto é formado por microtúbulos e possui dois axomas, 4 pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral) e um disco suctorial na face ventral, sendo este responsável pela fixação do parasita ao epitélio intestinal (Ortega & Adam, 1997; Adam, 2001), impedindo assim a sua eliminação pelo peristaltismo intestinal. Os oito flagelos têm origem nos corpos basais situados próximos aos núcleos e surgem das regiões anterior, posterior, ventral e caudal dos trofozoítos.

Quanto à sua estrutura cada um é formado por nove pares de microtúbulos circundando dois microtúbulos. Estas estruturas parecem ser importantes para a mobilidade e não para a adesão ao intestino do hospedeiro (Adam, 2001). Os corpos medianos, que são estruturas exclusivas da *Giardia*, localizados no meio do corpo e dorsalmente aos flagelos caudais são constituídos por um feixe de microtúbulos. A sua função é desconhecida e a sua morfologia varia de espécie para espécie (Adam, 2001). O trofozoíto tem dois núcleos situados na região anterior e simétricos relativamente ao plano longitudinal. São transcripcionalmente activos, com cariossoma central, sem nucléolos (kabnick & Peattie, 1990). Posteriormente aos núcleos e transversalmente ao plano longitudinal do trofozoíto, encontram-se duas estruturas

microtubulares intimamente associadas, com o nome de corpúsculos medianos ou parabasais, de função desconhecida (Isaac-Renton, 1991a) mas a sua configuração ajuda na diferenciação entre os vários grupos morfológicos de *Giardia* (Meng *et al.*, 1996). No citoplasma são encontrados vacúolos lisossomais, bem como grânulos ribossomais e de glicogénio (Adam, 2001). *Giardia* não possui mitocôndrias nem peroxissomas, mas possui um sistema secretor vesicular primitivo que é considerado um protótipo do aparelho secretor de Golgi dos organismos superiores (Marti *et al.*, 2003a,b). Uma estrutura constituída por membranas empilhadas sugestivo do complexo de Golgi foi já demonstrada (Adam, 2001; Gillin *et al.*, 1996; Soltys *et al.*, 1996), sendo visível em trofozoítos encistados, mas não em trofozoítos vegetativos.

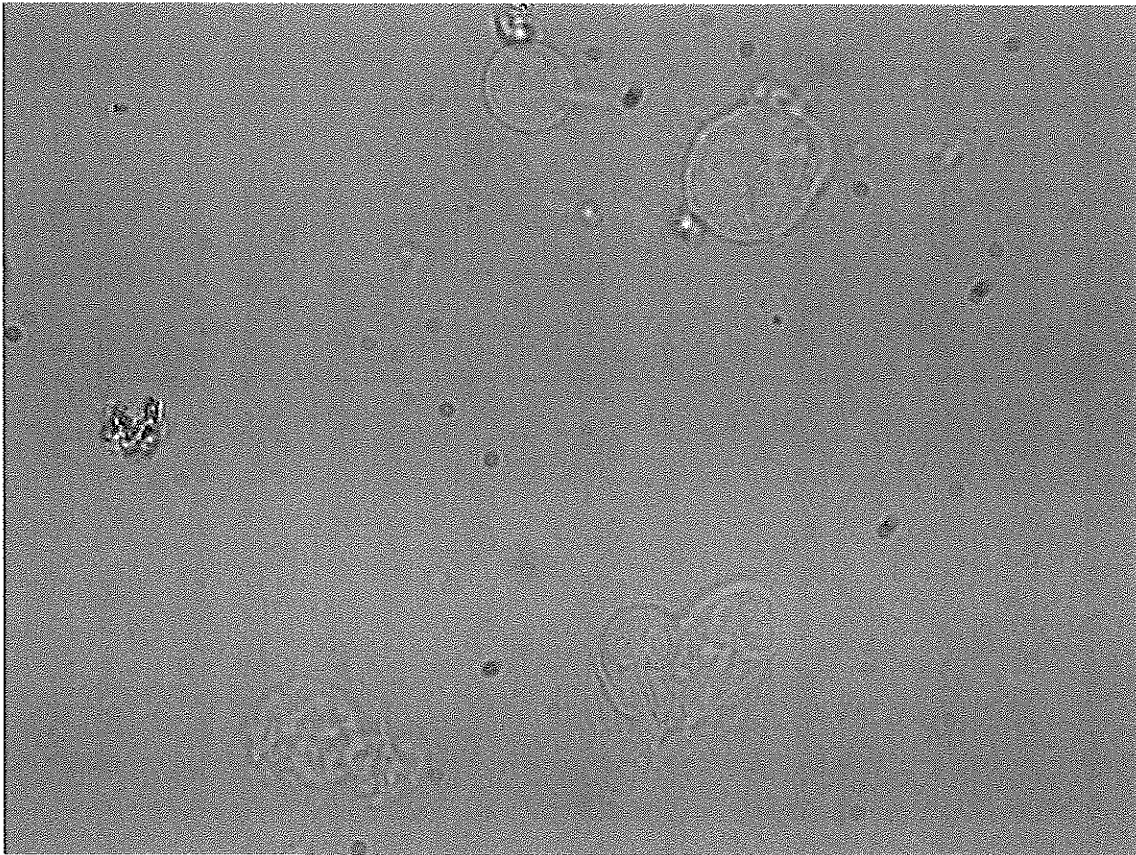


Figura 2 – Trofozoíto em divisão (Amp-1000x)

Uma outra estrutura apenas presente nos organismos do género *Giardia* é o disco ventral também conhecido por adesivo. Serve para a fixação do parasita na mucosa do intestino do hospedeiro, tendo uma forma côncava e ocupa maior parte da região anterior da superfície ventral do parasita. Neste disco estão presentes proteínas contrácteis como a actinina, α -actinina, miosina e tropomiosina sendo estas responsáveis pela contracção e adesão ao intestino (Adam; 2001).

Em relação à sua ultra-estrutura, o disco adesivo apresenta um conjunto de microtúbulos subjacentes à membrana ventral. Cada microtúbulo tem três estruturas anexas: dois filamentos laterais curtos que fazem a ligação com a membrana ventral e uma projecção em forma de faixa (*ribbon*) que se alonga até a região dorsal do citoplasma do disco adesivo (Holberton, 1973). Nos ribbons dorsais são encontradas proteínas com o nome de giardinas (α, β, γ). Já se identificaram cerca de 23 formas destas proteínas e algumas delas já foram submetidas à clonagem e sequenciação genética (Adam, 2001). O conhecimento dos genes que codificam estas proteínas permitiu o desenvolvimento de técnicas fundamentais em biologia molecular (PCR) para a detecção específica do protozoário *Giardia* presente em água e em fezes de animais e humanos (Mahbubani *et al.*, 1991).

Para a identificação dos agrupamentos de *Giardia* sp., os genes utilizados são β – giardina, proteína considerada única na *Giardia* sp. e ssu-rRNA (subunidade ribossomal RNA (Winkworth *et al.*, 2008; Guy *et al.*, 2004). São encontradas outras proteínas denominadas de tubulinas nos flagelos e nos microtúbulos do disco ventral (excepto nos ribbons). Suspeita-se que determinadas drogas usadas para o tratamento de giardíase, como por exemplo benzimidazóis, reajam com estas proteínas (tubulinas e giardinas) impedindo a aderência do parasita à mucosa e causando o rompimento do disco ventral (Adam, 2001).

Os quistos maduros (Figura 3) têm um aspecto oval ou esférico. Em relação ao trofozoíto, tem uma estrutura duplicada ou seja, são tetranucleados, com quatro grupos de axonemas. Medem cerca de 11 a 14 μ m por 4 a 10 μ m (Ortega & Adam, 1997). Estas estruturas são revestidas por uma parede com 0,3 a 0,5 μ m de espessura constituída por uma camada interna, composta por uma dupla membrana e uma camada filamentosa externa, a qual é revestida por uma teia de filamentos (Erlandsen *et al.*, 1989). Foram identificadas quatro proteínas na parede externa do quisto com respectivamente 29, 75, 88, 102 kDa. As afirmações anteriores de que a parede do quisto era composta por quitina foram refutadas (Meyer, 1990; Thompson *et al.*, 1993; Adam, 2001) O componente glicídico da porção externa é maioritariamente a galactosamina na forma de N-acetilgalactosamina (GalNac) (Jarrol *et al.*, 1989).

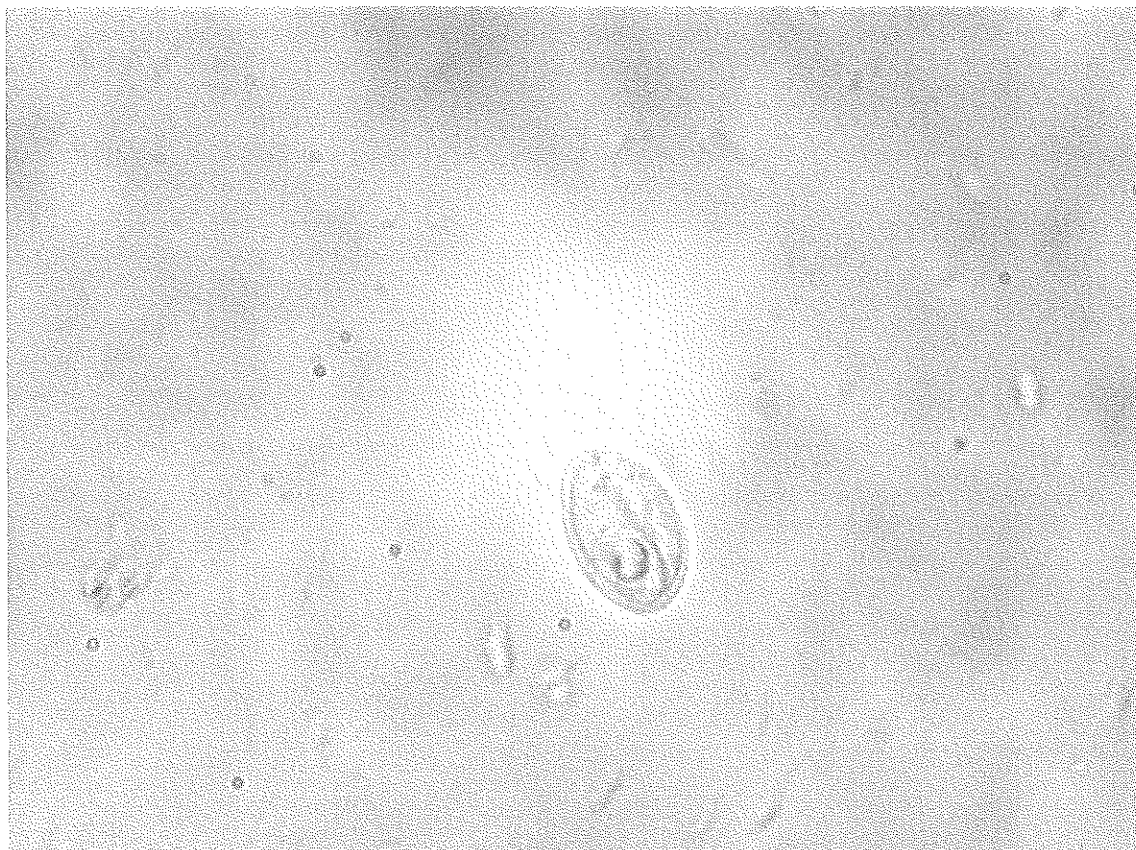


Figura 3 -- Fotografia de um quisto (Amp-1000x)

6. Ciclo de Vida

Giardia é um protozoário microaerófilo, possui metabolismo fermentativo e apesar disso, os trofozoítos de *Giardia* consomem oxigênio, necessitando de mecanismos de detoxificação. É desprovido de glutathione, expressa altas concentrações de proteínas ricas em cisteína como defesa antioxidante (Anjos, 2005). Em relação à actividade metabólica no meio ambiente, avaliada pela medição da actividade respiratória, o quisto apresenta uma redução do metabolismo de 10% a 20% relativamente à do trofozoíto, levando a uma maior viabilidade num ambiente que lhe é hostil (Paget *et al.*, 1989).

A infecção do hospedeiro pode ocorrer por ingestão de quistos de *Giardia* presentes na água, nos alimentos ou por contacto interpessoal. Este parasita apresenta um ciclo de vida monoxeno em que a fase de trofozoíto, presente no intestino do hospedeiro, alterna com a fase de quisto, estrutura de resistência libertada juntamente com as fezes para o exterior, sendo esta a forma responsável pela propagação da parasitose (Jones, 1991; Flanagan, 1992). Tentase desenvolver o ciclo de vida *in vitro* de *Giardia* com diferentes metodologias e obtêm-se

resultados distintos ao nível das duas etapas fundamentais o desencistamento, com obtenção de trofozoítos (Bingham & Meyer, 1979; Rice & Schaefer, 1981; Cedillo-Rivera *et al.*, 1991; Isaac-Renton *et al.*, 1992), e o encistamento, com obtenção de quistos viáveis (Boucher & Gillin, 1990; Kane *et al.*, 1991; Luján *et al.*, 1998).

6.1 Processo de desenquistamento

De cada quisto saem dois trofozoítos ainda unidos pelo citoplasma (Olson *et al.*, 2002). Para que ocorra o desencistamento, os quistos ingeridos passam pelo estômago do hospedeiro onde entram em contacto com o suco gástrico, extremamente ácido, de seguida passam pelo duodeno onde o quimo gástrico é neutralizado rapidamente pelo influxo de bicarbonato (Guyton & Hall, 1997). São depois expostos a várias enzimas proteolíticas e aos sais biliares (Guyton & Hall, 1997), que facilitam o desencistamento sendo, contudo, exigida a intervenção de uma cisteinoprotease interna para a realização de processo (Ward *et al.*, 1997).

Estudos *in vitro*, com quistos fecais humanos, demonstram que o desencistamento depende de um conjunto de condições que mimetizam o que ocorre *in vivo*. Essas condições são a exposição dos quistos a um pH ácido, que mimetisa a passagem pelo estômago (fase de indução) e a sua transferência para um meio neutro, onde os trofozoítos podem emergir sem perigo de destruição, reproduzindo a sua entrada no duodeno (Bingham & Mayer, 1979; Cedillo-Rivera *et al.*, 1991; Isaac-Renton *et al.*, 1992). De acordo com Thompson (1993) os trofozoítos vão-se fixar à mucosa intestinal ou por meio de uma força de sucção originada abaixo do disco ventral do trofozoíto, ou pela ligação entre proteínas do protozoário e receptores das células epiteliais do hospedeiro, ou então pela contracção de elementos proteicos do disco ventral e do flagelo ventrolateral. Cada trofozoíto fixa-se então na mucosa intestinal, na região compreendida entre o duodeno e o jejuno e divide-se por divisão binária. (Adam, 2001). Este processo (Figura 2) é repetido por cada novo parasita e em pouco tempo são produzidos vários. Alguns destes trofozoítos vão depois sofrer o processo de encistamento na porção final do intestino delgado.

6.2 Processo de encistamento

À medida que os trofozoítos se vão dividindo e colonizando a superfície do intestino alguns encistam no jejuno (Adam, 1991). Durante este processo o trofozoíto torna-se globoso, o disco ventral desaparece e o parasita enrola-se entre si mesmo, passando os flagelos a intracitoplasmáticos (Adam, 2001). A localização preferencial dos trofozoítos de *G. lamblia* na porção média do jejuno (Gillin *et al.*, 1987; Campbell & Faubert, 1994) sugere que o parasita necessita de uma grande quantidade de nutrientes e um valor de pH estável. Como na maioria das células eucariotas, a biogênese da membrana do parasita, requer colesterol (Goldstein & Brown, 1990; Jarrol *et al.*, 1981). Como este parasita não consegue sintetizá-lo, torna-se necessário obtê-lo no meio rico em nutrientes (porção superior do intestino delgado) que é bastante rico em colesterol proveniente da dieta ou da biliar (Thompson *et al.*, 1993).

Estudos indicam que a privação em colesterol, é necessária e suficiente para estimular o encistamento *in vitro* de *Giardia*, representando os sais biliares um papel secundário no processo ao inibir, quando em elevadas concentrações no meio, a absorção do colesterol e, por conseguinte, induzindo o encistamento (Lujan *et al.*, 1996). Em relação ao mecanismo, Lujan *et al.*, (1996) atribuem o encistamento a alterações na fluidez da membrana provocadas pela ausência ou presença de colesterol. Depois de desencadeado o processo, os constituintes da parede do quisto são rapidamente sintetizados e agrupados em vesículas de secreção específicas que os transportam para a membrana plasmática para serem libertadas para o exterior da célula. O encistamento finda com a formação de uma parede quística (Luján *et al.*, 1995).

Os quistos que foram recentemente formados têm dois núcleos que depois de sofrerem a divisão nuclear passam a ter quatro. Posteriormente, o disco adesivo, corpos basais, corpos medianos e os flagelos são duplicados dando origem a dois trofozoítos que permanecem ligados pelo citoplasma no interior do quisto. Os quistos depois de formados não têm capacidade de fixação e percorrem o cólon até serem eliminados juntamente com as fezes. Nas infecções bem sucedidas, a emissão de quistos inicia-se 1 a 2 semanas após a ingestão inicial (Rey, 1991). No ambiente, estes quistos resistem até dois meses em água a 8°C e por apenas quatro horas em água a 37°C. No entanto, o quisto é pouco resistente se as condições de temperatura forem muito elevadas e em locais com baixa humidade (Zajac, 1992). É uma incógnita se todos os quistos libertados nas fezes são infectantes. Existem evidências de que

os quistos de *Giardia* possam levar até sete dias para se tornarem maduros e infectantes. Em fezes diarreicas, somente o trofozoíto é encontrado e podem originar infecção caso sobrevivam à acção da secreção gástrica. Quando os quistos são ingeridos por outros hospedeiros, o ciclo de vida fecha-se e novamente haverá a libertação do trofozoíto (Rey, 1973; Schmidt & Roberts, 1981; Thompson, *et al.*, 1990; Meyer, 1990; Moares, *et al.*, 2000; Adam, 2001).

7. Epidemiologia

Giardia lamblia é um dos mais frequentes parasitas intestinais existentes na maioria dos mamíferos. Tem uma vasta distribuição mundial com uma estimativa de ocorrência de $2,8 \times 10^8$ casos anuais, segundo Lane & Lloyd (2002), ocorrendo em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Thompson *et al.*, 1990). A prevalência de *Giardia* depende da localidade e do tipo de hospedeiro. Geralmente é mais alta em humanos e animais jovens, bem como animais que vivam em abrigos públicos (Woo & Paterson, 1986; Arashima *et al.*, 1992; Collyer *et al.*, 1992 citado por Monis & Thompson, 2003; Buret *et al.*, 2002). Em indivíduos adultos, a infecção por *Giardia* pode ser assintomática. Estes grupos, constituídos por elementos assintomáticos, são muito importantes para a epidemiologia desta doença. Já em crianças, os sintomas e os sinais clínicos podem estar presentes e a identificação do parasita é mais fácil. Sob o ponto de vista epidemiológico, a resistência dos quistos no meio ambiente e a quantidade de quistos eliminados pelos doentes são dois aspectos muito importantes (Thompson, 2004).

Com um ciclo de vida bastante simples e com uma forma cística resistente ao meio ambiente, este parasita facilmente se transmite seja de forma directa (de um indivíduo infectado para outro) seja de forma indirecta (através da contaminação de alimentos ou do ambiente) (Thompson, 2004). Estudos realizados em voluntários humanos mostram que a forma de resistência deste parasita (quisto) é altamente infectante, pois basta apenas a ingestão de 10 quistos para que ocorra infecção. Tanto a nível de saúde pública como para as empresas de captação e fornecimento de água dos países desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, *Giardia* é um protozoário importante causador de doenças de veiculação hídrica mais frequentemente diagnosticadas (Thurman *et al.*, 1998; Hoque *et al.*, 2002a; Leclerc *et al.*, 2002 apud Thompson, 2004). Além disso, a irrigação de vegetais (que habitualmente são ingeridos crus) com água não tratada também é um factor de risco (Thompson, 2004).

A giardíase é considerada uma zoonose, onde várias espécies animais podem contribuir para a contaminação ambiental. O tratamento adequado da água de beber por filtração ou cloração pode ser uma solução para o controle da giardíase. (Olson *et al.*, 2002). Existem quatro ciclos de transmissão responsáveis pelo desenvolvimento do parasita nos mamíferos hospedeiros: um ciclo tem como hospedeiros principais os cães e gatos, outro os humanos e outro o gado e animais selvagens. Pode ocorrer a transmissão entre hospedeiros do mesmo ciclo ou de ciclos diferentes, directamente ou por via hídrica. Como não se conhecem frequências de transmissão para estes quatro ciclos, seria importante saber como estes ciclos interagem e qual a frequência de transmissão de genótipos zoonóticos. (Thompson, 2004). As experiências realizadas sobre a infecção cruzada tem sido alvo de várias críticas, pois existem dúvidas se os animais estavam realmente isentos de *Giardia* antes da infecção e pela utilização de doses elevadas de quistos que eram aplicadas nos animais, o que provavelmente não representa uma infecção natural.

Existem ainda estudos que demonstram que os animais contaminados podem não libertar uma quantidade de quistos suficiente, nas fezes, para que ocorra detecção por microscopia. Resultados controversos de experiências de transmissão cruzada podem rebater a diversidade genética dos parasitas em estudo, diferenças na viabilidade dos quistos, variação nas condições imunológicas dos hospedeiros ou uso de técnicas pouco sensíveis de detecção (Thompson *et al.*, 1990; Monis & Thompson, 2003). Em Portugal poucos foram os estudos epidemiológicos realizados, variando a frequência da giardíase entre 9% e 28% em crianças e jovens até aos 16 anos.

8. Patofisiologia

Giardia é um parasita não invasivo, com tropismo pelo intestino delgado e cuja patofisiologia da infecção no tracto gastrointestinal não está ainda completamente esclarecida (Ortega & Adam, 1997). Quando o parasita em forma de trofozoíto alcança o intestino, este liberta uma toxina (protease), fixa-se vilosidades, levando à sua atrofia e hiperplasia das criptas. Vai também ocorrer uma diminuição da actividade enzimática nas vilosidades intestinais, levando a uma redução da digestão e diminuição da absorção de vários nutrientes, como vitaminas, proteínas, lípidos e açúcares, conduzindo a uma desidratação, perda de peso e morte. (Barr *et al.*, 1993).

O bloqueio físico pelo grande número de trofozoítos a revestir a mucosa intestinal, o sobrecrecimento bacteriano e fúngico no intestino delgado, a desconjugação dos ácidos biliares, o aumento do *turnover* celular na mucosa das vilosidades e a lesão epitelial são algumas explicações para que ocorra pouca absorção intestinal (Beaumont & James, 1986; Shepherd, 1997). A má absorção dos lípidos, das vitaminas A e B₁₂, dos folatos e de dissacarídeos foi demonstrada, mas não em todos os doentes parasitados e com diarreia (Beaumont & James, 1986; Hill, 1993). A motilidade intestinal alterada e a hipersecreção hídrica, podem ter também um papel patofisiológico, levando à produção e libertação de grandes quantidades de prostaglandinas E₂ pelos macrófagos, activados pelos trofozoítos de *Giardia* (Smith, 1985; Ganguly *et al.*, 1987). Como este parasita tem uma natureza intraluminal e não invasiva, existe uma incapacidade dos hospedeiros formarem uma resposta imunológica forte. Em testes realizados, os níveis de imunoglobulinas que circulam nos animais infectados não diferem dos animais não infectados (Olson *et al.*, 2002).

As imunoglobulinas responsáveis por uma resposta imune protectora são as IgA e IgG. As IgA tem um papel importante pois impedem a adesão dos trofozoítos à mucosa do intestino enquanto que as IgG, a actividade macrofágica e a actividade dos monócitos e neutrófilos são os principais elementos da resposta imune que se encontram envolvidos no combate a *Giardia* (Thompson *et al.*, 1993). A motilidade intestinal e o leite materno podem também contribuir para a protecção em caso de infecção (Nayak *et al.*, 1987; Ortega & Adam, 1997).

As espécies encontradas em mamíferos mostram aspectos morfológicos, propriedades antigenicas, genéticas e bioquímica similares (Leib & Zajac, 1999), mas tem vários graus de patogenicidade, logo a resposta imune tem um papel fundamental sobre a forma clínica ou assintomática da infecção. Os indivíduos jovens imunossuprimidos são os que apresentam estados de infecção mais graves. Apesar da aparente importância dos mecanismos de defesa do hospedeiro a diarreia causada por *Giardia*, pode durar semanas, não sendo clara a razão para os casos crónicos de giardíase o que pode dever-se à variabilidade de antígenos do parasita (Bienz *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 2001), ou o facto dos anticorpos se encontrarem limitados na sua actuação devido aos trofozoítos terem localização intraluminal, isto apesar de se encontrar evidenciada a sua protecção em casos de nova infecção (Ortega & Adam, 1997; Langford *et al.*, 2002).

9. Sintomatologia

A percentagem de adultos infectados, que pode permanecer assintomática, pode atingir os 60% (Backer, 2000), sendo mais comum nas crianças e adultos reincidentes (Moore *et al.*, 1969). A duração média, em surtos epidémicos, é de seis semanas (Rey, 1991). Na giardíase, o período de incubação pode levar uma a duas semanas, mas existem casos que demoraram vários meses. A duração da infecção e o período pré-patente não estão relacionados com a dimensão do inóculo (Jokipii & Jokipii, 1977; Wolf, 1992; Hill, 1993). Em termos de manifestações clínicas em humanos estas podem variar desde perda de peso, má absorção até que ocorra diarreia crónica debilitante. A duração média dos sintomas pode variar entre 3 a 10 semanas (Backer, 2000). O paciente também pode apresentar vómitos, dor abdominal, anorexia, náuseas, presença de muco nas fezes, letargia, flatulência e eructações sulfurosas, mas a manifestação mais frequente é a diarreia. A nível das suas características, estas são as mesmas de uma diarreia por má absorção. Devido a fixação dos trofozoítos na mucosa intestinal as fezes vão ter um aspecto amolecido, esteatorreico e com um forte odor (Zajac, 1992).

Esta diversidade de sintomas vai depender de factores como imunidade e nutrição do hospedeiro bem como a virulência e patogenicidade do parasita (Olson *et al.*, 2002). Os sintomas menos usuais são os broncospasmos, os eritemas multiformes, a urticária e as manifestações alérgicas (DuPont & Capsuto, 1996). Nos casos crónicos, podem surgir associados uma perda acentuada do peso e alterações no crescimento, principalmente em crianças, devido a uma deficiente absorção de açúcares, gorduras e vitaminas lipossolúveis (Hjelt *et al.*, 1992; Hill, 1993; Lengerich *et al.*, 1994).

O facto de se observar uma maior incidência de giardíase em crianças e animais jovens deve-se não só à imaturidade do sistema imunológico bem como à manipulação de todo o tipo de material (terra, objectos diversos) que possam estar contaminados com *Giardia*. Pode também ocorrer uma imunidade adquirida após a primeira infecção, não impedindo a reinfeção. Existem casos nos quais a infecção está presente mas não se consegue detectar a presença do parasita. Nesta situação é necessário analisar amostras do líquido duodenal. No entanto, este método é bastante invasivo e caro (De Carlli, 2001). Em humanos, *Giardia* pode ascender ao ducto biliar e causar problemas hepáticos. A maioria dos estudos sobre giardíase baseia-se em SDS-PAGE para a análise dos padrões de proteínas encontrados em vários tipos de *Giardia*.

O conhecimento desses padrões de proteínas pode ajudar no conhecimento da virulência, antigenicidade, infectividade e resistência às drogas (Guimarães *et al.*, 1999).

10. Diagnóstico Laboratorial

É necessário um correcto diagnóstico, para que se realize uma eficaz prescrição do tratamento de giardíase. O diagnóstico parasitológico da giardíase poderá ser efectuado em fezes diarréicas ou em fezes formadas, sendo que nas formas diarréicas encontram-se mais trofozoítos e assim aconselha-se o exame directo logo após a sua emissão. Nas fezes formadas é usual visualizar grandes concentrações de quistos (Chaia, 1975). Uma metodologia clássica é o exame microbiológico de fezes para a pesquisa de quistos ou trofozoítos, após a aplicação de uma técnica de concentração/enriquecimento (Rey, 1991).

Geralmente, os exames parasitológicos de fezes devem compreender a realização de um exame microscópico, que se destina a detectar e identificar os macroparasitas eliminados. Na ausência de quistos e trofozoítos após a realização de um exame, não se deve descartar o diagnóstico de giardíase, pois podem ocorrer falsos negativos. Devido aos quistos de *Giardia* serem eliminados intermitentemente nas fezes, a análise apenas de uma amostra pode detectar apenas 50 % dos casos positivos (Burke, 1975). Este erro é reduzido aumentando o número de amostras submetidas a análise. Deve-se, então, ter em consideração o período de pré-lactência (1 a 2 semanas), e realizar três exames sequenciais com um intervalo de uma semana cada um para se confirmar um diagnóstico negativo (Zajac, 1992). Muitos antibióticos, antiácidos, laxantes e produtos de contraste radiológico, podem inibir a eliminação de quistos, assim a recolha de fezes deve ser adiada por 5 a 10 dias após este tipo de intervenções (Pickering & EngelKirk, 1988).

Giardia é um organismo muito sensível e tem uma morfologia que facilmente se altera fora do organismo do hospedeiro, por isso se as amostras não puderem ser examinadas imediatamente, devem ser armazenadas em recipientes estéreis e refrigerados. Técnicas invasivas como a cápsula duodenal (Entero-testeTM) para a recolha de muco duodenal, a aspiração e biopsia duodenais, são menos utilizadas mas por vezes necessárias (Rosenthal & Liebman, 1980; De Carli, 1994). A pesquisa no conteúdo duodenal é encarada como uma metodologia complementar ao exame copro-parasitológico tradicional, tendo revelado, através de uma revisão bibliográfica, que a maior ou menor eficácia de ambas é relativa,

variando no caso da análise do conteúdo duodenal entre 25 e 100%, enquanto o exame coproparasitológico oscilava entre 43 e os 100% (Goka *et al.*, 1990). A técnica de sedimentação por formaldeído-éter tem a vantagem de retirar gorduras e fibras presentes nas fezes facilitando o reconhecimento do parasita, porém como não é analisada toda a amostra, devido a ser retirada apenas uma parte do sedimento para visualização por microscopia óptica, ocorre uma diminuição na possibilidade de encontrar os quistos (Huber *et al.*, 2003).

Um dos exames mais utilizados para o diagnóstico de *Giardia* é a flutuação fecal. Consiste na utilização de soluções saturadas de sulfato de zinco ou de açúcar, que não causam distorção nos quistos de *Giardia* em relação às soluções saturadas de sal, permitindo o diagnóstico na maior parte dos casos (Conboy, 1996). Um teste alternativo é o imunoenensaio enzimático (ELISA), este apresenta uma maior sensibilidade em relação à microscopia, segundo Mota *et al.* (2004). Vidal & Catapani (2005) realizaram um estudo relacionando as vantagens e desvantagens do método de ELISA quando comparado a microscopia óptica e concluiu que o teste de ELISA está indicado quando se quer alta sensibilidade, pois foram encontrados resultados positivos mesmo em amostras negativas na microscopia. O método imunoenzimático qualitativo (Microplaca Alexon ProSect *Giardia*) para a detecção do coproantígeno específico para *Giardia* (GSA65) foi recentemente avaliado, mostrando-se sensível. A giardíase pode ser diagnosticada através da técnica de Imunoseparação Magnética, acoplada à Imunofluorescência (IMS-IFA) que é uma técnica que utiliza corpos magnéticos conjugados para anticorpos monoclonais específicos contra marcadores de superfície do protozoário em questão. Esta técnica permite a realização de várias amostras em simultâneo (Souza *et al.*, 2003). Segundo Guy *et al.*, (2004), os métodos de diagnósticos microscópicos, ELISA e técnicas de imunofluorescência, são testes qualitativos e não distinguem os diferentes genótipos.

Alguns testes rápidos de diagnóstico podem ser encontrados no mercado e ficam prontos em até 10 minutos, porém muitos falsos negativos podem ocorrer quando a amostra apresenta uma quantidade de parasitas muito baixa. Técnicas moleculares, como o PCR, são uma alternativa para este problema. A partir do uso e da combinação das técnicas de PCR podemos detectar e descobrir os variados genótipos desse parasita, usando combinações de RFLP (restriction fragment length polymorphism). A mais recente técnica utilizada é a PCR em tempo real que é uma técnica de alta sensibilidade e especificidade (Guy *et al.*, 2004; Mundim *et al.*, 2003).

11. Tratamento

Existem muitas drogas usadas no tratamento da giardíase que apresentam bons resultados. No entanto, muitas delas tem efeitos secundários. Já existem algumas alternativas para tratar os portadores sintomáticos não só para aliviar os sintomas ou impedir o desenvolvimento de uma doença crônica, mas também para eliminar a parasitose. Os doentes assintomáticos devem ser também tratados, sempre que identificados, uma vez que podem transmitir a infecção ou desenvolver doença sintomática (Davidson, 1984; Gardner & Hill, 2001; Nash *et al.*, 2001). São utilizados três grupos de fármacos na terapêutica farmacológica: os nitroimidazóis metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol, o derivado nitrofurano furazolidona e o composto acridínico quinacrina (Hill, 1993; Farthing, 1996). O mais utilizado tem sido o metronidazol, apesar dos efeitos secundários que lhe estão associados e das resistências que começam a ser conhecidas (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001).

Spelmann (1985) realizou um estudo para analisar a eficácia do uso de tinidazol e metronidazol no tratamento de giardíase em humanos. A dose de tinidazol usada foi de 50 mg/kg chegando ao máximo de 2 g por paciente tratado. A dose de metronidazol utilizada foi de 60 mg/kg chegando ao máximo de 2,4 g por paciente. Os pacientes tratados com tinidazol tiveram uma eficácia de 94 % e com metronidazol de 56 %. Segundo Gardner & Hill (2001), secnidazol pode ser usado no tratamento para giardíase, podendo ser usado da mesma forma que o tinidazol, em dose única. A dose utilizada em humanos é de 2 g por paciente ou 30 mg/kg em crianças, sendo comprovado uma eficácia de 85% quando utilizado dessa forma em adultos e em crianças apresenta o mesmo efeito do uso de 7 a 10 dias de metronidazol. O uso de secnidazol pode levar ao aparecimento de distúrbios gastrointestinais, porém desaparecem quando suspenso o tratamento. Em caso de gravidez é utilizado o aminoglicosídeo paromomicina, pois possui baixa toxicidade (Kreutner *et al.*, 1981). Os fármacos utilizados como anti-helmínticos de largo espectro, como os derivados de benzoimidazólicos, albendazol, mebendazol, têm sido investigados para a utilização no tratamento de giardíase, tendo bons resultados (Edlind *et al.*, 1990; Lemée *et al.*, 2000).

Devido ao uso popular de plantas no tratamento das parasitoses intestinais, especialmente a giardíase, efeitos colaterais de drogas e ao aumento da resistência dos parasitos aos fármacos geralmente utilizados, foi realizada uma investigação de produtos naturais que tivessem

propriedade giardicida e quais as possibilidades de terapias. Foi constatado nesse estudo que as espécies de derivam das famílias Asteraceae, Fabaceae, Rutaceae e Verbenaceae possuem actividade giardicida (Amaral, *et al.*, 2006).

Em Portugal, é comercializado o metronidazol, o scnidazol, o tinidazol e o albendazol, todos sob a forma de comprimidos, o que torna mais difícil a administração em crianças (Tupam, 2002). Como alternativa, os comprimidos podem ser triturados e ingeridos, mas o sabor desagradável não torna este método muito viável. A comercialização de albendazol, em suspensão oral, permitiu uma melhor adesão por parte das crianças. A inexistência de protocolos clinicamente estabelecidos e publicados para o tratamento desta doença, levou Garner & Hill (2001) a agruparem toda a informação importante sobre este tema, pois começa a ser preocupante a necessidade de se encontrarem alternativas à terapêutica habitual, devido aos casos de resistência e as poucas alternativas terapêuticas de dispomos. (Meloni *et al.*, 1990; Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001).

12. Profilaxia

Para que ocorra um controle da giardiase é necessário tomar algumas medidas, como tratar de pessoas e animais infectados, sintomáticos ou não, tratamento de esgotos, descontaminação do ambiente com a utilização de desinfectantes (amónia quaternária), destruir e remover os quistos infectantes da água e dos alimentos, e educação sanitária da população. De uma maneira geral, a prevenção da *Giardia* inclui medidas sanitárias, educativas e de controle da infecção em animais domésticos (Olson *et al.*, 2002).

A vacinação dos cães também é um factor a se considerar para diminuir o grau de infecção em animais e há a necessidade de estudos para avaliar o seu potencial em outras espécies animais. O uso de vacina para *Giardia* spp. induz uma resposta imune específica nas crias com uma rápida eliminação dos trofozoítos, mesmo que esteja com um alto grau de contaminação, passando a ser uma forma de controlar os animais doentes e impedir a contaminação de animais sadios (Olson *et al.*, 1996). A vacina reduz o número quistos e previne os sinais clínicos de giardiase em cães, foi licenciada no Canadá e consiste de trofozoítos inactivados quimicamente. Essa vacina só deveria ser usada em casos de giardiase crónica em cães, ou quando o tratamento realizado não obtém sucesso (Anderson *et al.*, 2004). O efeito da

vacinação em felinos é desconhecido e não se sabe ainda se ela protege efectivamente os felinos de *Giardia sp.*

13. Objectivos do estudo

Sendo uma doença com enorme distribuição geográfica, capaz de afectar, anualmente, milhões de pessoas, torna-se necessário compreender, em detalhe, todo o ciclo de vida do parasita, nomeadamente a relação entre reservatórios e a população humana. Este trabalho teve, como primeiro objectivo, compilar a informação existente sobre *Giardia*, através de uma revisão bibliográfica onde se apresenta o estado da arte. Seguidamente, propõe-se utilização de técnicas simples que potenciam a capacidade de extracção de informação molecular de amostras contaminadas com quistos de *Giardia*. Por fim, com base nos resultados experimentais, discute-se, de forma sintética, uma potencial aplicação de uma aproximação experimental análoga em estudos de cariz epidemiológico.

II-MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostra

Os quistos foram obtidos a partir de fezes de crianças contaminadas com *Giardia*.

2. Purificação de quistos de *Giardia* por gradiente de sacarose

As fezes foram submetidas ao método de Lutz. O sedimento é transferido para um tubo de Falcon de 15 ml, lavado com água ultra pura e centrifugado a 600xg durante 5 minutos. Repete-se este procedimento quatro vezes. Depois de realizar a última lavagem, o sedimento fecal é submetido à técnica do gradiente de sacarose para que ocorra o isolamento dos quistos de *Giardia* (Rocha, 2003). Para que isso ocorra, o sedimento fecal foi suspenso em água ultra pura (13ml), por meio de agitação mecânica, e depositado muito lentamente, com ajuda de uma pipeta de Pasteur, sobre uma solução de sacarose (12,5ml) com uma concentração de 1M contida num tubo de Falcon de 50ml e centrifugado a 400xg durante 15 minutos. Em seguida, com ajuda de uma pipeta Pasteur, recolhe-se o líquido da camada intermédia (onde se encontram os quistos), entre a água e a sacarose, e transfere-se para um tubo de Falcon de 15 ml. Acrescenta-se água ultra pura realiza-se a lavagem dos quistos com ajuda de uma centrifugação a 600xg durante 10 minutos. Rejeita-se o sobrenadante e o sedimento vai ser suspenso, com ajuda de agitação mecânica, em 3 ml de água destilada estrelizada. Repete-se esta técnica usando agora uma concentração de 0,75M de uma solução de sacarose (2,5ml). Os quistos foram congelados para posterior extração do DNA.

3. Extração e purificação do DNA

Retirou-se 200µl de cada amostra e realizou-se a técnica de extração de DNA (congelamento e descongelamento). Suspende-se o sedimento com ajuda de um agitador mecânico de baixa velocidade. Congela-se a suspensão obtida com azoto líquido (-196°C) durante 1 minuto e seguidamente coloca-se em banho Maria a 95°C durante 2 minutos. Este passo é repetido cinco vezes. É necessário utilizar uma técnica bastante agressiva para conseguir destruir a parede do quisto. Centrifuga-se novamente durante cinco minutos com uma velocidade de 600xg e retira-se o sobrenadante para utilizar numa técnica de extração de DNA.

Realizou-se uma técnica para extrair DNA e isola-lo em tecidos (Change Switch gDNA Micro TissueKit). Antes de iniciar a técnica liga-se o banho-maria até à temperatura de 55°C e prepara-se a solução de lise (mix com 1ml de solução de lise mais 10µl de preoteínase K).

3.1. Extração do DNA

Coloca-se a amostra (40µl) num eppendorf estéril e em seguida adiciona-se 1ml da solução *mix* agitando cuidadosamente para ter a certeza que toda a solução de lise está bem distribuída pela nossa amostra. Incuba-se durante uma hora no banho (55°C) e de 15 em 15 minutos retira-se para agitar no vortex. Adiciona-se 5µl de RNase e mistura-se cuidadosamente com ajuda da pipeta. Incuba-se novamente durante 5 minutos à temperatura ambiente.

3.2. Separação do DNA

Coloca-se a solução que contem as beads (esferas magnéticas) no vortex para as suspender. Adiciona-se 200µl de uma solução de purificação e mistura-se cuidadosamente com uma pipeta. Retira-se 40µl da solução de esferas magnéticas e mistura-se na nossa amostra. Incuba-se durante 1 minuto à temperatura ambiente. Coloca-se a amostra no Magma Rack durante 1 minuto e com uma pipeta remove-se o sobrenadante e descarta-se.

3.3. Lavagem do DNA

Remove-se o tubo do suporte Magma Rack e adiciona-se 1ml da solução de lavagem à nossa amostra e mistura-se cuidadosamente. Coloca-se novamente o tubo no Magma Rock durante 1 minuto e remove-se o sobrenadante. Repete-se este passo de lavagem mais umas quatro vezes.

3.4. Separação final do DNA

Remover o tubo do Magma Rock e adicionar 150µl de uma solução (Charge Switch Buffer) com um pH de 8,5 e mistura-se cuidadosamente com a nossa amostra. Incuba-se à temperatura ambiente durante 5 minutos e volta-se a colocar o tubo no suporte Magma Rock durante 1 minuto. Retira-se o sobrenadante que contém DNA para um tubo estéril.

4. Reacção em cadeia da polimerase

Neste trabalho foi utilizado um conjunto de primers que foram sintetizados pela Metabion® International AG. Utilizou-se 6µl de cada amostra de DNA para um volume de reacção de 60µl. O primer utilizado é denominado GGL405-433: anterior 5'- CAT AAC GAC GCC ATC GCG GCT CTC AGG AA -3' e GGR 592-622: posterior 5'- TTT GTG AGC GCT TCT GTC GTC GCA GCG CTA A -3'. Este conjunto de primers vai permitir a amplificação de uma região de 218 pares de bases do gene responsável pela produção da proteína giardina (Mahbubani *et al.*, 1992). As condições do PCR foram as seguintes: um passo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, *annealing* a 64°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos finalizando com uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela I – Protocolo dos reagentes utilizados no PCR para a identificação de *Giardia*

Reagentes	Concentração Inicial	Volume de uma reacção	Concentração Final
Buffer	10x	6µl	1x
MgCl ₂	25mM	6µl	2.5mM
Primer 1	10µl	1.20µl	12.0 pmol
Primer 2	10µl	1.20µl	12.0 pmol
dNTPs	2µl	6µl	0.2mM
Taq	2.5U/µl	0.125µl	1.25U
Volume total da Reacção		60µl	

De seguida realizou-se o Master mix de acordo com a seguinte tabela:

Tabela II - Constituintes do Master mix

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Branco	Acréscimo	Total
Primer 1	1.2µl	1.2µl	1.2µl	1.2µl	1.2µl	1.2µl	7.2µl
Primer 2	1.2µl	1.2µl	1.2µl	1.2µl	1.2µl	1.2µl	7.2µl
dNTPs	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	36µl
Taq	0.125µl	0.125µl	0.125µl	0.125µl	0.125µl	0.125µl	0.75µl
MgCl ₂	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	36µl
Buffer	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	36µl
H ₂ O	33.475µl	33.475µl	33.475µl	33.475µl	33.475µl	33.475µl	200.85µl
DNA	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	36µl
Total	60µl	60µl	60µl	60µl	60µl	60µl	360µl

5. Electroforese

Os produtos obtidos no PCR foram analisados, por electroforese, num gel de agarose a 2% em tampão TAE 1x concentrado e corado com brometo de etídio. A visualização dos fragmentos foi realizada com auxílio de iluminação ultravioleta e o gel foi fotografado para documentação.

6. Purificação e sequenciação

Após a reacção de PCR e observação das bandas de DNA no gel de agarose, as amostras finais foram enviadas para um laboratório (STAB VIDA), para posterior purificação e sequenciação.

7. Ajustamento das sequências de DNA

As sequências forward e reverse, de cada amostra, foram posteriormente analisadas num programa informático (Finch Tv). A sequência forward foi convertida e alterada para a sequência complementar (reverse) para comparação com a sequência reverse da mesma amostra. O cromatograma permite verificar a qualidade de identificação de cada par de base permitindo rectificar a sequência, caso seja necessário.

III-RESULTADOS

Um dos primeiros passos neste trabalho experimental, foi a tentativa de extracção do DNA de quistos de *Giardia*, utilizando um kit comercial (Change Switch gDNA Micro TissueKit) juntamente com uma técnica de choques térmicos (Yong *et al.*, 2000). O resultado obtido foi positivo (Figura 4) pois foi possível a visualização de bandas de DNA bem definidas em todas as amostras. A amostra 1 consiste numa espécie referência (ATCC30957). As restantes amostras foram recolhidas em três crianças contaminadas que provinham de um estabelecimento de ensino na cidade do Porto. As amostras foram identificadas como amostra 2, amostra3 e amostra4.

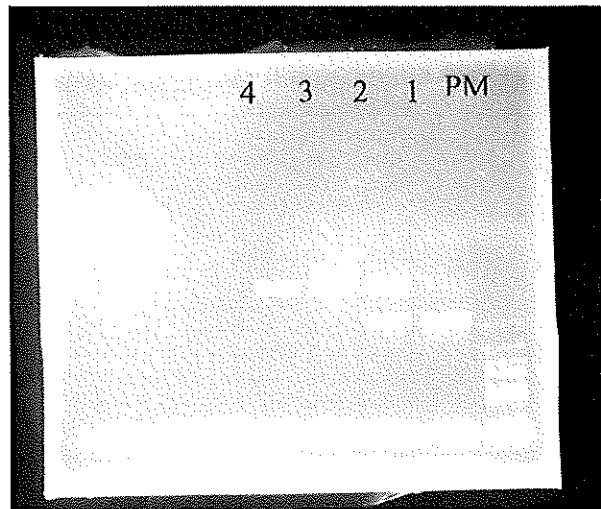


Figura 4 – DNA de *Giardia* em electroforese em gel de agarose a 1%

Na técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), foram utilizados os primers GGL405-433: anterior 5'- CAT AAC GAC GCC ATC GCG GCT CTC AGG AA -3'e GGR 592-622: posterior 5'- TTT GTG AGC GCT TCT GTC GTC GCA GCG CTA A – 3'. Este conjunto de primers permitiu a amplificação de uma região de 218 pares de bases do gene responsável pela produção da proteína giardina de *Giardia duodenalis* (Mahbubani *et al.*, 1992). Depois da técnica de PCR realizou-se uma electroforese com um gel de agoarose a 2% obtendo um resultado positivo (Figura 5) com bandas bem defenidas em cada amostra.

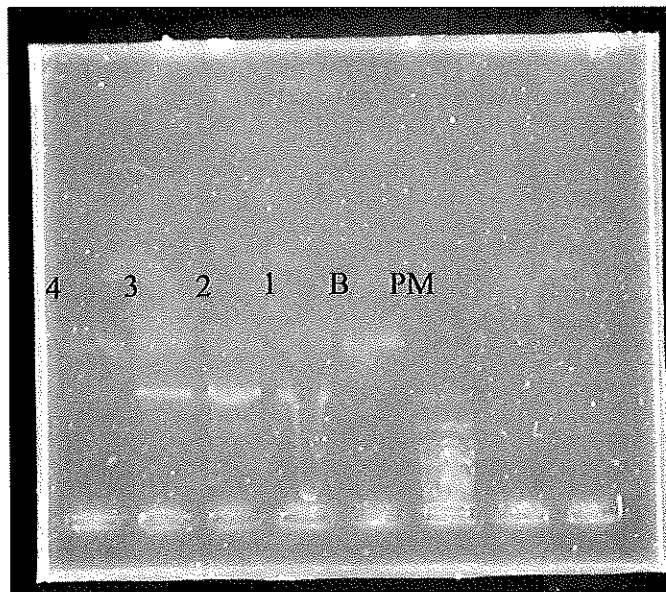


Figura 5 – DNA de *Giardia* em electroforese em gel de agarose a 2%

Após o envio das sequências purificadas e sequenciadas por parte do laboratório, estas foram analisadas, comparando a sequência forward com a reverse de cada amostra. Obteve-se assim sequências finais de 81 pares de base que foram alinhadas num programa informático (ClustalX).

Tabela III - Sequências finais de cada amostra

Amostras	Sequências
Amostra 1 (ATCC30957)	GGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCAGCTCAA CGAGAAGGTCGCAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCG AT
Amostra 2 (37094)	GGAGAACGCCGAGAGGAAGAAGATGTATGACCAGCTCAA CGAGAAAGTCGCAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCC AT
Amostra 3 (43056)	GGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCAGCTCAA CGAGAAGGTCGCAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCG AT
Amostra 4 (4775)	GGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCAGCTCAA CGAGAAGGTCGCAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCG AT

Depois de alinhadas verifica-se que as sequências ATCC, amostra 3 e amostra 4 são idênticas. Na amostra 2 surgiram cinco substituições nos pares de base, como podemos verificar pela análise da Tabela.

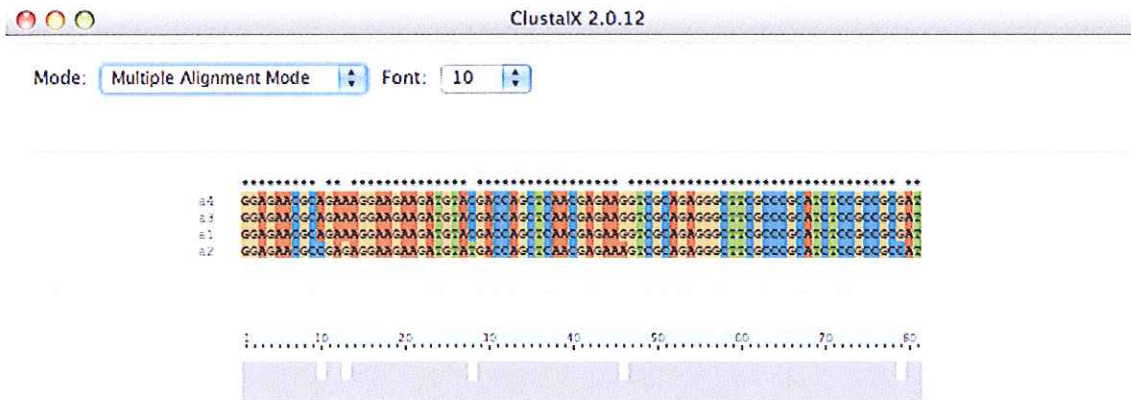


Figura 6 – Visualização das cinco substituições na amostra 2

IV-DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O diagnóstico de *Giardia* com uso de métodos tradicionais de microscopia, após aplicação de métodos de concentração, continua a ser um indicador fiável de infecção em humanos (Thompson 2004), por isso utilizamos o método de Lutz para purificação e concentração dos quistos como primeira etapa neste trabalho experimental.

Sendo o quisto uma forma passível de transmissão pela água ou/e pelos alimentos crus, é também a forma que resiste facilmente às adversidades ambientais. Neste ponto de vista, tem mais interesse em saúde pública e epidemiologia utilizar o quisto e não o trofozoíto de *Giardia* em estudos moleculares deste parasita.

Para que o estudo fosse possível, foi necessário eleger um protocolo experimental para obter o DNA genômico do quisto do parasita. Assim, foi necessário uma pesquisa bibliográfica de artigos que mencionavam vários métodos de extracção de DNA de quistos e elaboramos, com adaptações, dois protocolos que são usados em biologia molecular. Um método consistia na utilização de uma teste comercial não destinado para extracção de DNA em quistos de *Giardia* mas sim dirigido à extracção de DNA em tecidos (Change Switch gDNA Micro TissueKit). O segundo método baseava-se em processos físicos, de choques térmicos por congelamento seguido de descongelamento (Yong *et al.*, 2000).

Iniciamos o estudo com um ciclo de congelamento a -196°C (azoto líquido) e descongelamento a 95°C (Yong *et al.*, 2000) e em seguida os quistos foram observados em microscópio electrónico para a visualização de quistos destruídos, mas os resultados não foram satisfatórios. Resolvemos então aumentar o número de ciclos, reduzindo o tempo de espera em cada etapa e os resultados continuavam a não ser satisfatórios, pois a totalidade dos quistos não era destruída. Há que ter em conta que no quisto, o DNA genômico encontra-se

bem protegido pela membrana nuclear, pela membrana do trofozoíto contido no quisto e ainda pela membrana cística. Conclui-se então que este processo não funcionou inteiramente.

Com o intuito de resolver o problema tentou-se realizar cinco ciclos de congelamento/descongelamento acompanhado, com a utilização de um teste comercial não específico para *Giardia* mas sim para tecidos (Change Switch gDNA Micro TissueKit), que se baseia no uso de enzima proteinase K, RNase e extração com carga magnética. De seguida visualizou-se a amostra testada em microscopia óptica e verificamos a presença significativa de quistos destruídos. Erlandsen *et al.* (1990) testaram o efeito de 1 a 3 ciclos de congelamento (-16°C) e descongelamento (20 °C) em quistos de *Giardia muris* e *Giardia duodenalis* e observaram os resultados com utilização de imunofluorescência, microscopia de campo brilhante e microscopia electrónica de varrimento. Os autores verificaram que a imunofluorescência permitia a detecção de quistos congelados, contudo a coloração era menos intensa do que nos quistos não congelados. Além disto, a técnica foi eficiente até mesmo na detecção dos que apresentavam sinal de deformação ou rompimento da parede. É relevante que usou-se temperaturas bem mais altas que as usadas pelos autores acima referidos, e mesmo assim, não se verificou o rompimento dos quistos.

Quanto à padronização do PCR, convém salientar que na literatura de biologia molecular de *Giardia* e de outros microrganismos, a concentração de cloreto de magnésio normalmente aplicada é de 2,5mM e de 3,0mM. Segundo Rochelle *et al.*, (1997), a concentração elevada de cloreto de magnésio pode levar ao aparecimento de produtos inespecíficos no PCR. Assim preferiu-se a utilização da concentração mais baixa.

Na escolha dos primers optou-se por uns que tivessem uma boa sensibilidade e especificidade como os descritos por Mahbubani *et al.*, (1992): GGL405-433 e GGR592-622 que amplificam uma região de 218 pares da bases do gene que codifica a proteína giardina de *Giardia duodenalis*. Segundo Mahbubani *et al.*, (1992) e Rochelle *et al.*, (1997) o par de iniciadores GGL405-433/GGR592-622 é específico para *Giardia duodenalis* parasita do homem e de outros mamíferos não roedores.

A microscopia não possibilita a distinção genotípica e em qualquer investigação epidemiológica é indispensável o uso de uma técnica de diagnóstico sensível e específica para a determinação do agente etiológico causador da infecção (Thompson, 2004). O uso da

imunofluorescência direta melhorou a detecção e a quantificação de quistos eliminados, e possibilitou uma determinação mais precisa das taxas de prevalência do parasito bem como da de excreção de quistos nas fezes quando comparada com a microscopia convencional (Thompson, 2004). Contudo, a imunofluorescência não permite a distinção entre parasitas idênticos na morfologia e divergentes na genética (genótipos). Em particular em *Giardia*, as técnicas moleculares tem contribuído bastante para melhorar o diagnóstico. Principalmente técnicas que tem como base a reacção em cadeia da polimerase (PCR), têm mais sensibilidade e especificidade do que as técnicas tradicionais (Mcglade et al., 2003a; Thompson 2004).

Como vemos, existem já vários métodos de detecção de *Giardia* descritos por vários autores, que são relativamente rápidos, eficazes e económicos, mas nenhum deles nos indicam de onde provém esses parasitas (reservatórios). Será que estripes diferentes de *Giardia* tem reservatórios diferentes e diferentes alvos? Com os métodos disponíveis, não podemos obter uma resposta a esta pergunta. Foi neste âmbito que se realizou este trabalho experimental, desenvolvendo um método simples, relativamente económico, capaz de nos indicar, através da informação genética de cada parasita, de onde provém cada uma das estripes e quais os seus possíveis alvos e assim, melhor compreender a epidemiologia da doença.

Para além de saber se os indivíduos estão contaminados ou não, sob o ponto de vista de saúde publica e epidemiologia é igualmente relevante compreender qual a fonte de contaminação, ou seja os principais reservatórios que potenciam a disseminação de *Giardia*. Conhecidos esses reservatórios torna-se mais fácil eliminar este parasita. Existem inúmeros reservatórios para este parasita. Como reservatórios temos os próprios humanos que podem-se contaminar directa ou indirectamente, e podem ser sintomáticos ou assintomáticos, como já foi mencionado neste trabalho. Os bovinos também são possíveis reservatórios que apresentam altas taxas de infecção, principalmente os animais jovens. O parasita é frequente em todo o tipo de gado incluindo o gado leiteiro e há relatos de taxas de prevalência de 100% (Thompson, 2004). Os animais domésticos são outros possíveis reservatórios. Em alguns países há relato de uma alta prevalência de *Giardia* em cães e gatos, como na Austrália e EUA (Bugg *et al.*, 1999; Mcglade *et al.*, 2003a; Thompson & Robertson, 2003 citados por Thompson, 2004). Outras fontes de contaminação são os mamíferos selvagens terrestres. A maioria dos dados adquiridos sobre *Giardia*, em mamíferos selvagens, advém de estudos feitos para avaliar o potencial destes animais como reservatórios de doença para humanos e para o gado. Os primeiros animais a serem estudados foram os que se estabeleciam dentro dos

reservatórios de água, como o castor. A presença de quistos do parasita nas fezes ou intestino de animais encontrados dentro dos limites de um curso de água usado para consumo pelos humanos era suficiente para implicar estes animais como fonte de contaminação (Appelbee *et al.*, 2005). Por fim, outro reservatório importante de salientar neste trabalho são os moluscos marinhos, que para além de serem um importante indicador de contaminação ambiental, pois estão constantemente a filtrar água, são um dos principais disseminadores de quistos de *Giardia* (Fayer *et al.*, 2004; Graczyk & Schwab, 2000 citados por Appelbee *et al.*, 2005). Mas para que ocorra a contaminação dos moluscos é necessário falarmos de um dos principais veículos de transmissão deste parasita, a água. Tanto a água doce como a salgada estão continuamente a ser contaminadas por vários motivos, desde a não eficácia das estações de tratamento de águas ou pela contaminação de lençóis freáticos. Experiências em laboratório indicam que quistos de *Giardia* podem permanecer infectantes em água do mar por várias semanas podendo assim ser considerados uma fonte de infecção (Naik *et al.*, 1982).

Tendo em conta os resultados que obtivemos, a amostra 2 é diferente das restantes, pudemos verificar, ainda que com uma amostragem reduzida, que existem estirpes diferentes em circulação. Ainda que as cinco substituições observadas, na sequência analisada, possam resultar de mutações pontuais, é provável que existam várias estirpes distintas de *Giardia* capazes de infectar o homem. Utilizando uma metodologia similar à usada neste trabalho, onde se procedesse à análise quer de humanos infectados, quer de quistos recolhidos em vários reservatórios distintos, poder-se-ia delimitar, com grande precisão, quais as principais fontes de contaminação. O uso desta metodologia poderia potenciar a descoberta de uma maior frequência de determinados haplótipos associados a alguns reservatórios. Consequentemente, seria possível estabelecer medidas de minimização de contágio.

É importante referir que, contrariamente ao método utilizado neste trabalho, a análise molecular deverá incluir preferencialmente mais do que um gene (ou zona não codificante, pela maior capacidade de acúmulo de mutações), bem como fragmentos de maiores dimensões, maximizando a capacidade de detecção de diferenças e aumentando a robustez dos resultados.

VI-BIBLIOGRAFIA

- Adam, R. D., 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* **55**:706-732.
- Adam, R. D., 2001 Biology of *giardia lamblia*. *Clinical microbiol. Reviews* **14**:447-475.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O., R, Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., mozley-standridge, S. E., Nerad, T. A., SHearer, C. A., Smirnov, A.V., Spiegel, F. W., taylor, M. F. J. R. , 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**(5):399-459.
- Amaral, Flávia M. M., 2006. Planta e constituintes químicos com actividade giardicida. *Ver. Brás. Farmacogn.* V. **16**(0).
- Anderson, Kirten A., Kim T.V., 2004. Impact of *Giardia* vaccination on asymptomatic *Giardia* infections in dogs at a research facility. *Canadian Veterinary Journal.* **45**(11), p.924-930.
- Andrews, R. H., Adams, M., Boreham, P. F., Mayrhofer, G., Meloni, B. P., 1989. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int. J. Parasitol.* **19**:183-190.
- Anjos, Karla G. S., 2005. Stress oxidativo como ferramenta na terapia contra a giardiase. *Ufba Jornal* **5**(3):324-472
- Appelbee, A. J., Thompson, R. C. A., Olson, M. E., 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - current status and future needs. *Trends in Parasitol.* **21**: 370-376.

Arashima, Y., Kumasaka, K., Kawano, K., Asano, R., Hokari, S., Murasugi, E., Iwashita, E., Nishikawa, S., Matsuo, K. Studies on the giardiasis as the zoonosis. III., 1992. Prevalence of *Giardia* among the dogs and the owners in Japan *Kansenshogaku Zasshi*. **66**:1062-1066.

Backer, H. D., 2000. Giardiasis. An elusive cause of gastrointestinal distress. *Phys. Sportsmed.* **28**.

Barr, S.C, Bowman, D.D., Heller, R.L., Erb, H.N., 1993. Efficacy of albendazole against giardiasis in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **54**(6): 926-928.

Beaumont, D. M. & O. F. James., 1986. Unsuspected giardiasis as a cause of malnutrition and diarrhoea in the elderly. *Br. Med. J.* **30**,293:554-555.

Bienz, M., P. Wittwer, V. Zimmermann & N. Muller., 2001. Molecular characterisation of a predominant antigenic region of *Giardia lamblia* variant surface protein H7. *Int. J. Parasitol.* **31**:827-332.

Bingham, A. K., E. L. Jarroll, E. A. Meyer, and S. Radulescu., 1979. *Giardia* sp.: physical factors of excystation in vitro and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* **47**:284-291.

Boucher, S. & F. Gillin., 1990. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect. Immun.* **58**:3516-3522.

Bugg, R. J., Robertson, I. D., Elliot, A. D., Thompson, R. C. A., 1999. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth. *Western Australia. Vet. J.* **157**: 295-301.

Buret, A. G., Scott, K. G. E., Chin, A. C. Giardiasis: pathophysiology and pathogenesis. In: Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M. (Eds.), 2002. *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. Wallingford UK, CAB International, p. 109–125.

Burke, J. A., 1975. Giardiasis in childhood. *Am. J. Dis. Childhood* **129**:1304-1310.

- Campbell, J. D. & G. M. Faubert., 1994. Comparative studies of *Giardia lamblia* encystation *in vitro* and *in vivo*. *J. Parasitol.* **80**:36-44.
- Cedillo-Rivera, R., J. Enciso-Moreno, A. Martinez-Palomo, & G. Pierres., 1991. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch. Invest. Méd.* **22**:79-85.
- Chaia, G, 1975. *Atlas de Parasitologia*. São Paulo. Ed Johnson & Johnson 93pp
- Collyer, R., Lim, K. H., Tang, R., Prociv, P., 1992. Suburban dogs - a reservoir of human giardiasis? *Med. J. Aust.* **156**:814-815.
- Conboy, G., 1996. Diagnostic parasitology. *Canadian Veterinary Journal*, v.37, n.3, p.181 – 182.
- Davidson, R. A., 1984. Issues in clinical parasitology: the treatment of giardiasis. *Am. J. Gastroenterol.* **79**:256-261.
- De Carli, G., 1994. *Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas, métodos e técnicas*. Rio de Janeiro: Medsi.
- De Carli, G.A., 2001. *Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas*. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, p.810.
- DuPont, H. L. & E. G. Capsuto., 1996. Persistent diarrhea in travelers. *Clin. Infect. Dis.* **22**:124-128.
- Edlind, T. D., T. Hang & P. Chakraborty., 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J. Infect. Dis.* **162**:1408-1411.
- Erlandsen, S. L., W. J. Bemrick & J. Pawley., 1989. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.* **75**: 787-797.

Erlandsen, S. L., Sherlock, L. A., Bemrick, W. J., Ghobrial, H., Jakubowski, W., 1990. 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.* **56** (1): 31 – 36.

Farthing M., 1996. Giardiasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **25**:493-515.

Fayer, R., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., 2004. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol.* **20**:531-536.

Flanagan, P. A., 1992. *Giardia* - diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.* **109**:1-22.

Ganguly, N. K., U. C. Garg, R. C. Mahajan, S. S. Kanawar, N. Rai & B. N. S. Walia, 1987. Intestinal brush border calmodulin: key a role in the regulation of NaCl transport in *Giardia lamblia* infect mice. *Biochem. Internat.* **14**:249-256.

Gardner, T. B. & D. R. Hill., 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.

Gillin, F. D., D. S. Reiner & J. McCaffery., 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50** :679-705.

Gillin, F. D., D. S. Reiner, M. J. Gault, H. Douglas, S. Das, A. Wunderlich & J. Sauch., 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia in vitro*. *Science* **235**:1040-1043.

Goka, A. K., D. D. Rolston, S. I. Mathan & M. J. Farthing., 1990. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:66-67.

Goldstein, J. L. & M. S. Brown., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425-430.

Graczyk, T. K., Schwab, K. J., 2000. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2**: 305-309.

Guimarães, S., Sogayar, M. I. L., Franco, Marcello F., 1999. *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. *Rev. Inst. Med. S. Paulo.* **41**(1).

Guy, Rebecca A., Xiao, Chongxie, Horgen, Paul A., 2004. Real-time PCR assay for Detection and Genotype differentiation of *Giardia lamblia* in Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **42** (7): 3317-3320.

Guyton, A. C. & J. E. Hall., 1997. *Tratado de fisiologia médica*. 9^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Hill, D. R., 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **7**:503-525.

Hjelt, K., A. Paerregaard & P. A. Krasilnikoff., 1992. Giardiasis causing chronic diarrhoea in suburban Copenhagen: incidence, physical growth, clinical symptoms and small intestinal abnormality. *Acta Paediatr.* **81**:881-886.

Holberton, D. V., 1973. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J. Cell Sci.* **13**:11- 41.

Honiberg, B. M., Balamuth, W., Bovee, E. C., Corliss, J. O., Gojdics, M. Hall, R. P., Kudoudo, R. R., Levine, N. D., Loeblich, A. R., Weiser, J., 1964. Enrich, D. H. A revised classification of the Phylum Protozoa. *J. Protozool.* **11**:7-20.

Hoque, M. E., Hope, V. T., Kjellstrom, T., Scragg, R., Lay-ye, R., 2002a. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case-control study. *Int. J. Infect. Dis.* **6**:191- 197.

Huber, Francisca, Bonfim, Teresa C., Gomes, Raquel S., 2003. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo- flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. Em amostras fecais de bezerros. *Revista Brasileira de Parasitologia*. v.12, n.2, p 135-137.

Isaac-Renton, J., 1991a. Laboratory diagnosis of giardiasis. *Clin. Lab. Med.* **11**:811-827.

Isaac-Renton, J., H. Shahriari & W. Bowie., 1992. Comparison of an in vitro and an in vivo method of *Giardia* excystation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1530-1533.

Jarrol, E. L., P. J. Muller, E. A. Meyer & S. A. Morse., 1981. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2**:187-196.

Jarrol, E. L., P. Manning, A. Berrada, D. Hare & D. G. Lindmark., 1989. Biochemistry and metabolism of *Giardia*. *J. Protozool.* **36**:190-197.

Jokipii, A. & L. Jokipii., 1977. Prepatency of giardiasis. *Lancet* **1**:1095-1097.

Jones, J. E., 1991. Giardiasis. *Primary Care* **18**:43-52.

Kabnick, K. S. & D. A. Peattie., 1990. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J. Cell Sci.* **95**:353-360.

Kane, A. V., H. D. Ward, G. T. Keusch & M. E. A. Pereira., 1991. *In vitro* encystation of *Giardia lamblia*: large-scale production of *in vitro* cysts and strain and clone differences in encystation efficiency. *J. Parasitol.* **77**:974-981.

Kreutner, K., V. Del Bene & M. S. Amstey., 1981. Giardiasis in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **140**:895-901.

Kulda, J., Nohynkova, E., 1978. *Flagellates of the human intestine and of intestine of other species*. In: j. P. Kreier (ed), *Parasitic protozoa*. New york, Academic press. **2**: 2-139.

- Lane, S., Lloyd, D., 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**: 123-147,
- Langford, T. D., M. P. Housley, M. Boes, J. Chen, M. F. Kagnoff, F. D. Gillin & L. Eckmann., 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect. Immun.* **70**:11-18.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., Dei-cas, E., 2002. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**: 371–409.
- Leib, M.S., Zajac, A.M., 1999. Giardiasis:infection in dogs and cats. *Vet. Med.*, **94**: 793 – 802.
- Lemée, V., I. Zaharia, G. Nevez, M. Rabodonirina, P. Brasseur, J. J. Ballet & L. Favennec., 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:819-821.
- Lengerich, E. J., D. G. Addiss & D. D. Juranek., 1994. Severe giardiasis in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **18**:760-763.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich III, A. R., Lom, J., Lynn, D. H., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. , Wallace, F. G., 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* **27**(1):37-58.
- Lujaii, H. D., M. R. Mowatt & T. E. Nash., 1998. The molecular mechanisms of *Giardia* encystations. *Parasitol. Today* **14**:446-450.
- Luján, H. D., A. Martota, M. R. Mowatt, N. Sciaky, J. Lippincot-Schwartz & T. E. Nash., 1995. Developmental induction of Golgi structure and function and in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **270**:4612-4618.
- Lujan, H. D., M. R. Mowatt & T. E. Nash., 1996. Lipid requirements and lipid uptake by *Giardia lamblia* trophozoites in culture. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**:237-242.

- McGlade, T. R., Robertson, I. D., Elliot, A. D., Thompson, R. C., 2003a. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet. Parasitol.* **110**:197-205.
- Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Perlin, M. H., Schaefer, F. W. III, Jakubowski, W., Atlas, R. M., 1991. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (12): 3456 – 3461.
- Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Perlin, M. H., Schaefer, F. W. III, Jakubowski, W., Atlas, R. M., 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other giardia ssp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J. Clin. Microbiol.* **30**:74-78
- Marti, M., Li, Y., Schraner, E. M., Wild, P., Muller, N., Knopf, L. G., Hehl, A. B., 2003a. The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient golgi-like compartments. *Mol. Biol. Cell.* **14**:1433-1447.
- Marti, M., Regos, A., Li, Y., Schraner, E. M., Wild, P., Muller, N., Knopf, L. G., Hehl, A. B., 2003b. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *J. Biol. Chem.* **278**:24837-24848.
- Meloni, B., R. Thompson, J. Reynoldson & P. Seville., 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.
- Meng, T. C, S. B. Aley, S. G. Svard, M. W. Smith, B. Huang, J. Kim & F. D. Gillin., 1996. Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**:103-108.
- Meyer, E. A., 1990. *Giardiasis: human parasitic diseases*.vol.3. Amsterdam, Elsevier Science, 368p.
- Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. , Ey, P.L., 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet. Evol.* **3**:29-38.

- Monis, P. T., 2003. Thompson, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia* - zoonoses: fact or fiction? *Infect. Genet. Evol.* **3**:233-244,
- Moore, G. T., W. M. Cross, D. McGuire., 1969. Epidemic giardiasis at a ski resort. *N. Engl. J. Med.* **281**:402-407.
- Moraes, R.G., Goulart E.G., Ite, I.C., 2000. *Parasitologia e micologia humana*. 4ªed. Cultura Médica, Rio de Janeiro.
- Mundim, M.J.S., Al, T., 2003. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **55**(6).
- Naik, S. R., Mohanty, D., Rau, N. R. , Vinayak, V. K., 1982. Effect of salinity, pH and temperature on the survival of cysts of *Giardia lamblia*. *Indian. J. Para.* **6**: 231-232.
- Nash, T. E., A. O. Christopher, E. Thomas, G. Subramanian, P. Keiser & T. A. Moore., 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33**:22-28.
- Nayak, N., N. K. Ganguly, B. N. Walia, V. Wahi, S. S. Kanwar & R. C. Mahajan., 1987. Specific secretory IgA in the milk of *Giardia lamblia* - infected and uninfected women. *J. Infect. Dis.* **155**:724-727.
- Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M., 2002. *Giardia, The Cosmopolitan Parasite*, CABI Publishing, United Kingdom.
- Olson, M. E., Morck, D. W., Ceri, H., 1996. The efficacy of a *Giardia lamblia* vaccine in kittens. *Can. J. Vet. Res.* **60**:249-56.
- Ortega, Y. R. & R. D. Adam., 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Inf. Dis.* **25**:545-550.
- Paget, T. A., E. L. Jarroll, P. Manning, D. G. Lindmark & D. Lloyd., 1989. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. *J. Gen. Microbiol.* **135**:145-154.

Pickering, L. K. & P. G. Engelkirk., 1988. *Giardia lamblia*. *Pediatr. Clin. North Am.* **35**:565-577.

Rey, L., 1991. **Parasitologia**, 2^a ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan.

Rey, L., 1973. **Parasitologia**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 228 – 230.

Rice, E. & F. Schaefer., 1981. Improved *in vitro* excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. *J. Clin. Microbiol.* **14**:709-710.

Rocha, M. O., Gomes, M. A., Costa, A. O., Furst, C., Silva, E. F., 2003. Molecular characterization of Brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**:273-278.

Rochelle, P. A., Deleon, R., Stewart, M. H. , Wolfe, R. L., 1997. Comparison of primers optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(1): 106 – 114.

Rosenthal, P. & W. M. Liebman., 1980. Comparative study of stool examinations, duodenal aspiration, and pediatric Entero-Test for giardiasis in children. *J. Pediatr.* **96**:278-279.

Rosez, K. V., 2002. *Giardia* uma infecção global. *Revista Nosso Clínico*, **26**.

Schmidt, G. D., Roberts, L. S., 1981. **Foundations of Parasitology**, 2ed. St. Louis, The C.V. Mosby Company, 975p.

Shepherd, R. W., 1997. Giardiasis: clinical features and treatment. *International Seminars in Paediatric Gastroenterology and Nutrition* **6**:9-13.

Simpson, A. G., Roger, A. J., Silberman, J. D, Leipe, D. D., Edgcomb, V. P., Jermin, L. S., Patterson, D. J., Sogin, M. L., 2002. Evolutionary history of “early-diverging” eukaryotes: the excavate taxon *Carpodimonas* is a close relative of *Giardia*. *Mol. Biol. E* **19**:1782- 1791.

Singer, S. M., H. G. Elmendorf, J. T. Conrad & T. E. Nash., 2001. Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* **183**:119-124.

Smith, D. P., 1985. Pathophysiology and immunology of giardiasis. *Ann. Rev. Med.* **36**:295-307.

Soltys, B. J., M. Falah & R. S. Gupta., 1996. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. *J. Cell Sci.* **109**:1909-1917.

Souza, D.M., Barreiros, J.T., Papp, K.M., 2003. Comparação entre a imuno – separação magnética, acoplada à imunofluorescência, e as técnicas de Faust e de Lutz para o diagnóstico de *Giardia lamblia* em fezes humanas. *Revista Inst. Medicina Tropical de São Paulo* **123**:339-342.

Spelmann, P., 1985. Single – dose tinidazole for the treatment of giardiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**(2): 227–229.

Thompson, R. C. A., Robertson, I. D., 2003. Gastrointestinal parasites of dogs and cats: current issues. *Compend. Cont. Ed. Prac. Vet.* **25**:4-11.

Thompson, R. C, J. A. Reynoldson, & A. H. W. Mendis., 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv. Parasitol.* **32**:72-160.

Thompson, R. C. A., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* **126**:15-35.

Thompson, R. C. A., Hopkins, R. M., Homan, W. L., 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today* **16** (5): 210-213.

Thompson, R. C. A., Lymbery, A. J., Meloni, B. P., 1990. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882 taxonomic and epidemiological significance. *Protozool Abst*, **4**(1): 1-28.

Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A., Mendis, A.H. W., 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv.in Parasitol.* **32**: 71-160.

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

Tupam., 2002. **Índice nacional terapêutico**. Lisboa: Tupam editores.

Vidal, A. M. B., Catapani, W. R., 2005. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Revista São Paulo Medical Journal.* **123**(6).

Ward, W., L. Alvarado, N. D. Rawlings, J. C. Engel, C. Franklin & J. H. McKerrow., 1997. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell* **89**:437-444.

Winkworth, Cynthia L, 2008. Molecular characterization of *Giardia* Isolates from calves and humans in a region in which dairy farming has recently intensified. *Appl Environ Microbiol.* **74**(16): 5100-5105.

Wolf, M. S., 1992. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:93-100.

Woo, P. T., Paterson, W. B., 1986. *Giardia lamblia* in children in day-care centres in southern Ontario, Canada, and susceptibility of animals to *G. lamblia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**:56-59.

Yong, T. S., Park, S. J., Hwang, U. W., Yang, H. W., Lee, K. W., Min, D.Y., Rim, H. J., Wang, Y. , Zheng, F., 2000. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from humans in China and Korea using ribosomal DNA sequences. *J. Parasitol.* **86** (4): 887 - 891.

Zajac, A.M., 1992. *Giardiasis. The Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* **14**(5):605 – 606.

